



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021017494-3 A2

(22) Data do Depósito: 02/09/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
14/03/2023

(54) **Título:** KIT DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE WEISSELLA CIBARIA E USO DO KIT

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/569; G01N 33/68; C07K 16/12; C07K 14/335.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** DAYANNE CARLA FERNANDES; SILAS FERNANDES ETO; MICHELLI INÁCIO GONÇALVES FUNNICELLI; JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR; MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO; IVES CHARLIE SILVA.

(57) **Resumo:** KIT DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE WEISSELLA CIBARIA E USO DO KIT. O presente pedido de patente de invenção é fundamentado no método de conjugação do isotiocianato de fluoresceína (FITC) com a imunoglobulina Y (IgY) e o uso deste anticorpo na detecção da bactéria *Weissella cibaria*, através da aplicação para as técnicas de imunofluorescência direta em tecidos, imunocitoquímica direta e citometria de fluxo, para a fabricação do kit de imunodiagnóstico para detecção de *Weissella cibaria* e uso o mesmo. O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado para o uso de imunodiagnóstico e estudo em patologia, imunologia e microbiologia experimental, através dos métodos de Imunofluorescência direta em tecidos; Imunocitoquímica direta; Citometria de fluxo.

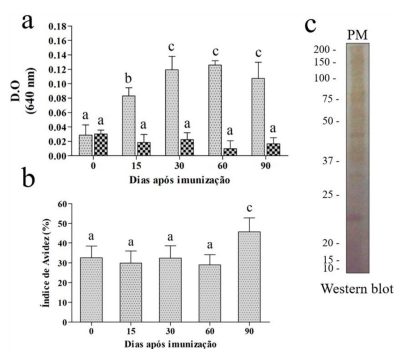


FIGURA 1

KIT DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE *WEISSELLA CIBARIA* E USO DO KIT

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção é fundamentado no método de conjugação do isotiocianato de fluoresceína (FITC) com a imunoglobulina Y (IgY) e o uso deste anticorpo na detecção da bactéria *Weissella cibaria*, através da aplicação para as técnicas de imunofluorescência direta em tecidos, imunocitoquímica direta e citometria de fluxo para a fabricação do kit de imunodiagnóstico para detecção de *Weissella cibaria* e uso o mesmo.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado para o uso de imunodiagnóstico e estudo em patologia, imunologia e microbiologia experimental, através dos métodos de:

1. Imunofluorescência direta em tecidos;
2. Imunocitoquímica direta;
3. Citometria de fluxo.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] A invenção BR1020140180591A2 refere-se ao ensaio de diagnóstico da neosporose baseado na técnica de polarização da fluorescência (FPA). O ensaio referido utiliza o conjugado rNcp43/FITC (proteína recombinante Ncp43 de *Neospora caninum* ligada a molécula isotiocianato de fluoresceína) para a detecção de anticorpos contra *N. caninum*. Em particular, o conjugado rNcp43/FITC identifica anticorpos antígeno específicos no soro de ruminantes e caninos infectados pelo parasito. Esta tecnologia apesar de utilizar conjugação de proteínas com FITC não apresenta semelhanças bioquímico ou funcional com a presente tecnologia, sendo utilizado uma proteína recombinante Ncp43 de *Neospora caninum* ligada a molécula isotiocianato de fluoresceína detectando os anticorpos reativos nas espécies em estudo, enquanto a nossa tecnologia envolve a conjugação do FITC com a IgY e o uso da mesma na detecção do patógeno.

[004] A tecnologia BR1020160244749A2 refere-se ao preparo e utilização das nanopartículas de ouro na técnica de imunofluorescência para tecidos parafinizados por meio de dois protocolos distintos, onde a solução coloidal de nanopartículas de ouro é utilizada como substituta do anticorpo secundário Alexa-Fluor 488. No protocolo P1, a solução coloidal de nanopartículas de ouro é adicionada durante a incubação do anticorpo primário enquanto que, no protocolo P2, a incubação do anticorpo primário se dá por toda a noite e a adição das nanopartículas de ouro é feita no dia seguinte. A presente tecnologia se assemelha na técnica de imunofluorescência em tecidos parafinizados sem anticorpos secundários, entretanto se difere da nossa tecnologia pois não utilizamos nanopartículas de ouro que tem alto custo e sim o anticorpo policlonal IgY extraído da gema do ovo de galinhas poedeiras, que além de ser economicamente viável está em concordância com as diretrizes do bem estar-animal, apresenta baixo custo de produção, pode ser produzida em grandes quantidades e torna desnecessário eutanasiar ou submeter a ave a métodos cruentos para a sua obtenção. Um ovo gera em média 100 mg de IgY na gema, como galinhas poedeiras produzem mais de 20 ovos por mês, a produção de IgY em 30 dias pode chegar a valores maiores do que 2 g por animal.

[005] A BR1020130198820A2 refere-se ao conjugado FPA/rLipL32 (proteína recombinante LipL32 produzida em *Pichia pastoris* ligada a molécula isotiocianato de fluoresceína) para o diagnóstico da leptospirose. O conjugado referido foi produzido para detectar anticorpos contra leptospirosas patogênicas. Em particular, o conjugado FPA/rLipL32 é capaz de identificar anticorpos antígeno específicos no soro de animais infectados pelo patógeno através da técnica de polarização da fluorescência (FPA). Portanto, o conjugado FPA/rLipL32 aqui descrito pode ser utilizado para estudos epidemiológicos e em ensaios de imunodiagnóstico da leptospirose. Esta tecnologia se assemelha com a proposta na utilização do FITC, porém detecta anticorpos, o contrário do que propomos, além disso nossa tecnologia pode ser utilizada em citometria de fluxo e imunofluorescência em tecido parafinado.

[006] A invenção PI0213701-1B1 provê um ensaio para a detecção de animais infectados por *Micobacterium bovis*. Um traçador, compreendendo um peptídeo de

proteína MPB70 de *M. bovis*, conjugado a um fluoróforo, é adicionado a uma amostra de soro de um animal para formar uma mistura. A polarização da fluorescência da mistura é então medida e comparada com a polarização da fluorescência de um controle. A presente invenção ainda provê um traçador para uso em ensaio de polarização da fluorescência para detectar anticorpos específicos para *M. bovis*. O traçador compreende um peptídeo de proteína MPB70 de *M. bovis* conjugado a um fluoróforo, de modo que o traçador é capaz de ligar a anticorpos específicos para *M. bovis* para produzir uma mudança detectável em polarização da fluorescência. A presente tecnologia é diferente, pois não utiliza o anticorpo conjugado ao fluoróforo.

[007] Até o presente momento, poucas são as informações sobre os mecanismos de virulência e a patogênese da infecção pela bactéria *Weissella cibaria* em animais e humanos, e um limitado acervo de métodos e kits, para o diagnóstico e estudo fisiopatológico da infecção por este microrganismo. Além do fato do diagnóstico deste microrganismo estar limitado ao uso de técnicas moleculares, como a identificação por sequenciamento genômico e proteômica, têm como contrapartida o alto custo sendo necessário o uso de equipamentos e serviço técnico qualificado.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[008] Os objetivos do presente pedido de patente de invenção são: fabricar um kit imunodiagnóstico utilizando o método de conjugação do isotiocianato de fluoresceína (FITC) com a imunoglobulina Y (IgY) e o uso deste anticorpo na detecção da bactéria *Weissella cibaria*, através da aplicação para as técnicas de imunofluorescência direta em tecidos, imunocitoquímica direta e citometria de fluxo.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

[009] **DESCRIÇÃO GERAL:** A presente tecnologia é um Kit composto por uma IgY específica para proteínas de membrana de *Weissella cibaria* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) na concentração 1 mg/mL. O Kit acompanha uma solução tampão PBS 1X para a diluição da IgY FITC anti-*Weissella cibaria*, além de uma solução de bloqueio composta por complexos de proteínas (0,5% albumina bovina e 0,5% soro desativado de equino).

[010] PROCESSO DE PREPARAÇÃO: o processo de preparação consiste de algumas etapas, a seguir descritas:

[011] **1. Preparo do imunógeno:** A cepa de *Weissella cibaria* foi cultivada e semeada em meio Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, USA), incubada por 24 horas, a 28 °C, e o meio de cultura removido por centrifugação por 10 minutos a 10.000 xg, e o pellet bacteriano lavado com PBS 0,15 M pH 7,4 e suspenso em Tris HCl 50 mM pH 7,8 a uma densidade de 10⁸ UFC/mL. Na sequência, as células foram lisadas no sonicador ultrassônico Sonifier 250 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) e as células intactas removidas por centrifugação durante 20 minutos a 2.000 xg e o sobrenadante filtrado em filtro 0,22 µm, seguido de ultracentrifugação (Beckman, Optima L-80 K) durante duas horas a 100.000 xg. O pellet contendo as proteínas de membrana (PM) foi dosado pelo método de colorimetria e armazenado a -70 °C para uso nas outras técnicas.

[012] **2. Imunização e coleta de soro e gema das aves:** Catorze galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn* (*Gallus gallus domesticus*) com 32 semanas de idade foram mantidas em gaiolas individuais em temperatura ambiente com 17 horas de luz/dia com água potável na temperatura ambiente entre 26-29 °C, e ração comercial de postura a vontade. As aves imunizadas (n= 7) (IgY específica), receberam a fração bacteriana total contendo as PM de *W. cibaria* na concentração de 100 µg/mL, no volume de 200 µL, diluído em PBS 0,15 M pH 7,4, conjugado com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), injetado em dois pontos distintos do músculo peitoral e as aves controle (n= 7) (IgY inespecífica), inoculadas apenas com solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65%. Após a primeira imunização no dia 0, uma dose reforço foi feita com 30 dias e a coleta de sangue e ovos nos dias 0, 15, 30, 60 e 90.

[013] **3. Análise do título da IgY:** O título da IgY específica e inespecífica para PM de *W. cibaria* foi determinado por ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). A placa de microtitulação foi pré-sensibilizada com a fração de PMs na concentração de 10 µg/mL. Os soros das aves imunizadas e o controle foram diluídos na proporção de 1:2.000 e adsorvidos no volume de 200 µl/poço. A IgG de coelho anti-IgY ligada à peroxidase

(Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, diluição 1:30.000) foi usada como anticorpo secundário. A reação foi revelada com substrato/cromógeno (H_2O_2 /ABST) e a leitura realizada em leitor de microplaca (Molecular Devices SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 640 nm.

[014] **4. Afinidade da IgY:** Após a incubação do soro como descrito no item anterior, a placa foi lavada e adicionados 100 μL /poço de cloreto de magnésio 2 M, e na amostra controle 100 μL /poço de PBS. Após 30 min em temperatura ambiente, a placa foi lavada com PBS-Tween e adicionado 100 μL /poço de IgG de coelho anti-IgY e incubado por uma hora, em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e adicionados 100 μL /poço de substrato/cromógeno (H_2O_2 /ABTS) e absorbância medida a 640 nm. Os valores foram transformados em índice de afinidade.

[015] **5. Purificação da IgY:** A princípio, as gemas foram separadas da clara e da membrana da gema, pesadas e os pesos convertidos na relação 1:1 em mL (1 g = 1 mL), sendo diluídas cinco vezes o seu volume em pectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na concentração de 0,1%, incubadas por uma hora a 4°C sob agitação, após esse período o pH do extrato foi ajustado para 5,0 e deixado overnight a 4°C sob agitação. O extrato então foi centrifugado a 10.000 g por 25 minutos, a 4°C. Após centrifugação foi adicionado, em pequenas parcelas, ao sobrenadante, sulfato de amônio para uma concentração final de 35% (w/v), sob agitação durante duas horas a 4°C. Novamente foi centrifugado a 12.000 g, por 25 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em água destilada. Em seguida foi realizada diálise para a remoção do sal da amostra.

[016] **6. SDS-PAGE e Western blotting:** As proteínas bacterianas (PM) foram avaliadas por meio de eletroforese de gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel com as proteínas (PM) foi transferido para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sob voltagem constante (90 V), a 4 °C, durante uma hora. A seguir a membrana foi incubada com PBS-leite (Molico, Nestlé Brazil, São Paulo, Brazil) a 10% 0,25 M pH 7,2, em temperatura ambiente, por duas horas, sob agitação contínua, lavada com PBS-Tween 20 0,1% e, incubada sob agitação por duas horas, com solução IgY anti-*W. cibaria* (1 mg/mL), dissolvida em

PBS na proporção de 1:2.000, lavada com PBS-Tween 20 0,1%, e o conjugado anti-IgY peroxidase, diluído em PBS 0,25 M pH 7,2 a 1% na proporção de 1:2.000, adicionado a membrana e incubado por uma hora, sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi novamente lavada com PBS-Tween 20 0,1%, e o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) incubado. A reação foi bloqueada com adição de água destilada deionizada e a membrana escaneada e analisada com Image Lab software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

[017] **7. Conjugação da IgY com FITC:** Os extratos purificados da IgY específica e inespecífica, foram conjugados com o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). De maneira que a solução de 1 mg/mL de FITC foi preparada e 50 µL adicionado lentamente em uma solução na concentração de 1 mg/mL da IgY diluída em PBS 0,15M pH 7,4 deixado em rotação por 4 horas a 4 °C. Em seguida a solução foi saturada com 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e a reação bloqueada com solução de nitrato de amônia (NH₄) 25 mM. Na sequência foi adicionado xileno cianol e a solução filtrada em coluna de resina Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e a fração contendo a IgY conjugada com o FITC coletada e armazenada a -20 °C.

[018] **8. Obtenção dos tecidos infectados:** Tilápias-do-nilo (150,5 ± 7g, n= 20) foram distribuídas aleatoriamente em quatro tanques com capacidade para 1.500 L cada (5 peixes/ tanque). Os peixes foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, GER) (1: 20.000 v/ v) diluído em etanol a 98% (0,1 g / mL) e desafiados com a dose letal 50 (DL50) com cepa viva de *W. cibaria*, inoculada na bexiga natatória no volume de 100 µL/peixe, o grupo controle (n= 10) recebeu 100 µL/peixe de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65%. Após 48 horas os peixes foram eutanasiados e submetidos à anestesia com benzocaína (Sigma Aldrich Laboratory, Steinheim, Alemanha) diluída em etanol a 98% (1:500 v/v).

[019] **9. Imunofluorescência em tecidos:** O método de imunofluorescência foi feito em tecido parafinizado. Os cortes do tecido hepático foram desparafinizados e hidratados e a recuperação antigênica feita em calor úmido com tampão tris EDTA pH 7,4, por 10 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito por uma hora,

seguido de um banho em tampão tris HCl pH 7,4, por 5 minutos e um novo bloqueio dos sítios inespecíficos (0,5% albumina bovina e 0,5% soro desativado de equino). As lâminas dos tecidos foram incubadas com 1:2.000 de IgY específica (IgY FITC anti-*W. cibaria*) e com IgY inespecífica, conjugadas com FITC e incubadas por 18 horas em câmara escura e úmida à 4 °C. As lâminas foram lavadas com PBS-Tween 20 e o núcleo foi marcado com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), montadas com *Fluoromount* e analisadas em microscópio de fluorescência (série Olympus BX56; Olympus Life Ciência, Center Valley, PA, EUA).

[020] **10. Imunofluorescência (IMF)/imunocitoquímica em cultura celular:** Para a análise de IMF, os monócitos de tilápias foram extraídos do sangue do grupo controle (os mesmos peixes utilizados no item 2.8). Os monócitos foram cultivados na concentração de $2,5 \times 10^4$ células/poço no volume final de 1 mL/poço, distribuídas em triplicatas na placa de 12 poços contendo lamínula redonda (13 mm) por poço para a adesão celular e incubada a 28° C, em atmosfera controlada a 5% de CO₂. Após isto, as células foram infectadas com $2,0 \times 10^6$ de *W. cibaria* viva, incubadas por 24 horas sobre as mesmas condições descritas e uma lamínula foi coletada, fixada, e a membrana plasmática permeabilizada e os sítios inespecíficos bloqueados como descrito para a imunofluorescência no item 2.9. Em seguida, os monócitos foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com a IgY FITC anti-*W. cibaria*. Para a evidenciação dos núcleos foi utilizado o 4,6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 10 g/mL durante 10 minutos à temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas com *Fluoromount* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e analisadas no microscópio de fluorescência (série Olympus BX56; Olympus Life Ciência, Center Valley, PA, EUA).

[021] **11. Citometria de fluxo:** A cepa de *Weissella cibaria* foi cultivada e semeada em meio Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, USA), incubada por 24 horas, a 28 °C. As bactérias foram colhidas por centrifugação a 15.000 xg a 4 °C por 10 minutos e lavadas 3 vezes com PBS e reajustadas para $3,0 \times 10^5$. Em seguida, foram incubadas com 1:2.000 de IgY específica, conjugadas com FITC e incubadas por 30 minutos em

câmara escura e úmida à 4 °C. As amostras foram injetadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II). Os dados foram processados no software FCS Express 6 Plus.

[022] **12. Análise estatística:** Os resultados foram analisados pelo ANOVA e teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

[023] A Figura 1 apresenta a cinética da produção da IgY FITC anti-*Weissella cibaria* no soro de galinhas poedeiras. (a) Ensaio de ELISA para avaliar a produção sistêmica da IgY específica. (b) Elisa de avidéz para mensurar a afinidade da IgY produzida. (c) Western blot mostrando a multiespecificidade da IgY. Médias (n= 7) com respectivo desvio padrão, letras diferentes os valores se diferem pelo método de Tukey (p<0,05).

[024] A Figura 2 apresenta a imunofluorescência direta utilizando a IgY FITC anti-*Weissella cibaria* no tecido hepático de tilápias-do-nilo infectadas experimentalmente com a bactéria homóloga. (a) Mostra as células de *W. cibaria* imunomarcadas no tecido hepático. Barra 20 µm; coloração de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI).

[025] A Figura 3 apresenta o uso da IgY FITC anti-*Weissella cibaria* na técnica de imunocitoquímica. (a) Identificação de colônias de *W. cibaria* de isolados de cultura microbiológica. (b) Detecção da bactéria no interior de monócitos na infecção *in vitro*. Barra 20 µm; coloração de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI).

[026] A Figura 4 apresenta a citometria de fluxo para a detecção e quantificação da *Weissella cibaria* utilizando a IgY FITC específica. (a) Gráfico de complexidade e (b) Histograma mostrando a detecção da célula bacteriana de *W. cibaria* na concentração de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL, utilizando a IgY FITC específica na diluição de 1:1.000.

[027] A novidade do presente pedido de patente de invenção está no fato de visto a escassez de informações sobre a patogênese da bactéria *Weissella cibaria* em animais e humanos e o alto custo envolvido nos métodos de identificação moleculares, limitado apenas a identificar o microrganismo, sem a capacidade de entender o mecanismo fisiopatológico da infecção. Assim, o uso de anticorpos específicos, propicia a identificação da cultura microbiana e a localização precisa do patógeno nos tecidos orgânicos, além de permitir a quantificação do número de células bacterianas em

líquidos corporais, tecidos e em ensaios fagocíticos em culturas de células animais infectadas. Por fim, o uso de anticorpos IgY de aves, tem com vantagens o baixo custo de produção, alta afinidade e especificidade para antígenos de células procarióticas e eucarióticas e devido ao método de produção e extração via gema do ovo de galinhas poedeiras imunizadas, preservando o bem estar animal não tendo a necessidade de sangria dos animais como ocorre na produção de anticorpos policlonais em equinos, coelhos, carneiros e cabras dentre outras espécies utilizadas, assim como a produção de anticorpos monoclonais em camundongos e ratos que envolve o sacrifício do mesmo.

[028] Visto os resultados dos ensaios iniciais, a tecnologia não apresenta até o presente momento desvantagens ou limitações na técnica ou na aplicação da mesma.

[029] A principal virtude desta tecnologia é que os anticorpos policlonais IgY são extraído da gema do ovo de galinhas poedeiras, que além de ser economicamente viável está em concordância com as diretrizes do bem estar-animal, apresenta baixo custo de produção, pode ser produzida em grandes quantidades e torna desnecessário eutanasiar ou submeter a ave a métodos cruentos para a sua obtenção. No quesito produção, em escala industrial, podemos afirmar que um ovo imunizado gera em média 100 mg de IgY específica na gema, como galinhas poedeiras produzem mais de 20 ovos por mês, a produção de IgY em 30 dias pode chegar a valores maiores do que 2 g por animal, resultando na redução dos custos de produção, e no valor final do produto, ampliando sua comercialização e disponibilidade para o pesquisador. [030] A discursiva sobre as diferenças entre as demais tecnologias do mercado estão bem pautadas no tópico “Análise Comparativa”. Porém podemos aqui, até o presente momento, afirmar que não há empresas que produzem anticorpos específicos para a bactéria em questão, e que ofereça um kit multifuncional como o ofertado neste contexto.

REIVINDICAÇÕES

1. **KIT DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE *WEISSELLA CIBARIA***, o dito kit **caracterizado por** ser composto por uma IgY específica para proteínas de membrana de *Weissella cibaria* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) na concentração 1 mg/mL; em que o kit acompanha uma solução tampão PBS 1X para a diluição da IgY FITC anti-*Weissella cibaria*, além de uma solução de bloqueio composta por complexos de proteínas (0,5% albumina bovina e 0,5% soro desativado de equino); em que compreende as seguintes etapas de preparação:

1. Preparo do imunógeno: a cepa de *Weissella cibaria* é cultivada e semeada em meio Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, USA), incubada por 24 horas, a 28 °C, e o meio de cultura removido por centrifugação por 10 minutos a 10.000 xg, e o pellet bacteriano lavado com PBS 0,15 M pH 7,4 e suspenso em Tris HCl 50 mM pH 7,8 a uma densidade de 10⁸ UFC/mL; na sequência, as células são lisadas no sonicador ultrassônico Sonifier 250 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) e as células intactas removidas por centrifugação durante 20 minutos a 2.000 xg e o sobrenadante filtrado em filtro 0,22 µm, seguido de ultracentrifugação (Beckman, Optima L-80 K) durante duas horas a 100.000 xg; o pellet contendo as proteínas de membrana (PM) é dosado pelo método de colorimetria e armazenado a -70 °C para uso nas outras técnicas;

2. Imunização e coleta de soro e gema das aves: Catorze galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn* (*Gallus gallus domesticus*) com 32 semanas de idade são mantidas em gaiolas individuais em temperatura ambiente com 17 horas de luz/dia com água potável na temperatura ambiente entre 26-29 °C, e ração comercial de postura a vontade; as aves imunizadas (n= 7) (IgY específica), recebem a fração bacteriana total contendo as PM de *W. cibaria* na concentração de 100 µg/mL, no volume de 200 µL, diluído em PBS 0,15 M pH 7,4, conjugado com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), injetado em dois pontos distintos do músculo peitoral e as aves controle (n= 7) (IgY inespecífica), inoculadas apenas com solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65%; após a primeira imunização no dia 0, uma dose reforço foi feita com 30 dias e a coleta de sangue e ovos nos dias 0, 15, 30, 60 e 90;

3. Análise do título da IgY: O título da IgY específica e inespecífica para PM de *W. cibaria* é determinado por ensaio imunoenzimático indireto (ELISA); a placa de microtitulação é pré-sensibilizada com a fração de PMs na concentração de 10 µg/mL; os soros das aves imunizadas e o controle são diluídos na proporção de 1:2.000 e adsorvidos no volume de 200 µL/poço; a IgG de coelho anti-IgY ligada à peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, diluição 1:30.000) foi usada como anticorpo secundário; a reação é revelada com substrato/cromógeno (H₂O₂/ABST) e a leitura realizada em leitor de microplaca (Molecular Devices SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 640 nm;
4. Afinidade da IgY: Após a incubação do soro, a placa é lavada e adicionados 100 µL/poço de cloreto de magnésio 2 M, e na amostra controle 100 µL/poço de PBS; após 30 min em temperatura ambiente, a placa é lavada com PBS-Tween e adicionado 100 µL/poço de IgG de coelho anti-IgY e incubado por uma hora, em temperatura ambiente; os poços são lavados e adicionados 100 µL/poço de substrato/cromógeno (H₂O₂/ABTS) e absorbância medida a 640 nm; os valores são transformados em índice de afinidade;
5. Purificação da IgY: A princípio, as gemas são separadas da clara e da membrana da gema, pesadas e os pesos convertidos na relação 1:1 em mL (1 g = 1 mL), sendo diluídas cinco vezes o seu volume em pectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na concentração de 0,1%, incubadas por uma hora a 4°C sob agitação, após esse período o pH do extrato foi ajustado para 5,0 e deixado overnight a 4°C sob agitação; o extrato então é centrifugado a 10.000 g por 25 minutos, a 4°C; após centrifugação é adicionado, em pequenas parcelas, ao sobrenadante, sulfato de amônio para uma concentração final de 35% (w/v), sob agitação durante duas horas a 4°C; novamente é centrifugado a 12.000 g, por 25 minutos, a 4°C; o sobrenadante é descartado e o sedimento ressuspenso em água destilada; em seguida é realizada diálise para a remoção do sal da amostra;
6. SDS-PAGE e *Western blotting*: as proteínas bacterianas (PM) são avaliadas por meio de eletroforese de gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE); o gel com as proteínas (PM) é transferido para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA) sob voltagem constante (90 V), a 4 °C, durante uma hora; a seguir a membrana é incubada com PBS-leite (Molico, Nestlé Brazil, São Paulo, Brazil) a 10% 0,25 M pH 7,2, em temperatura ambiente, por duas horas, sob agitação contínua, lavada com PBS-Tween 20 0,1% e, incubada sob agitação por duas horas, com solução IgY anti-*W. cibaria* (1 mg/mL), dissolvida em PBS na proporção de 1:2.000, lavada com PBS-Tween 20 0,1%, e o conjugado anti-IgY peroxidase, diluído em PBS 0,25 M pH 7,2 a 1% na proporção de 1:2.000, adicionado a membrana e incubado por uma hora, sob agitação em temperatura ambiente; em seguida, a membrana é novamente lavada com PBS-Tween 20 0,1%, e o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) incubado; a reação é bloqueada com adição de água destilada deionizada e a membrana escaneada e analisada com Image Lab software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA);

7. Conjugação da IgY com FITC: Os extratos purificados da IgY específica e inespecífica, são conjugados com o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); de maneira que a solução de 1 mg/mL de FITC é preparada e 50 µL adicionado lentamente em uma solução na concentração de 1 mg/mL da IgY diluída em PBS 0,15M pH 7,4 deixado em rotação por 4 horas a 4 °C; em seguida a solução é saturada com 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e a reação bloqueada com solução de nitrato de amônia (NH₄) 25 mM; na sequência é adicionado xileno cianol e a solução filtrada em coluna de resina Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e a fração contendo a IgY conjugada com o FITC coletada e armazenada a -20 °C;

8. Obtenção dos tecidos infectados: Tilápias-do-nilo (150,5 ± 7g, n= 20) são distribuídas aleatoriamente em quatro tanques com capacidade para 1.500 L cada (5 peixes/ tanque); os peixes foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, GER) (1: 20.000 v/ v) diluído em etanol a 98% (0,1 g / mL) e desafiados com a dose letal 50 (DL50) com cepa viva de *W. cibaria*, inoculada na bexiga natatória no volume de 100 µL/peixe, o grupo controle (n= 10) recebeu 100 µL/peixe de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65%; após 48

horas os peixes foram eutanasiados e submetidos à anestesia com benzocaína (Sigma Aldrich Laboratory, Steinheim, Alemanha) diluída em etanol a 98% (1:500 v/v);

9. Imunofluorescência em tecidos: o método de imunofluorescência é realizado em tecido parafinizado; os cortes do tecido hepático são desparafinizados e hidratados e a recuperação antigênica feita em calor úmido com tampão tris EDTA pH 7,4, por 10 minutos; o bloqueio da peroxidase endógena é feito por uma hora, seguido de um banho em tampão tris HCl pH 7,4, por 5 minutos e um novo bloqueio dos sítios inespecíficos (0,5% albumina bovina e 0,5% soro desativado de equino); as lâminas dos tecidos são incubadas com 1:2.000 de IgY específica (IgY FITC anti-*W. cibaria*) e com IgY inespecífica, conjugadas com FITC e incubadas por 18 horas em câmara escura e úmida à 4 °C; as lâminas são lavadas com PBS-Tween 20 e o núcleo foi marcado com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), montadas com *Fluoromount* e analisadas em microscópio de fluorescência (série Olympus BX56; Olympus Life Ciência, Center Valley, PA, EUA);

10. Imunofluorescência (IMF)/imunocitoquímica em cultura celular: para a análise de IMF, os monócitos de tilápias são extraídos do sangue do grupo controle (os mesmos peixes utilizados no item 2.8); os monócitos são cultivados na concentração de $2,5 \times 10^4$ células/poço no volume final de 1 mL/poço, distribuídas em triplicatas na placa de 12 poços contendo lamínula redonda (13 mm) por poço para a adesão celular e incubada a 28° C, em atmosfera controlada a 5% de CO₂; após isto, as células foram infectadas com $2,0 \times 10^6$ de *W. cibaria* viva, incubadas por 24 horas sobre as mesmas condições descritas e uma lamínula foi coletada, fixada, e a membrana plasmática permeabilizada e os sítios inespecíficos bloqueados como descrito para a imunofluorescência no item 9; em seguida, os monócitos foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com a IgY FITC anti-*W. cibaria*; para a evidenciação dos núcleos foi utilizado o 4,6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 10 g/mL durante 10 minutos à temperatura ambiente; as lamínulas foram montadas com *Fluoromount* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e analisadas no microscópio de fluorescência (série Olympus BX56; Olympus Life Ciência, Center Valley, PA, EUA);

11. Citometria de fluxo: A cepa de *Weissella cibaria* é cultivada e semeada em meio Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, USA), incubada por 24 horas, a 28 °C; as bactérias são colhidas por centrifugação a 15.000 xg a 4 °C por 10 minutos e lavadas 3 vezes com PBS e reajustadas para $3,0 \times 10^5$; em seguida, são incubadas com 1:2.000 de IgY específica, conjugadas com FITC e incubadas por 30 minutos em câmara escura e úmida à 4 °C; as amostras são injetadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II); os dados são processados no software FCS Express 6 Plus;
12. Análise estatística: Os resultados são analisados pelo ANOVA e teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

2. USO DO KIT DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE *WEISSELLA CIBARIA*, caracterizado por ser aplicado para o uso de imunodiagnóstico e estudo em patologia, imunologia e microbiologia experimental, através dos métodos de Imunofluorescência direta em tecidos, Imunocitoquímica direta e citometria de fluxo, como descrito na reivindicação 1.

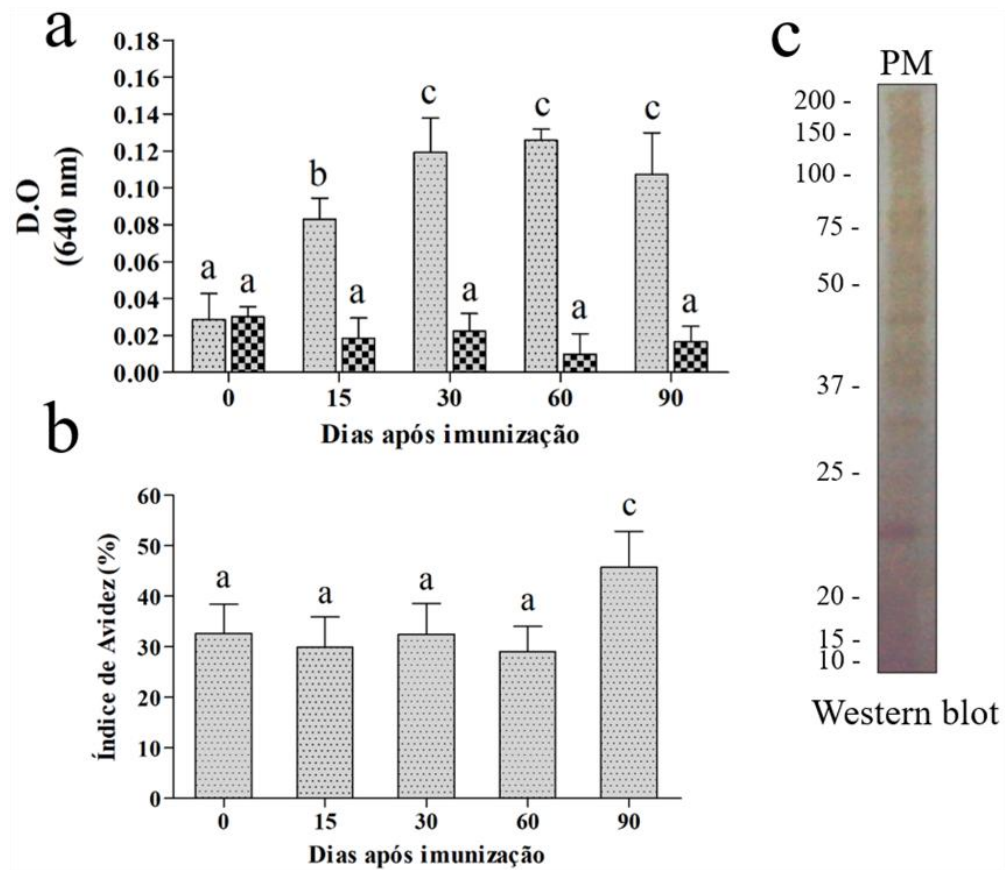
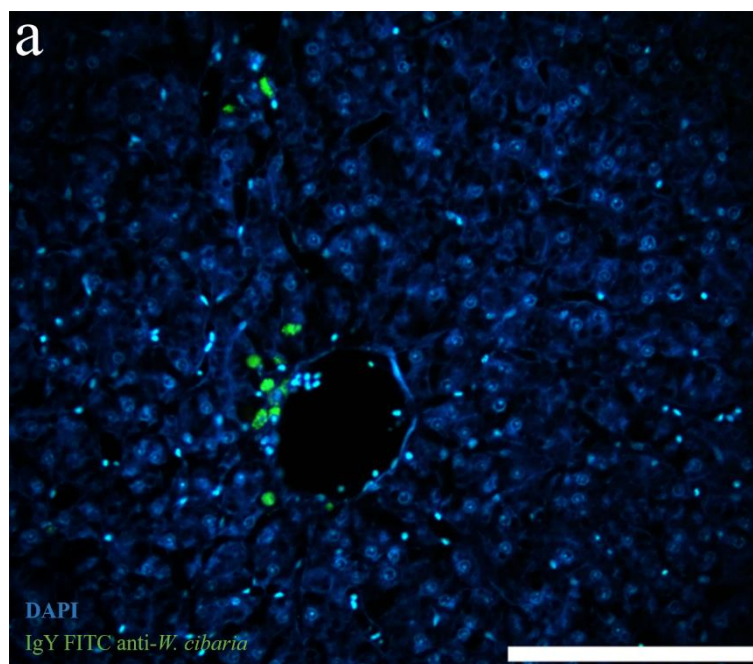


FIGURA 1

**FIGURA 2**

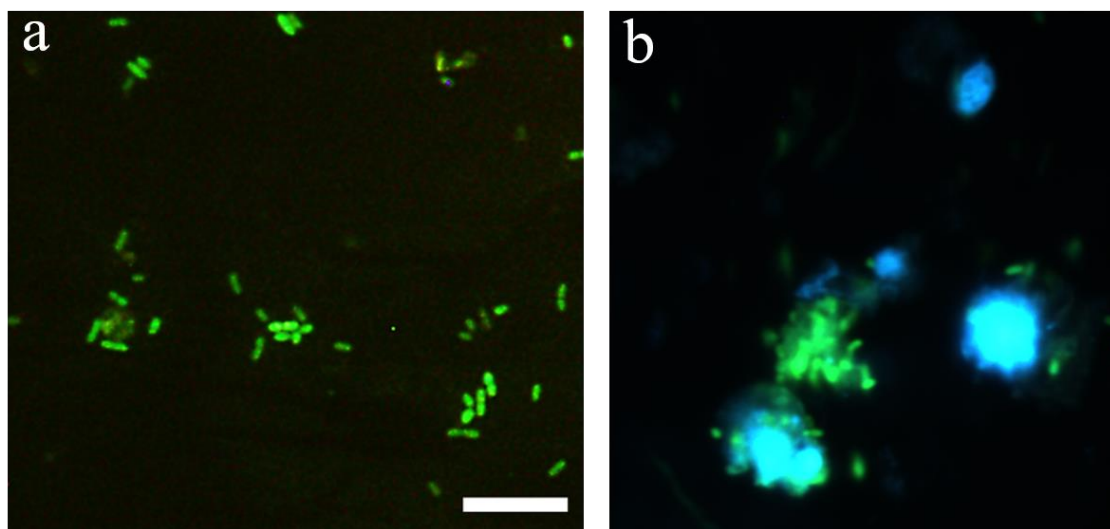
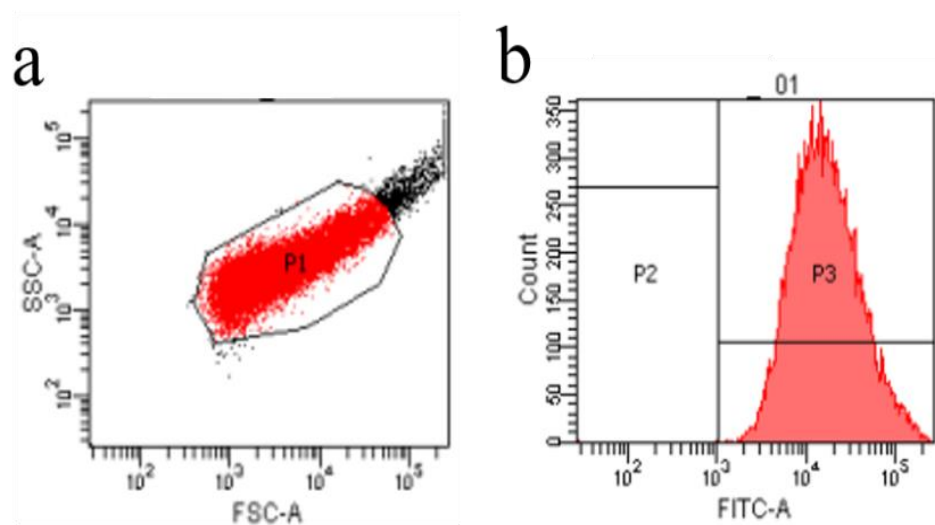


FIGURA 3

**FIGURA 4**

RESUMO

KIT DE IMUNODIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE *WEISSELLA CIBARIA* E USO DO KIT

O presente pedido de patente de invenção é fundamentado no método de conjugação do isotiocianato de fluoresceína (FITC) com a imunoglobulina Y (IgY) e o uso deste anticorpo na detecção da bactéria *Weissella cibaria*, através da aplicação para as técnicas de imunofluorescência direta em tecidos, imunocitoquímica direta e citometria de fluxo, para a fabricação do kit de imunodiagnóstico para detecção de *Weissella cibaria* e uso o mesmo. O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado para o uso de imunodiagnóstico e estudo em patologia, imunologia e microbiologia experimental, através dos métodos de Imunofluorescência direta em tecidos; Imunocitoquímica direta; Citometria de fluxo.