



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

2

3

4

5

6

7

8

9

12 **Clonagem e expressão do gene *paa* e resposta imune humoral de**
13 **matrizes suínas vacinadas com proteínas recombinantes (F4, F5,**
14 **F6, F18, F41 e Paa) de *Escherichia coli* patogênicas**

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

DANIELE ARAUJO PEREIRA

Clonagem e expressão do gene *paa* e resposta imune humoral de matrizes suínas vacinadas com proteínas recombinantes (F4, F5, F6, F18, F41 e Paa) de *Escherichia coli* patogênicas

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção de título de Mestre.

Orientador (a): Profa. Dra. Marilda C. Vidotto.
Co-orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono.

Londrina
2014

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

P436c Pereira, Daniele Araujo.

Clonagem e expressão do gene paa e resposta imune humoral de matrizes suínas vacinadas com proteínas recombinantes (F4, F5, F6, F18, F41 e Paa) de *Escherichia coli* patogênicas / Daniele Araujo Pereira. - Londrina, 2014. 60 f. il.

Orientador: Marilda Carlos Vidotto.

Coorientador: Mário Augusto Ono.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

Inclui bibliografia

1. Colibacilose – Teses. 2. Suíno – Doenças. – Teses. 3. Resposta imune. – Teses. 4. Enterobacterias - Vacinas. – Teses. 5. Vacina veterinária. – Teses. I. Vidotto, Marilda Carlos. II. Ono, Mário Augusto. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU619:636.4

DANIELE ARAUJO PEREIRA

Clonagem e expressão do gene *paa* e resposta imune humoral de matrizes suínas vacinadas com proteínas recombinantes (F4, F5, F6, F18, F41 e Paa) de *Escherichia coli* patogênicas

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção de título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Edgard Hideaki Hoshi
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Prof. Dr. Júlio César de Freitas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de Março de 2014.

1 PEREIRA, Daniele Araujo. **Clonagem e expressão do gene *paa* e resposta imune humoral**
2 **de matrizes suínas vacinadas com proteínas recombinantes (F4, F5, F6, F18, F41 e Paa)**
3 **de *Escherichia coli* patogênicas.** 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
4 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

5 6 7 **RESUMO**

8
9
10 *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigênica (ETEC) é considerada importante causa de diarreia
11 em suínos neonatos e desmamados. A adesão da bactéria à célula do hospedeiro é considerada
12 um fenômeno específico entre as adesinas fimbriais e não fimbriais com seus respectivos
13 receptores nos enterócitos. Os distúrbios entéricos estão relacionados com as fimbrias F4
14 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41 e F18. Além da ETEC, outra categoria de *E. coli* pode
15 causar diarreia nos suínos, denominada de PEPEC (*porcine pathogenic E. coli*), a qual produz
16 a adesina Paa (*Porcine attaching adherence*) capaz de provocar uma lesão típica denominada
17 A/E (*attaching and effacing*). A imunização das matrizes com adesinas é importante para
18 estimular a produção de anticorpos e a conseqüente transferência através do colostro aos
19 leitões. O objetivo deste trabalho foi produzir uma vacina inovadora e completa para *E. coli* e
20 comparar a resposta imune das matrizes imunizadas com as proteínas recombinantes (ETEC e
21 EPEC) com uma vacina comercial de ETEC. O trabalho foi realizado em uma granja
22 comercial, onde foram utilizadas nove matrizes suínas prenhes divididas em três grupos. O
23 grupo um (G1) foi vacinado com as proteínas recombinantes (n=3), o grupo dois (G2) foi
24 vacinado com vacina comercial (n=3) e o grupo três (G3) foi inoculado com salina tamponada
25 estéril (PBS) (n=3). As proteínas recombinantes foram obtidas após a indução das amostras de
26 *E. coli* BL21 (DE3) com adição de lactose. O grau de pureza foi analisado em gel SDS-PAGE
27 corado com *Comassie*. A dose da vacina de proteínas recombinantes continha 100µg de cada
28 antígeno recombinante e adjuvante Hidróxido de Alumínio 2mg/ml com conservante
29 Timerosal a 0,02%. As matrizes prenhes foram imunizadas quatro e duas semanas antes do
30 parto. Amostras de sangue das matrizes foram coletadas para avaliação dos níveis de
31 anticorpos através do teste de ELISA indireto, no dia da primeira dose (dia 0), na segunda
32 imunização (dia 14) e no dia do parto (dia 28). Quatro leitões de cada matriz foram
33 selecionados para analisar o soro. A vacina comercial continha quatro fimbrias (K88, K99,
34 F41, 987) e a vacina de proteína recombinante cinco fimbrias (rF18, rK88, rK99, rF41, r987)
35 e rPaa. Os resultados foram submetidos ao Teste de *Kruskal-Wallis* para verificar diferença
36 entre os grupos analisados que se identificado foi aplicado o Teste de Dunn a 6% de
37 significância. Os animais inoculados com a vacina recombinante apresentaram reatividade
38 maior que os animais inoculados com a vacina comercial e animais do grupo controle (PBS).
39 A vacina de proteína recombinante obteve uma resposta vacinal significativa nas matrizes
40 com as fimbrias (K99, F18, K88 e 987) e nos leitões com as fimbrias (K99, F18, 987, F41,
41 K88). A vacina de proteína recombinante estimulou a resposta imune humoral específica nas
42 matrizes, mas não foi possível afirmar se houve proteção dos leitões. Os resultados mostram a
43 importância da vacinação das matrizes para aumentar os níveis de anticorpos anti-fimbrias e
44 assim prevenir a diarreia.

45
46 **Palavras-chave:** Colibacilose, suínos, enterotoxigênica (ETEC), Elisa indireto, fimbrias.

1 PEREIRA, Daniele Araujo. **Cloning and expression of the gene *paa* and humoral immune**
2 **response of immunized sows vaccinated with recombinant proteins (F4, F5, F6, F18, F41**
3 **and Paa) of pathogenic *Escherichia coli*.** 60 p. Dissertation (Master of Animal Science) -
4 State University of Londrina, Londrina, 2014.

5 6 7 **ABSTRACT**

8
9
10 *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigenic (ETEC) is an important cause of diarrhea in
11 newborn and weaned pigs. The adhesion of bacteria to the host cell is considered a specific
12 phenomenon among fimbrial adhesins and no fimbrial with their respective receptors on
13 enterocytes. Enteric disorders are related with the fimbriae F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P),
14 F41 and F18. In addition to the *E. coli* ETEC another category can cause diarrhea in pigs,
15 called PEPEC (*porcine pathogenic E. coli*), which produces the adhesin Paa (*Porcine*
16 *attaching adherence*) can cause a typical lesion termed A/E (*attaching and effacing*).
17 Immunization of sows with adhesins is important to stimulate the production of antibodies
18 and the subsequent transfer through colostrum in piglets. The aim of this study was produce
19 an innovative and complete vaccine for *E. coli* and compare the immune response in sows
20 immunized with recombinant proteins (ETEC and EPEC) with a commercial vaccine (ETEC).
21 The study was conducted on a commercial farm, where nine pregnant sows divided into three
22 groups were used. Group one (G1) were vaccinated with the recombinant protein (n = 3), the
23 group two (G2) was vaccinated with the commercial vaccine (n = 3), Group three (G3) was
24 inoculated with sterile phosphate buffered saline (PBS) (n = 3). The recombinant proteins
25 were obtained after induction of the *E. coli* strains BL21 (DE3) containing added lactose. The
26 purity was analyzed in SDS-PAGE gel stained with Coomassie. The dose of the vaccine of
27 recombinant proteins contained 100µg of each recombinant antigen and adjuvant Aluminium
28 Hydroxide 2mg/ml with 0.02% Thimerosal preservative. The pregnant sows were immunized
29 four and two weeks before delivery. Blood samples from the mothers were collected for
30 assessment of antibody levels by indirect ELISA, in the the first dose (day 0), the second
31 immunization (day 14) and at parturition (day 28). Four piglets from each sow were selected
32 to analyze the serum. The commercial vaccine contained four fimbriae (K88, K99, F41, 987)
33 and recombinant protein with vaccine five fimbriae (rF18, rK88, rK99, rF41, r987) and rPaa.
34 The results were submitted to the *Kruskal - Wallis* test to verify differences between groups
35 analyzed that identified test was applied Dunn to 6 % significance level. The animals
36 inoculated with the recombinant vaccine showed higher reactivity than animals inoculated
37 with commercial vaccine and the control group (PBS). The vaccine of recombinant protein
38 vaccine achieved a significant response in sows with fimbriae (K99, F18, K88, 987) and in
39 piglets with fimbriae (K99, F41, 987, F18, K88). The recombinant protein vaccine stimulated
40 specific humoral immune response in sows, but we are unable to say whether there was
41 protection of piglets. The results show the importance of vaccinating in sows to increase the
42 levels of anti-fimbriae antibodies and prevent diarrhea.

43
44 **Keywords:** Colibacillosis, swine, enterotoxigenic (ETEC), indirect ELISA, fimbriae.
45
46
47
48

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela força e confiança, mostrando a cada dia o melhor lugar para ser feliz. Ao meu pai Cido lindo, por todo amor e dedicação que sempre teve por mim, a minha mãe Maria do Carmo, por ser tão amável, por ser a pessoa que me apoia e que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo. Ao meu irmão Rodrigo que com sua alegria sempre me anima. Aos meus avós, por estarem sempre torcendo e rezando para que meus objetivos sejam alcançados. Ao meu namorado José Ruben que sempre me estimula a trabalhar e seguir em frente.

A minha orientadora, professora Dr. Marilda C. Vidotto, pela atenção, paciência e ensinamentos no auxílio a concretização desta dissertação e pela oportunidade.

Ao professor Dr. Mario Augusto Ono, pelas correções, pelo apoio e ensinamentos durante o mestrado.

Ao professor Dr. Caio Abércio da Silva, pelas correções e ajuda com as estatísticas.

Ao Professor Dr. Odilon Vidotto, pelas correções.

Aos funcionários das produções de suínos, onde fiz amigos inesquecíveis e aprendi muito com o pessoal da Granja de Sertaneja/Pr e Granja Peru (Arapongas/PR).

As amigas do Laboratório IgY, Carol Nachi Rossi e Melissa Hirozawa pessoas maravilhosas que me ajudaram com ensinamentos e apoio, aprendi muito com elas.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia no Departamento de Patologia, Rafaela, Aline, Giovanna, Isabele, Mônica, Tiago e Igor, pessoas essenciais e prestativas.

Aos colegas e funcionários dos Laboratórios de Protozoologia da UEL que ajudaram no dia a dia, Maria Paula, Fernanda, Thaís, Vitor, Aldair, Bia, Helenice e José Maurício.

Aos colegas de mestrado pelo companheirismo, Carol Miura minha amiga no dia a dia, Keila, Flávia, Luciana, em especial a Daniele Voltarelli amiga para todas as horas tanto no trabalho como na vida, a Aline Sbruzzi amiga companheira e prestativa em ajudar todos que precisam e o Jonatas Campos que me ajudou com as correções e apoio.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

É preciso ter uma meta, e a nossa meta é muito grande. Quem se acostuma com coisa pequena não pode ir para o céu. O céu é para quem sonha grande, pensa grande, ama grande, e tem a coragem de viver pequeno. Isso é o céu...

Pe. Léo SCJ

ABREVIATURAS

1		
2		
3	°C	Graus Celsius
4	µL	Microlitro
5	A/E	<i>attaching and effacing</i>
6	D 0	dia zero
7	D 14	dia catorze
8	D 28	dia vinte e oito
9	DO	Densidade ótica
10	<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>
11	EAEC	<i>Escheria coli</i> enteroagregativa
12	EHEC	<i>Escheria coli</i> enterohemorrágica
13	EIEC	<i>Escheria coli</i> enteroinvasiva
14	ELISA	Ensaio de imuno-absorção ligado à enzima
15	EPEC	<i>Escheria coli</i> enteropatogênica
16	ETEC	<i>Escheria coli</i> enterotoxigênica
17	F	fímbria
18	G	Grama
19	Ig	Imunoglobulina
20	IPTG	tiogalactopiranosídeo de isopropila
21	LB	Luria Bertani
22	LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>
23	LT	Termo-Labéis
24	mL	Mililitro
25	nm	nanômetro
26	Paa	<i>porcine attaching adherence</i>
27	PBS	Tampão salina – Fosfato
28	PBS-T	Tampão salina – Fosfato Tween
29	PEPEC	porcine pathogenic <i>E. coli</i>
30	PM	peso molecular
31	SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
32	ST	Termo-estáveis
33	PWD	postweaning diarrhea
34	KDa	Kilodalton

LISTA DE FIGURAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

Figura 1 -	Produção Mundial em (MIL. TON.) de carne suína	14
Figura 2 -	Distribuição geográfica da suinocultura no Brasil	15
Figura 3 -	Patogênese da <i>E. coli</i> ETEC em suínos	18

LISTA DE TABELAS

1

2

3 **Tabela 1 -** Características das fímbrias de *Escherichia coli* ETEC..... 20

SUMÁRIO

1		
2		
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
4	REFERENCIAS	23
5		
6	OBJETIVOS	30
7	Objetivo Geral	30
8	Objetivos específicos.....	30
9		
10	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO : Cloning and expression of the Paa gene	
11	(porcine attaching and effacing 4 associated) in Escherichia coli (PEPEC)	
12	associated with postweaning 5 diarrhea.	31
13	Abstract	33
14	Introduction	33
15	Materials and methods	34
16	Results	37
17	Discussion	38
18	Acknowledgements	39
19	References	39
20		
21	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO : Resposta imune humoral de matrizes suínas	
22	imunizadas com vacinas de proteínas 1 recombinantes de Escherichia coli	
23	patogênicas	42
24	Resumo	43
25	Abstract	44
26	Introdução	45
27	Material e Métodos	46
28	1. <i>Obtenção das proteínas recombinantes</i>	46
29	2. <i>Purificação das proteínas recombinantes</i>	46
30	3. <i>Preparo das vacinas</i>	47
31	4. <i>Delineamento Experimental</i>	47
32	5. <i>Imunização dos animais e coleta das amostras</i>	48
33	6. <i>Monitoramento dos animais</i>	48
34	7. <i>Ensaio imunoenzimático ELISA Indireto</i>	48

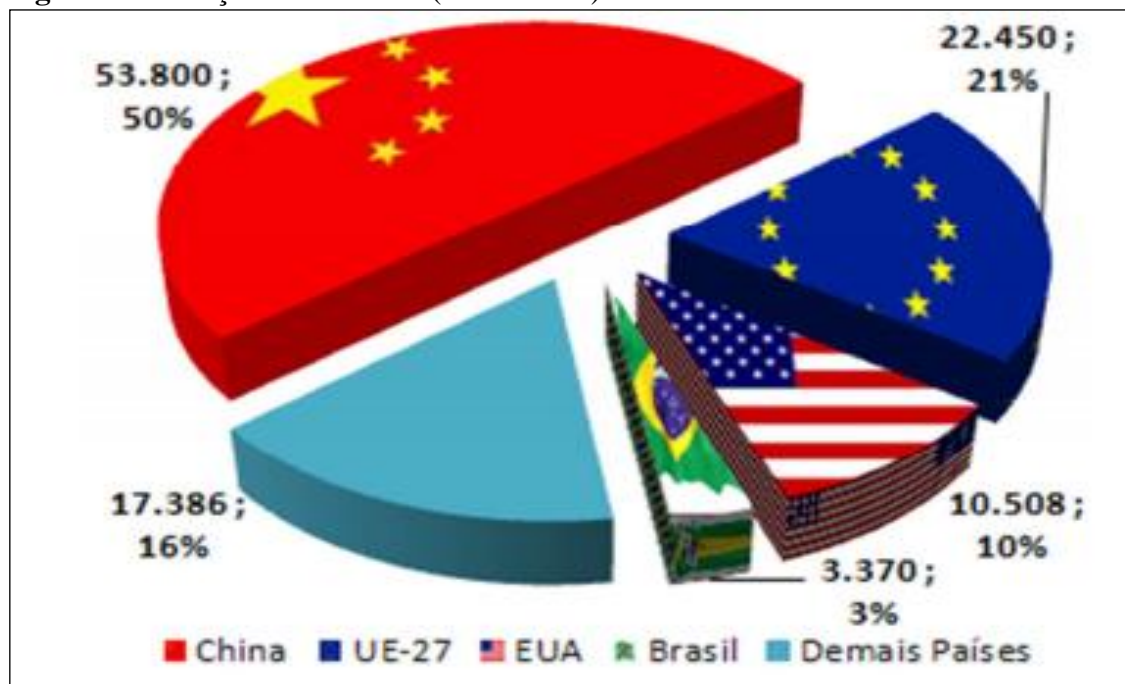
1	8. <i>Análise estatística</i>	49
2	Resultados	49
3	Discussão	50
4	Conclusão	52
5		
6	REFERÊNCIAS	56
7		
8	CONCLUSÃO FINAL	58
9		
10	APÊNDICE	59
11		

REVISÃO DE LITERATURA

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo (ABIPECS, 2013). Segundo dados do Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o rebanho mundial de suínos foi estimado de 801,412 milhões de cabeças em 2013, representando um aumento de 0,3% em relação ao rebanho de 2012. Foram produzidas aproximadamente 107,514 milhões de toneladas de carne suína no mundo, o que representa um crescimento de 1,8% em relação ao ano de 2012, sendo aproximadamente 50% deste total produzido na China.

A China é considerada a maior produtora de carne suína com 53,8 milhões de toneladas, em segundo lugar a União Europeia (27 países) com 22,4 milhões de toneladas com 21%, em terceiro lugar os Estados Unidos com 10,5 milhões de toneladas com 10% da produção e em quarto lugar o Brasil com 3,4 milhões de toneladas, sendo classificado em quarto lugar como exportador e consumidor de carne suína com 3% da produção mundial (USDA, 2013). O Brasil possui 39,5 mil fornecedores de carne suína, capaz de gerar 605 mil empregos, sendo considerado um setor industrial com alto grau de qualificação e responsável por gerar desenvolvimento econômico e social nas diversas regiões do Brasil (ABIPECS, 2013).

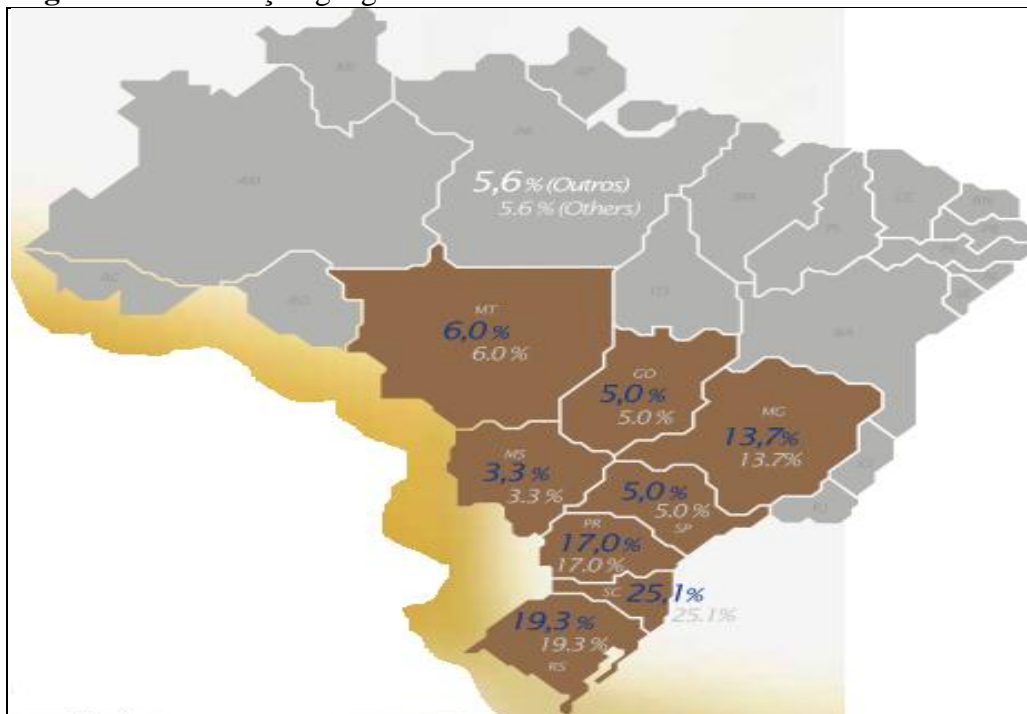
Figura 1. Produção Mundial em (MIL. TON.) de carne suína.



Fonte: USDA, 2013.

1 No Brasil, a produção de suínos está mais desenvolvida nos estados da região Sul, mas
 2 houve uma expansão da suinocultura para as regiões Centro-Oeste e Sudeste por causa das
 3 instalações de frigoríficos e busca de matéria prima para fabricação de rações (milho e soja)
 4 com baixo custo. Outro fator relevante, foi a disponibilidade de área para escoamento dos
 5 dejetos. As regiões Norte e Nordeste não manifestaram crescimento positivo devido à
 6 escassez e insumos caros (CIAS, 2011). O Paraná produz cerca de 500 mil toneladas, menos
 7 que a produção dos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, ainda que o estado de
 8 Santa Catarina produz sozinho 25,1 % da produção brasileira (Figura 2) (ABIPECS, 2013).

9
 10 **Figura 2.** Distribuição geográfica da suinocultura no Brasil.



11
 12 Fonte: ABIPECS, 2013.

13
 14 A suinocultura representa 5,3% do Valor Bruto da produção paranaense, que
 15 corresponde a R\$ 2,65 bilhões. Atualmente no Brasil, a carne suína ainda é pouco consumida
 16 quando comparada a carne bovina e a de frango (SEAB, 2013). O consumo per capita
 17 brasileiro equivale a 15 Kg por ano, com preferência pelos alimentos industrializados
 18 (ABIPECS, 2013).

19 Segundo dados da Abipecs, (2013), mesmo com a grande pressão sobre os custos e
 20 crescimento da concorrência, o Brasil obteve um crescimento das exportações com 581 mil
 21 toneladas exportadas e 60 países importadores. Os principais importadores da carne suína

1 brasileira, em toneladas, foram a Rússia, com participação de 26,07%, Hong Kong, 23,44%, e
2 Ucrânia, 13,18% (ACCS, 2013).

3 Com a substituição de criações extensivas de suínos por sistemas de confinamento, a
4 quantidade de animais aumentou, gerando uma maior proliferação de microrganismos e
5 predisposição de doenças à espécie (DEWEY et al., 1995). Um fator limitante na produção de
6 suínos está relacionado às enterites, pois podem acometer os animais em todas as fases de
7 crescimento (MOOI; GRAAF, 1985).

8 Para evitar prejuízos na criação de suínos, cuidados na fase inicial são primordiais
9 através de um diagnóstico entérico rápido e preciso associado à história completa, sinais
10 clínicos e patologia. Recentes avanços em métodos de diagnóstico permitiram melhor
11 compreensão e exploração das doenças para diminuir seus efeitos na suinocultura (WILLS,
12 2000).

13 A principal causa de perdas econômicas em suínos jovens está relacionada às enterites,
14 pois provoca a diarreia ou morte súbita, diminuição de peso, prejuízo na conversão alimentar
15 e refugagem. A síndrome diarreica é responsável por 6% das causas de mortalidade em leitões
16 nas granjas (CARAMORI JÚNIOR et al., 2010). Dentre os agentes que causam diarreia nos
17 leitões lactentes estão *Isoospora suis*, coronavírus, rotavírus e *Clostridium perfringens* tipo C
18 (BAKER et al., 1979; ZLOTOWSKI, DRIEMEIER, BARCELLOS, 2008), sendo que a
19 *Escherichia (E.) coli* enterotoxigênica (ETEC) pode ser considerada a causa mais importante
20 capaz de provocar doença e morte em leitões neonatos e desmamados (FRANCIS, 2002;
21 ALMEIDA et al., 2007).

22 A Colibacilose pode apresentar uma taxa de mortalidade de 25% se medidas como a
23 prevenção e tratamento não forem adotadas (MORÉS; MORENO, 2007). A unidade suínica
24 pode maximizar a produção na fase de maternidade se evitar os fatores de riscos como a
25 presença de diarreia nos leitões, taxa de mortalidade, coeficiente de variação do peso ao
26 desmame e o ganho de peso médio diário até o desmame (SILVA et al., 1998).

27 *E. coli* são bactérias anaeróbias facultativas pertencente à família *Enterobacteriaceae*,
28 um bastonete Gram negativo, não esporulado, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel
29 (ACHA; SZYFRES, 2001; HIRSH et al., 2003). Estas bactérias possuem capacidade de
30 reduzir nitrato a nitrito, fermentam glicose e são oxidase-negativa e metabolizam uma
31 ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas e aminoácidos, lipídios e ácidos
32 orgânicos. Além disso, produzem catalase, utilizam glicose e amônia como fontes únicas de
33 carbono e nitrogênio (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

1 Apesar da *E. coli* ser uma bactéria da microbiota normal do trato intestinal em
2 humanos e outras espécies de animais, algumas cepas são patogênicas por apresentarem
3 características específicas, e podem ser classificada em seis grupos: *E. coli* enteropatogênica
4 (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli*
5 enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e difusamente aderente (DAEC)
6 (GYLES et al., 1994; NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI, KELLER, GOMES, 2002).
7 Dentre essas, as bactérias pertencentes ao grupo ETEC é a principal responsável pela
8 Colibacilose, tanto no período neonatal como pós-desmame dos suínos (MORÉS; MORENO,
9 2007; MELKEBEEK, GODDEERIES, COX, 2013).

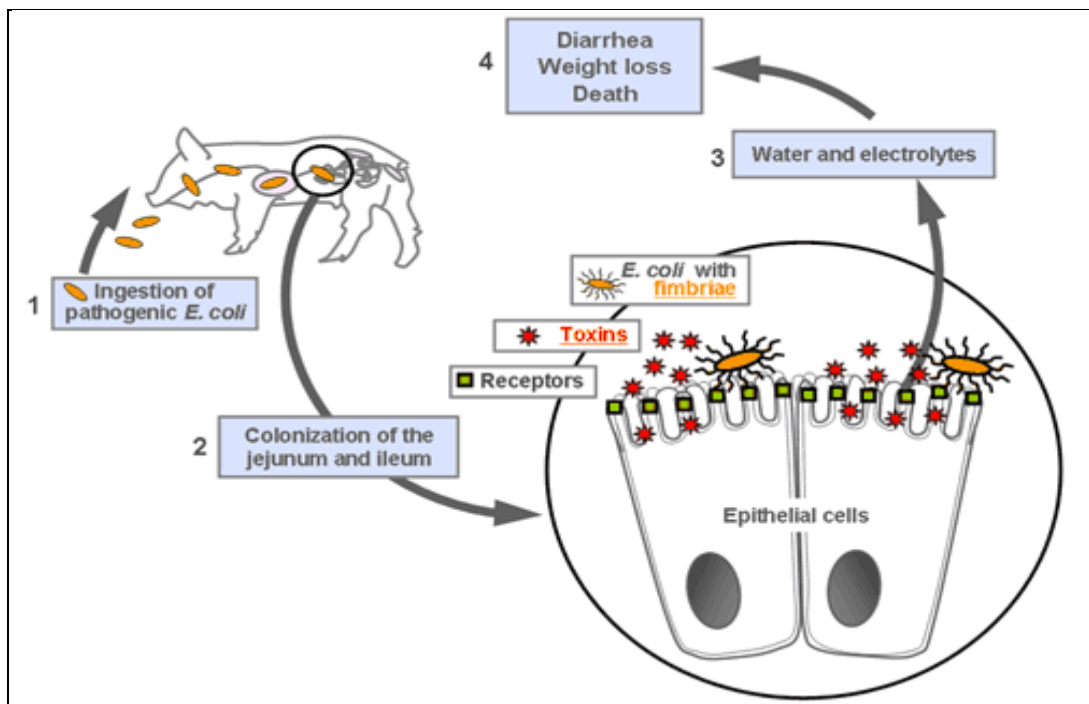
10 A classificação sorológica *E. coli* é determinada de acordo com os quatro antígenos de
11 superfície, O (antígeno somático), k (antígeno capsular), H (antígeno flagelar) e F (antígeno
12 fimbrial) (ORSKOV et al., 1977). As cepas de ETEC que causam diarreia em suínos possuem
13 dois fatores de virulência fundamentais, as adesinas e enterotoxinas (MOON; BUNN, 1993).
14 As adesinas são apêndices fimbriais protéicos, imunogênicas, as quais se projetam da
15 superfície celular e reconhecem receptores específicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).
16 Estas podem ser expressas por vários genes localizados em diferentes segmentos do
17 cromossomo e/ou plasmídios e diferenciam-se em suas propriedades hemaglutinantes,
18 sorológicas e em sua morfologia (Tabela 1) (MOSELEY et al., 1986, BLANCO et al., 1991).
19 As subunidades protéicas da maioria das fímbrias se fixam aos açúcares integrados nos
20 eritrócitos causando hemaglutinação na presença de D manose (BLANCO et al., 1993).

21 As ETEC encontradas nos suínos apresentam vários tipos adesinas, definidas como
22 fímbrias: F4, F5, F6, F18 e F41 (FRANCIS, 2002; VIDOTTO et al., 2009; LIU et al., 2014).
23 A expressão destas fímbrias é estimulada *in vitro* pelas condições do crescimento como pH,
24 temperatura do cultivo, aeração e osmolaridade do meio, tendo um meio específico para cada
25 fímbria (GAASTRA; GRAAF, 1982).

26 A Colibacilose é estabelecida quando ocorre ligação da bactéria aos receptores
27 específicos dos enterócitos através das adesinas fimbriais. Em seguida são liberadas as toxinas
28 que ativam a produção das enzimas guanil ciclase e adenil ciclase, com isso aumenta-se a
29 concentração intracelular do AMP cíclico, gerando uma maior transferência de bicarbonato de
30 sódio e água das células do lúmen do intestino (Figura 3) (MORÉS; MORENO, 2007). A
31 Colibacilose, quando causada pelas toxinas da *E. coli* ETEC, provoca uma desidratação e a
32 morte do animal, produzindo uma diarreia secretória com uma eliminação de fluídos maior
33 que a capacidade de absorção, gerando uma disfunção dos processos fisiológicos
34 (ZLOTOWSKI, DRIEMEIER, BARCELLOS, 2008).

1 As enterotoxinas são classificadas em termo-estáveis ST (Sta e Stb) e termo-lábeis
 2 (LT-1 e LT-2), estas são as responsáveis por causarem desequilíbrio no sistema de absorção e
 3 secreção de eletrólitos e água pelos enterócitos e posterior diarreia, desidratação e morte dos
 4 animais (MORÉS; MORENO, 2007). *E. coli* (ETEC) é produtora de várias toxinas protéicas
 5 que se diferenciam em peso, estrutura molecular, atividade biológica e imunológica (GYLES
 6 et al., 1992).

7
 8 **Figura 3:** Patogênese da *E. coli* ETEC em suínos.



9
 10 Fonte: <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/pathogenesis.asp> acessado em 04/01/2014.

11
 12 A fímbria K88 foi a primeira a ser estudada, também conhecida hoje como F4, sendo
 13 descoberta em 1961 através de testes sorológicos de suínos com Doença do Edema e Enterites
 14 (ORSKOV et al., 1961), suas variantes antigênicas foram diferenciadas em K88ab e K88ac
 15 (ORSKOV et al., 1964) e K88ad (NAGY; FEKETE, 1999, FAIRBROTHER; NADEAU;
 16 GYLES, 2005), sendo que a variante K88ac é mais encontrada em leitões com diarreia. A F4
 17 é encontrada no mundo todo, estando relacionada com a enterotoxina LT (SÖDERLIND;
 18 MÖLLBY, 1979). Esta fímbria pode ser caracterizada com um diâmetro de 2,1 nm e peso
 19 molecular de 27,5 KDa (Kilodalton). O meio de cultivo específico para a expressão da F4 é o
 20 ágar glicose e esta fímbria permite à *E. coli* hemaglutinar eritrócitos de cobaia em presença de
 21 manose (MOON et al., 1990).

1 A colonização da fímbria F4 na mucosa intestinal, ocorre nos suínos recém-nascidos e
2 desmamados em fase de terminação. A adesão da F4 é espécie-específica, ocorrendo na
3 maioria dos suínos (SELLWOOD et al., 1975). Ruter e Jones (1973) testaram a primeira
4 vacina com a fímbria F4 em matrizes suínas para proteger os leitões neonatos com imunidade
5 passiva através do colostro. Uma vacina com a fímbria F4 foi capaz de proteger leitões que
6 receberam anticorpos através da via colostrada durante o período de aleitamento (NAGY;
7 FEKETE, 1999). Um trabalho realizado com amostras de surto de diarreia no Paraná,
8 encontrou uma prevalência de 52% da fímbria F4 nas amostras analisadas (SOUZA et al.,
9 2007).

10 A fímbria K99, atualmente conhecida como F5, foi descrita por Isaacson em 1977 tem
11 um peso molecular de 18,5 KDa e diâmetro de 4,8 nm. A F5 pode ser encontrada em amostras
12 de *E. coli* ETEC em bezerros, cordeiros (ORSKOV et al., 1975, GUINÉE; JANSEN;
13 AGTERBERG, 1976) e suínos (MOON et al., 1977). O meio seletivo Minca, é usado para
14 induzir a expressão das fimbrias.

15 A purificação e caracterização da fímbria F41 foi relatada por De Graaf e Rooda
16 (1982), com peso molecular de 29,5 KDa e diâmetro com 3,2 nm, sendo que a sua produção
17 pode ser comparada com a produção da fímbria F5. A Fímbria F41 usada como antígeno na
18 vacina é menos definida quando comparada com as fimbrias F4, F5 e F6 (MOON et al.,
19 1990). Esta fímbria é geralmente encontrada em bovinos e suínos (GAASTRA; GRAAF,
20 1982). A F5 e F41, hemaglutinam eritrócitos de humano, cobaia e ovino na presença de
21 manose (MOSELEY et al, 1986).

22 As cepas mais encontradas em suínos neonatos possuem as fimbrias F5 (K99) e F6
23 (987P). Durante a primeira semana de vida, os receptores para fímbria F5 são encontrados nos
24 enterócitos dos leitões, depois diminuem expressivamente (ALFIERI et al., 2010). A fímbria
25 987 foi analisada através da microscopia eletrônica com um diâmetro de 7nm, e peso
26 molecular com 18,9 KDa e pH 3.7 (MORGAN et al., 1978). Geralmente esta fímbria é
27 encontrada em suínos neonatos (GAASTRA; GRAAF, 1982), porém os receptores para esta
28 fímbria nos suínos, estão presentes nos animais jovens e adultos (ALFIERI et al., 2010). O
29 meio de cultura ágar sangue é o mais seletivo para a indução dessa fímbria (CARVALHO et
30 al., 1991; FRANCIS; REMMERS; DEZEEUW, 1982). A fímbria 987P não possui
31 propriedade hemaglutinante (ISAACSON; RICHTER, 1981), mas se liga à receptores de
32 glicoproteínas nos enterócitos dos suínos.

33 A fímbria F18 foi expressada em laboratório somente em condições de cultura especial
34 (WITTING et al., 1994). Esta fímbria possui duas variantes F18ab e F18ac, sua identificação

1 foi analisada por sorologia (WITTING et al., 1994) e por PCR (IMBERECHETS et al., 1994).
 2 Segundo Witting (1995), a variante F18ab foi considerada mais prevalente do que F18ac em
 3 estudo realizado na Alemanha, na Saxônia (WITTING et al., 1995). Segundo Coddens et al.,
 4 (2007) a fímbria F18 tem capacidade de colonizar o epitélio intestinal, aderir a receptores
 5 específicos e provocar a Doença do Edema ou diarreia pós desmame.

6 Na suinocultura, as fímbrias F4, F5, F6, F41 estão ligadas aos transtornos entéricos e a
 7 fímbria F18 com a Doença do Edema (FAIRBROTHER et al., 1986) . A doença do edema é
 8 uma enfermidade que infecta os leitões desmamados, está relacionada a cepas de *E. coli*
 9 ligadas a diferentes fatores de virulência como as fímbrias e as toxinas (GYLES et al., 1994).
 10 A fímbria F18 pode produzir uma toxina chamada Shiga-like IIe (SLTIIe) que provoca a
 11 Doença do Edema (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999; MORÉS; MORENO, 2007).

12 Segundo Witting (1995), as infecções com *E. coli* ETEC são principalmente causadas
 13 pelas fímbrias F4 e F18. A fímbria F4 geralmente ocorre na primeira semana e a F18 na
 14 primeira e segunda semana pós desmame (VAN DEN BROECK; COX; GODDEERIS,
 15 1999). Moon et al (1980) descreveram que o impacto da fímbria no diagnóstico e na
 16 vacinação depende do número e prevalência dos tipos de anticorpos favorecendo a
 17 colonização intestinal da espécie ocorrente.

18

19 **Tabela 1.** Diâmetro, massa molecular e localização das diferentes fímbrias de *Escherichia coli*
 20 ETEC.

21	22	23	24	25	26	27	28
Fímbria	Diâmetro (nm)	Massa molecular (KDa)	Localização gene				
24	F4	2,1	27,5	Plasmidial			
25	F5	4,8	18,5	Plasmidial			
26	F6	7,0	20,0	Plasmidial			
27	F18	4,6	33,0	Plasmidial			
28	F41	3,2	29,5	Cromossomal			

29 Fonte: (Gaastra e De Graaf, 1982; Rippinger et al., 1995).

30

31 Além de ETEC, outra categoria de *E. coli* que causa diarreia neonatal em suínos, foi
 32 denominada de PEPEC (*porcine pathogenic E. coli*), sendo esta semelhante à *E. coli* que
 33 provoca infecções entéricas em humanos e animais através das lesões A/E (*attaching and*
 34 *effacing*) (ZHU et al., 1994, AN et al., 1999). Estas lesões se caracterizam pela aderência

1 íntima às membranas dos enterócitos e ativação de uma série de produtos de genes
2 cromossomais que interagem com os componentes das células do hospedeiro, levando à
3 destruição das bordas dos enterócitos e do citoesqueleto (LEVINE, 1987).

4 A caracterização fenotípica e genotípica das PEPEC mostrou que não possuem os
5 fatores de virulência de ETEC, mas apresentam sequências de nucleotídeos *paa* (“*porcine*
6 *attaching and effacing*”) associados à capacidade de produzir lesão A/E nos leitões e secções
7 de íleo de suínos (ZHU et al., 1994; LECLERC et al., 2007). A lesão A/E da *E. coli* é causada
8 pela proteína da membrana exterior, conhecida como a intimina, e codificada pelo gene *eae*,
9 que facilita a aderência bacteriana (MALIK et al., 2006).

10 As alterações histopatológicas causadas pela lesão A/E são indistinguíveis daquelas
11 produzidas em humanos pela *E. coli* enteropatogênica (EPEC). Lesões A/E são também
12 produzidas por outras bactérias, incluindo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), agente da colite
13 hemorrágica e síndrome urêmica em humanos (KAPER, 1998); EPEC que causam diarreia
14 especificamente em coelhos (PEPEC) (MOON et al., 1983). Todos genes envolvidos na lesão
15 A/E estão localizados no cromossomo, denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*).

16 O gene *paa* identificado em PEPEC foi clonado e mostrou forte correlação com o gene
17 *eae* de EHEC O157:H7 e de isolados de cachorro, coelhos e porcos (AN et al., 1999, 2000). A
18 caracterização do gene *paa* sugere sua contribuição para os primeiros estágios da virulência
19 da PEPEC (BATTISSON et al., 2003). No Paraná, 300 amostras de fezes de 100 leitões de
20 diferentes propriedades foram analisadas através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)
21 para o gene *Paa* e sua ligação com as enterotoxinas *Sta*, *Stb* e *LT*. Foi encontrado 22% de
22 positividade para o gene *paa*, o qual está associado à presença dos genes para outras adesinas
23 e toxinas (*F4*, *F18*, *F41*, *Paa*, *Sta*, *Stb* e *LT*), demonstrando assim sua importância como um
24 fator de virulência (VIDOTTO et al., 2013).

25 Raramente o diagnóstico da diarreia por *E. coli* ETEC pode ser concluído através de
26 sinais clínicos e lesões de necropsia, sendo considerado inespecífico. Como a *E. coli* compõe
27 a microbiota intestinal comum dos animais, fazer somente o isolamento não é conclusivo. É
28 exigido uma descrição fenotípica ou genotípica da cepa isolada para reconhecer as fímbrias da
29 bactéria e caracterizar o gene que codifica a proteína da fímbria e das enterotoxinas (ALFIERI
30 et al., 2010).

31 O surgimento das diarreias é influenciado por um conjunto de fatores dentro da
32 produção suinícola. Os principais problemas estão relacionados à deficiência na desinfecção
33 da baia e higienização da porca, falta de controle adequado da temperatura para o leitão
34 (33°C) e matriz, correntes de ar, tratador pouco atencioso quanto aos aspectos de sanidade

1 como o uso de botas sujas que servem como fonte de contaminação para os leitões; ração de
2 baixa digestibilidade que faz com que o substrato permaneça mais tempo no intestino delgado
3 de leitões, favorecendo a multiplicação e prevalência da *E. coli*; além das condições
4 ambientais e o grau imunitário da porca (MORÉS; MORENO, 2007).

5 Várias são as formas de minimizar os prejuízos causados pela ETEC, através dos
6 programas de vacinação das matrizes antes do parto, vacinas autógenas nos leitões, uso de
7 antibióticos profiláticos, seleção de animais que não tenham genes que codificam receptores
8 para as fímbrias, imunização ativa (vacinação intramuscular com fímbrias, imunização oral
9 com cepas atenuadas ou não virulentas que contenham as fímbrias), imunização passiva
10 (administração oral de imunoglobulinas da gema de ovos (IgY) contra fímbrias),
11 administração de proteínas do plasma em pó (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005,
12 FRITZEN, 2008) e vacinas feitas nos leitões via intranasal para evitar diarreia (LIN et al.,
13 2013).

14 Apesar da prevenção envolver custos, pode ser considerada uma excelente estratégia e
15 bastante efetiva quando utilizada adequadamente. Os fatores de risco também devem ser
16 evitados, pois são fundamentais para obter um ambiente saudável livre de doenças (MORÉS;
17 MORENO, 2007).

18 Os esquemas vacinais propostos por empresas que vendem e comercializam vacinas
19 para Colibacilose preconizam a vacinação da matriz durante a gestação em duas doses, a
20 primeira vacinação quatro a duas semanas antes do parto, ou uma revacinação duas semanas
21 antes do parto. No primeiro contato da matriz com a vacina, deve ser preconizada duas doses,
22 para estimular uma maior resposta imunológica. Como os leitões desmamados são
23 frequentemente acometidos por ETEC, devem ser capaz de produzir uma imunidade através
24 dos anticorpos recebidos no colostro (ANAMI, 2008). O colostro pode ser absorvido pelos
25 enterócitos nos leitões até as primeiras 24 horas após o nascimento, sendo esta imunização
26 passiva suficiente para a proteção gerada através das imunoglobulinas (IgG) para evitar a
27 diarreia (JENSEN et al., 2001).

28 Estudos comprovam que as matrizes suínas imunizadas com vacinas para
29 Colibacilose são capazes de proteger melhor seus leitões quando comparadas com matrizes
30 não vacinadas (HUR; LEE, 2012). A vacina é capaz de gerar uma produção de anticorpos
31 específicos que diminuem a adesão bacteriana aos receptores nas células intestinais e
32 neutralizam as enterotoxinas. As vacinas comerciais são compostas por bacterinas inativadas
33 ou vacinas purificadas de subunidades fimbriais, e algumas já possuem a enterotoxina LT,
34 sendo aplicadas pela via parenteral (OFEK et al., 1990; ALFIERI et al., 2010). Como

1 resultado, os anticorpos específicos são transferidos aos leitões a fim de bloquear os fatores de
2 virulência da *E. coli* ETEC e sua proliferação no intestino (MOON; BUNN, 1993).

3 Segundo Verfaillie et al (2004) as vacinas comerciais não são completamente
4 eficientes, devido a dependência dos anticorpos maternos. Contudo as vacinas comerciais via
5 parenteral em porcas prenhes são eficazes contra a diarreia neonatal por *E. coli* ETEC se a
6 vacina possuir todos os antígenos fimbriais ocorrentes na granja, quando houver a ingestão
7 suficiente de colostro por animal e uma baixa pressão de infecção (HAESEBROUCK et al.,
8 2004).

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

REFERÊNCIAS

- 1
- 2
- 3 ABIPECS (2013). Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de carne suína.
4 Arquivo capturado em 5 de Janeiro de 2013, disponível na internet www.abipecs.org.br.
- 5
- 6 ACCS (2013). Associação Catarinense de Criadores de Suínos. Arquivo capturado em 5 de
7 Janeiro de 2013, disponível na internet www.accs.org.br
- 8
- 9 ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis e enfermedades transmisibles comunes al hombre y a
10 los animales. Bacterioses y micosis. **Publicacion Científica y Técnica**. n. 580. 3.ed. v. I .Ed:
11 Organization Panamericana de La Salud (OPS). Washington – DC – 20037 – EUA, 398,
12 2001.
- 13
- 14 ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BARRY, A. F. Diarreias em suínos. In: ALFIERI, A.F.;
15 BARRY, A.F.; ALFIERI, A.A.; et al. (Eds.). **Tópicos em Sanidade e Manejo de Suínos**.
16 Campinas: Sanphar, Sorocaba: Curuca Consciência Ecológica, pp. 165-184, 2010.
- 17
- 18 ALMEIDA, F. S.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; MALUTA, R. P. ÁVILA, F. A.
19 Diarreia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes
20 isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, SP,
21 v. 23, n.3, pp. 151-157, 2007.
- 22
- 23 AN, H.; FAIRBROTHER, J. M.; DESAUTELS, C.; HAREL, J. Distribution of a novel locus
24 called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*.
25 **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.473.pp.179-184, 1999.
- 26
- 27 AN, H., FAIRBROTHER, J.M., DESAUTELS, C., MABROUK, T., DUGOURD, D.,
28 DEZFULIAN, H., HAREL, J. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig
29 attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of eae, espA, espB and espD
30 genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. **Microbial Pathogenesis**. 28, 291-300. 2000.
- 31
- 32 ANAMI, R. Desenvolvimento e avaliação de uma bacterina contra Colibacilose em suínos.
33 **CESUMAR**. v. 10, n 02, pp. 135-140, 2008.
- 34
- 35 BAKER, J. R. The gross pathology of common alimentary disorders of the pig. **The pig**
36 **Journal**.v.4.pp.11-6, 1979.
- 37
- 38 BATISSON, I., GUIMOND, M.P., GIRARD, F., AN, H., ZHU, C., OSWALD, E.,
39 FAIRBROTHER, J.M., JACQUES, M., HAREL, J. Characterization of the novel factor paa
40 involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *E. coli*.
41 **Infection and Immunology**. v.71, pp.4516–4525. 2003.
- 42
- 43 BERTSCHINGER, H.U., FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* infections. In: Straw, B.E.,
44 D’Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D. (Eds.), **Diseases of Swine**. Iowa State University
45 Press, Ames, IA, pp. 431–468, 1999.
- 46
- 47 BLANCO, J., BLANCO, M., BLANCO, J.E., ALONSO, M.P., GARABAL, J.I.
48 GONZALEZ, E.A. *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxicos y verotoxigenicos de
49 origen humano y bovino. Patogenesis, epidemiologia y diagnostico microbiologico. **Servicio**
50 **Publicaciones Diputacion Provincial de Lugo**. Lugo, Spain. pp. 1-361. 1993.

- 1 BLANCO, J., E. A., GONZALEZ, M. BLANCO, J. I. GARABAL, M. P. ALONSO, S.
2 FERNANDEZ, R. VILLANUEVA, A. AGUILERA, M. A. GARCIA, J. TORRES, A. REY,
3 W. H. JANSEN, P. A. M. GUINÉE. Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with infant
4 diarrhea in Galicia, north western Spain. **Journal Medical of Microbiology**.v.35.pp.162–167.
5 1991.
- 6
7 CARVALHO, A. C. F. B., ÁVILA, F. A., SCHOCKENITURRINO, R. P., QUINTANA, J.
8 L., ALBERTINI, P. E.G. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from pigs in
9 the Ribeirão Preto region, state of São Paulo, Brazil. **Revue Elevage Médecine. Veterinaire**
10 **Pays Tropicaux**, v.44, n.1, pp.49-52, 1991.
- 11
12 CARAMORI JÚNIOR, J. G.; ARAÚJO, G. M.; VIEITES, F. M.; ABREU, J. G.; COCHOVE,
13 V. C.; SILVA, G. S. Causas de mortalidade em leitões em granja comercial do médio-norte de
14 Mato Grosso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 17. n. 1. PP. 12-15. 2010.
- 15
16 CIAS (2011). Centro de Inteligência de Aves e suínos. Arquivo capturado em 2 de Maio de
17 2012, disponível na internet www.cnpsa.embrapa.br/cias.
- 18
19 CODDENS, A.; VERDONCK, F.; TIELS, P.; RASSCHAERT, K.; GODDEERIS, B. M.;
20 COX, E. The age-dependent expression of the F18+ *E. coli* receptor on porcine gut epithelial
21 cells is positively correlated with the presence of histo-blood group antigens. **Veterinary**
22 **Microbiology**.v.122.pp. 332-341, 2007.
- 23
24 DE GRAAF, F. K.; ROORDA, I. Production, purification and characterization of the fimbrial
25 adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41 M.
26 **Infection and Immunology** .v. 36.pp..751-753, 1982.
- 27
28 DEWEY, C.E.; WITTUM, T.E.; HURD, H.S.; DARGATZ, D.A.; HILL, G.W. Herd and
29 litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets
30 4-14 days of age. **Swine Health Production**. v.3, pp.21-28, 1995.
- 31
32 FAIRBROTHER, J. M. Enteric cobacillosis. In: LEMAN, A. D.; STRAW, B.;
33 MENGELING, W. L. D`ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine**, ed. Ames: The
34 Yowa State University. pp. 489-97, 1992.
- 35
36 FAIRBROTHER, J.M., LARIVIÈRE, S., LALLIER, R. New fimbrial antigen F165 from
37 *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. **Infection and**
38 **Immunity**. v. 51, n. 1, p. 10-15, 1986.
- 39
40 FAIRBROTHER, J. M., NADEAU, E.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* in postweaning
41 diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal**
42 **Health Research Reviews** .v. 6. n.1. pp. 17-39, 2005.
- 43
44 FRANCIS, D. H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis,
45 **Journal Swine Health Production**. v.10, n.4. pp. 171-175, 2002.
- 46 FRANCIS, D.H., REMMERS, G.A., DEZEEUW, P.S. Production of K88, K99, and 987P
47 antigens by *Escherichia coli* cultured on synthetic and complex media. **Journal of Clinical**
48 **Microbiology**. 15, pp. 181–183.1982.
- 49

- 1 FRITZEN, J. T. T.; **Avaliação da utilização de anticorpos IgY de galinhas poedeiras no**
2 **controle de diarreia pós desmame em leitões.** Dissertação (Mestrado em Medicina
3 Veterinária) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.
- 4
- 5 GAASTRA, W.; DE GRAAF F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive
6 enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol Reviews.**v. 46.pp.129-161, 1982.
- 7
- 8 GUINEE, P. A. M., W. H. JANSEN, AND C. M. AGTERBERG. Detection of the K99
9 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates
10 from calves and its correlation with enterotoxigenicity. **Infection and Immunology.**
11 v13.pp.1369-1377, 1976.
- 12
- 13 GYLES, C. L. *Escherichia coli* enterotoxins. In: GYLES, C. L. *Escherichia coli* in Domestic
14 Animals and Humans. **Wallingford: CAB International.** p.337-364, 1994.
- 15
- 16 GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of**
17 **Microbiology.** v.38.pp.734-746, 1992.
- 18
- 19 HAESEBROUCK F, PASMANS F, CHIERS K, MAES D, DUCATELLE R, DECOSTERE
20 A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect. **Veterinary**
21 **Microbiology.**v: 100, pp.255–68, 2004.
- 22
- 23 HIRSH, D. C. *Escherichia coli*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária.**
24 Rio de Janeiro: Guanabara, 2003. pp.63-68.
- 25
- 26 HUR, J.; LEE, J. H. Comparative evaluation of a vaccine candidate expressing
27 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesions for colibacillosis with a commercial
28 vaccine using a pig model. **Vaccine.** v.30. pp. 3829-3833, 2012.
- 29
- 30 IMBERECHTS, H.; VAN PELT, N.; DE GREVE, H.; LINTERMANS, P. Sequences related
31 to the major subunit gene *fedA* of F1107 fimbriae in porcine *Escherichia coli* strains that
32 express adhesive fimbriae. **FEMS Microbiol. Letters.** v. 119.pp.309-314. 1994.
- 33
- 34 ISAACSON, R.E. K99 surface antigen of *Escherichia coli*. Purification and partial
35 characterization. **Infection and Immunology.** v.15, pp.272-279. 1977.
- 36
- 37 ISAACSON, R.E., RICHTER, P. *Escherichia coli* 987P pilus: purification and partial
38 characterization. **Journal of Bacteriology.** v.146, pp.784-789. 1981.
- 39
- 40 JESSEN, A. R.; ELNIF, J.; BURRIN, D. G.; SANGILD, P. T. Development of intestinal
41 immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. **Journal**
42 **of nutrition.** v.131.pp. 3.259-3.265, 2001.
- 43 KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* 0157:H7 and other Shigatoxin-producing *E.*
44 *coli* strains. **ASM,** Washington, 1998, 465p.
- 45
- 46 LECLERC, S.; BOERLIN, P.; GYLES, C. DUBREUIL, J. D.; MOUREZ, M.;
47 FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J. Paa, originally identified in attaching and effacing
48 *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. **Research in Microbiology.**
49 v.158.pp. 97-104, 2006.
- 50

- 1 LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic,
2 Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. **The Journal of infections**
3 **Diseases**. v.155. n. 3. pp. 377-389. 1987.
- 4
- 5 LIN, J.; MATEO, K. S. ZHAO, M.; ERICKSON, A. K.; GARCIA, N.; HE, D.; MOXLEY, R.
6 A.; FRANCIS, D. H. Protection of piglets against enteric colibacillosis by intranasal
7 immunization with K88ac (F4ac) fimbriae and heat labile enterotoxin of *Escherichia*
8 *coli*. **Veterinary Microbiology**. v.162.pp.731-739, 2013.
- 9
- 10 LIU, W.; YUAN, C.; MENG, X.; DU, Y.; GAO, R.; TANG, J. SHI, D. Frequency of virulence
11 factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. **The**
12 **Veterinary Journal**. v. 199. pp. 286-289. 2014.
- 13
- 14 MALIK, A., TÓTH, I., BEUTIN, L., SCHMIDT, H., TAMINIAU, B., DOW, M.A.,
15 MORABITO, S., OSWALD, E., MAINIL, J., NAGY, B. Serotypes and intimin types of
16 intestinal and faecal strains of eae+ *Escherichia coli* from weaned pigs. **Veterinary**
17 **Microbiology**. v.114.pp. 82–93, 2006.
- 18
- 19 MELKEBEEK V.; GODDEERIS, B. M.; COX, E. ETEC vaccination in pigs. **Veterinary**
20 **Immunology and Immunopathology**.v.152.pp. 37-42, 2013.
- 21
- 22 MOOI, F. K.; GRAAF, F.K. Molecular biology of fimbriae enterotoxigenic *Escherichia coli*.
23 **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v.118.pp.119-138. 1985.
- 24
- 25 MOON, H. W. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals.
26 **Currents Topics Microbiology Immunology**. .pp.151-147, 1990.
- 27
- 28 MOON, H.W., BUNN, T.O. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli*
29 infections in farm animals. **Vaccine** 11, pp. 213–219, 1993.
- 30
- 31 MOON, H.W.; NAGY, B.; ISAASCSON, R. E.; ORSKOV, I. Occurrence of K99 antigen on
32 *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99⁺ enterotoxigenic *E.*
33 *coli* from calves and pigs. **Infection and Immunology**. v.15n.2. pp. 614-620, 1977.
- 34
- 35 MOON, H.W., KOLHER, E. M.; SCHNEIDER, R. A., WHIPP, S. C. Prevalence of Pilus
36 Antigens, Enterotoxin Types, and Enteropathogenicity Among K88-Negative
37 Enterotoxigenic *Escherichia coli* from Neonatal Pigs. **Infection and Immunity**.
38 v.27.n.1.pp.222-230.1980.
- 39
- 40 MOON, H. W.; WHIPP, S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANNELLA, R.A.
41 Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia*
42 *coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.** v.41. pp.1340–1351. 1983.
- 43
- 44 MORÉS, N; MORENO, A. M. Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J.;
45 BARCELLO, D.E.S.N. (Eds). **Doenças dos suínos**. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial.pp.71-
46 76, 2007.
- 47
- 48 MORGAN, R. L.; ISAACSON, R. E.; MOON, H. W.; BRINTON, C. C.; TO C. C.
49 Immunization of Suckling Pigs Against Enterotoxigenic *Escherichia coli*-Induced Diarrheal

- 1 Disease by Vaccinating Dams with Purified 987 or K99 Pili: Protection Correlates with Pilus
2 Homology of Vaccine and Challenge. **Infeccion and Immunity**. v.33.n 3.pp.771-777, 1978.
3
- 4 MOSELEY, S.L.; DOUGAN, G.; SCHNEIDER, R.A.; MOON, H.W. Cloning of
5 chromosomal DNA encoding the F41 adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* and genetic
6 homology between adhesins F41 and K88. **J. Bacteriol.** v. 167.pp. 799-804, 1986.
7
- 8 NAGY B, FEKETE PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals.
9 **Veterinary Research**. v.30. pp. 259–84, 1999.
- 10 NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.** v. 11.
11 n.1. pp. 142-201, 1998.
12
- 13 OFEK, I., ZAFRIRI, D., GOLDHAR, J., EISENSTEIN, B.I. Inability of toxin inhibitors to
14 neutralize enhanced toxicity caused by bacteria adherent to tissue culture cells. **Infection and**
15 **Immunology**.v. 58.pp. 3737–3742, 1990.
16
- 17 ORSKOV, I., F. ORSKOV, W. J. SOJKA, WITTIG, W. K. Antigens K88ab (L) and K88ac
18 (L) in *E. coli*. A new O antigen: O147 and a new K antigen: K89 (B). **Acta Pathologica**
19 **Microbiologica Scandinava**. v. 62.pp. 439-447, 1964.
20
- 21 ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SOJKA, W. J.; LEACH, J. M. Simultaneous occurrence of *E.*
22 *coli* B and L antigens in strains from diseased swine. **Acta Pathologica Microbiologica**
23 **Scandinava**. v.53. pp. 404-422, 1961.
24
- 25 ORSKOV, I., ORSKOV, F., JANN, B., JANN, K. Serology, chemistry, and genetics of O and
26 K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriology reviews**. v.41.n. 3. pp. 667-710. 1977.
27
- 28 ORSKOV I, ORSKOV F, SMITH HW, SOJKA WJ. The establishment of K99, a
29 thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by
30 calf and lamb enteropathogenic strains. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**.
31 v.83.n.1.pp.31–36. 1975.
32
- 33 RIPPINGER, P., BERTSCHINGER, H.U., IMBERECHTS, H., NAGY, B., SORG, I.,
34 STAMM, M., WILD, P., WITTIG, W. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial
35 types F107, 2134P and 8813 of *Escherichiacoli* isolated from porcine postweaning diarrhoea
36 and from oedema disease. **Veterinary Microbiology**. v.45. pp. 281-295. 1995.
37
- 38 RUTTER, J.M.; JONES, G. W. Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli*
39 – a model for vaccination with a virulence determinant? **Nature**. pp. 242-531. 1973.
40
- 41 SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia
42 Rural. Suinocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária, 2013.
43
- 44 SMITH, H. W., S. HALLS. Observations by the ligated intestinal segment and oral
45 inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. **Journal**
46 **of Pathology and Bacteriology**.v. 93.n.2. pp. 499–529. 1967.
47
- 48 SELLWOOD R., GIBBONS R.A., JONES G.W., RUTTER J.M. Adhesion of
49 enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig
50 phenotypes. **Journal of Medical Microbiology**.v.8.pp. 405–411. 1975.

- 1 SILVA, C. A.; BRITO, B. G.; MORES, N.; AMARAL, A. L. fatores de riscos relacionados
2 com o desempenho de leitões lactentes em granjas de suínos na região do Norte do Paraná.
3 **Ciência Rural**. v. 28. n. 4. PP. 677-681. 1998.
- 4
- 5 SÖDERLIND, O.; MÖLLBY, R. Enterotoxins O groups, and K88 antigen in *Escherichia coli*
6 from neonatal piglets with and without diarrhea. **Infection and Immunology**.v.24. pp. 611-
7 616.1979.
- 8
- 9 SOUZA, C.; WARTH, J.F.G.; HAMANN, W.; BIESDORF, S.M. Caracterização sorológica
10 dos antígenos de superfície em cepas de *Escherichia coli* isoladas de suínos com diarreia no
11 estado do Paraná. **Archives of Veterinary Science** , v 12, n.3. p.51-55, 2007.
- 12
- 13 TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo, Atheneu. 2005.
- 14
- 15 TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic
16 *Escherichia coli*. **Emerging Infection Diseases Journal**., v.8.pp. 508-513. 2002.
- 17
- 18 USDA (2013). United States Department of Agriculture. Arquivo capturado em 5 de Janeiro
19 de 2014, disponível na internet em: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>.
- 20
- 21 VAN DEN BROECK, W.; COX, E.; GODDEERIS, B. Seroprevalence of F4 (+)
22 enterotoxigenic *Escherichia coli* in regions with different pig farm densities. **Veterinary**
23 **Microbiology**. v.69. n.3.pp.207-216.1999.
- 24
- 25 VERFAILLIE, T.; MELKEBEEK, V. SNOEK, V.; DOUTERLUNGNE, S.; COX, E.;
26 VERDONCK, F.; VANROMPAV, D.; GODDEERIS, B.; COX, E. Priming of piglets against
27 enterotoxigenic *E. coli* F4 fimbriae by immunisation with FAEG DNA. **Vaccine**. v. 22.pp.
28 1640- 1647. 2004.
- 29
- 30 VIDOTTO, M. C., LIMA, N. C. S., FRITZEN, J. T. T., FREITAS, J. C. D., VENANCIO, E.
31 J.; ONO, M. A. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with
32 diarrhea in the Paraná, South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.44.n.2.pp.515-
33 517. 2009.
- 34
- 35 VIDOTTO, M. C.; FLORIAN, E. C.T.; ONO, M. A. Prevalence of the *Paa* gene (porcine
36 attaching and effacing associated) in porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (PEPEC)
37 associated with postweaning diarrhea in south Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**.
38 v.44. n. 2, pp.515-517. 2013.
- 39
- 40 WILLS, R. W. Diarrhea in growing-finishing swine. In: Veterinary Clinicals of North
41 America: **Food Animal Practice**., v.16, n. 1, p.175-185, 2000.
- 42
- 43 WITTING, W.; KLIE, H.; GALLIEN, P.; LEHMANN, S.; TIMM, M.; TCHÄPE, H.
44 Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxin among
45 *Escherichia coli* isolated from weaned pigs. **Zentralbl Bakteriol**. v. 283. pp. 95-104. 1995.
- 46
- 47 WITTING, W; PRAGER, R.; STAMM, M.; STRECKEL, W.; TCHÄPE, H.; Expression and
48 plasmid transfer of genes coding for fimbrial antigen F107 in porcine *Escherichia coli* strains.
49 **Zentralbl Bakteriol**. v.281.pp. 130-139. 1994.
- 50

- 1 ZHU, C.; HAREL, J.; JACQUES, M.; DESAUTELS, C.; DONNENBERG, M. S.
2 BEAUDRY, M.; FAIRBROTHER, J. M. Virulence properties and attaching-effacing of
3 Escherichia coli O45 from swine post weaning diarrhea. **Infection and Immunology**. v. 62,
4 pp.4153-4159. 1994.
5
6 ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S. N. Patogenia da diarreia dos
7 suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 36.n.1.pp.81-86.2008.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

OBJETIVOS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

Objetivo Geral

Clonagem do gene *paa* para de *Escherichia coli* EPEC de suínos, e comparação da resposta imune humoral de uma vacina constituída de seis proteínas recombinantes com uma vacina comercial constituída por bacterinas.

Objetivos específicos

- 1- Clonar e expressar o gene *paa* para incluir a proteína rPaa na vacina recombinante;
- 2- Purificar as proteínas recombinantes F4, F5, F6, F18, F41 e Paa;
- 3- Imunizar matrizes suínas com a vacina recombinante e a vacina comercial;
- 4- Avaliar a resposta imune humoral das matrizes inoculadas com as vacinas de proteínas recombinantes (F4, F5, F6, F18, F41 e Paa) e vacina comercial (bacterinas F4, F5, F6, F41);
- 5- Avaliar a resposta imune humoral dos leitões nascidos das porcas imunizadas.

ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

- 1. Cloning and expression of the *Paa* gene (porcine attaching and effacing associated) in *Escherichia coli* (PEPEC) associated with postweaning diarrhea.**
- 2. Resposta imune humoral de matrizes suínas imunizadas com vacinas de proteínas recombinantes de *Escherichia coli* patogênicas**

1 Abstract

2

3 Porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (PEPEC) produces an outer membrane
4 protein (intimin) called Paa (porcine attaching and effacing associated) that is involved with
5 the pathogenesis of *E. coli* in piglets with diarrhea. The *paa* gene of a PEPEC strain isolated
6 in Paraná, Brazil was cloned by polymerase chain reaction and sequenced; its cloning into the
7 pTrcHis vector produced a *paa*-6x His fusion gene construct. This recombinant clone was
8 over-expressed in *E. coli* BL21 (DE3), and the expressed fusion protein was solubilized with
9 urea and purified with a Ni-NTA column. This method produced a relatively high yield of
10 rPaa. The deduced amino acid sequence encoded by Paa of PEPEC from Parana, Brazil
11 showed 99% homology to other PEPEC strains. In this study, overexpression of rPaa using
12 alternative induction strategies was attempted. The auto-induction protocol showed excellent
13 results for rPaa protein production with 0.4% (w/v) lactose. rPaa was recognized by serum from
14 pigs immunized with the PEPEC strain. These results suggest that rPaa could be included in
15 the development of a vaccine against swine colibacillosis.

16

17 Introduction

18

19 Non-enterotoxigenic *E. coli* strains have been associated with post-weaning diarrhea
20 (PWD) and neonatal diarrhea in swine, through adhesion to intestinal epithelial cells in a
21 characteristic attaching and effacing (A/E) pattern (Batisson et al., 2003). Porcine
22 enteropathogenic *E. coli* (PEPEC) produces an outer membrane protein (intimin), which is
23 involved in the intimate attachment of the bacteria to enterocytes and induces typical A/E
24 lesions, as observed in a pig ileal explant model (Zhu et al., 1994; Zhu et al., 1995). These
25 A/E lesions contribute to the initial phases of PEPEC pathogenicity (Batisson et al., 2003).

26 The gene in PEPEC that induces the A/E lesion was designated *paa* (porcine
27 attaching/effacing-associated) (An et al., 1999). Its sequence revealed an open reading frame
28 of 753 bp encoding a 27.6 kDa protein, which displayed significant similarities with Paa of
29 enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 strains (Batisson et al., 2003).

30 The *paa* gene is also associated with other virulence genes of enterotoxigenic *E. coli*
31 (ETEC); its conservation and expression was shown in the O149 ETEC collection, and all
32 *paa*-positive strains possess ETEC virulence genes. Paa is mostly found with enterotoxin gene
33 *estA* and autotransporter gene *sepA*, and it is carried on high molecular weight plasmids

1 (Leclerc et al. 2007). In Brazil, the *paa* gene was also found in association with genes for
2 other adhesins and toxins, and it was found in 22% of *E. coli* strains isolated from piglets
3 (Vidotto et al., 2013).

4 A/E lesions have been experimentally reproduced in newborn piglets, and both Paa
5 and Tir proteins of PEPEC were confirmed to be involved in A/E lesions in vivo (Girard et
6 al., 2005). Considering that the Paa protein is important in virulence and that a mutant strain,
7 PEPEC O45 (deltaler), which does not have toxins but does express the *paa* gene, could be
8 used as an attenuated vaccine candidate against PEPEC O45 (Hu et al., 2009), we cloned and
9 expressed the *paa* gene to include the rPaa protein in the development of a vaccine against
10 swine colibacillosis.

11

12 **Materials and methods**

13

14 *Strains, vectors, chemicals*

15

16 A *paa* positive *Escherichia coli* strain (PEPEC) was isolated from piglets with diarrhea
17 in Paraná State (Vidotto et al., 2009; 2013). *E. coli* TOP 10 was purchased from Invitrogen
18 Corporation (San Diego, CA, USA). *E. coli* host strains BL21 (DE3) from Novagen were
19 used to produce a Paa recombinant protein. Vector pTrcHisTOPO2 (Invitrogen, Carlsbad,
20 CA, USA) was used for cloning and expression studies. All chemical reagents were obtained
21 from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

22

23 *Cloning and sequence analysis of the paa gene from PEPEC*

24

25 The *paa* gene was amplified from positive PEPEC genomic DNA by PCR. The base
26 sequences for the specific oligonucleotide primers used in this study were based on PAA
27 PEPEC O45, F: 5'- TCTTCTGCTGCTTATGCTGATATC-3', and PAA PEPEC O45, R: 5'-
28 TTACCAGCCATATTTTTTGAATGC-3', annealing at nucleotides 37 to 60 and 718 to 738
29 of the *paa* gene, respectively (Vidotto et al., 2013).

30 The PCR was carried out in a total volume of 25 µl, containing 5 µl of template DNA,
31 20 pmol of each of the primers, 200 µM of dNTPs, 1x PCR buffer and 1.5 U of Taq DNA
32 polymerase (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil). The PCR conditions were as
33 follows: 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1
34 min, and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 7 min in a thermal cycler

1 (Biocycler). The amplified DNA was visualized in a 1.5% agarose gel stained with SYBR
2 Safe (Invitrogen). A 100 bp ladder (Promega, Madison, WI) was used as a standard for
3 determining the molecular mass of PCR products.

4 The PCR products were quantified and used as inserts in the pTrcHisTOPO2
5 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer instructions. Chemically
6 competent *E. coli* host strain TOP10 cells were then transformed with 3 μ l of the cloning
7 reaction. The transformant colonies were selected on plates containing 50 μ g/ml of ampicillin,
8 and the presence of the *paa* gene was confirmed by PCR. The recombinant plasmids were
9 extracted using Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc.), and the correct position of the *paa*
10 gene was confirmed by sequencing with primers pTrchis forward and *paa* reverse, utilizing a
11 BigDye Terminator commercial kit (Applied Biosystems, CA, USA). The obtained sequences
12 were analyzed using BLASTN through the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) to
13 verify the sequence identity. DNA and amino acid sequence analyses were carried out with
14 “CAP3 Contig Assembly Program”, “ClustalW (1.81) Multiple Sequence Alignments” and
15 “Six Frame Translation of Sequence” software.

16

17 *Expression of the paa gene in an E. coli strain*

18

19 Conventional IPTG induction

20

21 *E. coli* BL21 (DE3) was transformed with the recombinant plasmid pTrcHis/*paa* by
22 thermal shock. The BL21/ pTrcHis/*paa* strain was grown to an OD_{600 nm} of 0.7. IPTG
23 (isopropyl-1- β -D-thiogalactopyranoside) (Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil)
24 was then diluted to 1 mM, and aliquots were removed at different times to determine the best
25 time for expression. The cells were collected by centrifugation, and expression was
26 determined in soluble and insoluble fractions on 12% SDS-PAGE gels.

27

28 Auto-induction

29

30 To over-express the rPaa, we examined 4 *E. coli* strains DE3 (RIL, RP, pLysS and
31 Rosseta) with inducer molecules such as lactose or IPTG. The possibility of using several
32 types of media and lactose as inducers to increase the yields of the recombinant protein was
33 investigated.

1 rPaa was over-expressed under auto-induction conditions, as described by Deacon et
2 al., (2008), with slight modifications. Briefly, a seed culture of transformed
3 BL21(DE3)/pTrcHis/paa was grown O.N. (37°C) to saturation in LB medium. Aliquots of 0.1
4 mL seed culture were inoculated in Superbroth auto-induction medium (SB auto): tryptone,
5 32 (g/L); yeast extract, 20 (g/L). The compositions (g/L) of the supplementary solutions
6 added to the base media were as follows: NPSC stock: Na₂HPO₄, 71; KH₂PO₄, 68; Na₂SO₄,
7 14.2; NH₄Cl, 53.3; pH adjusted to 7.0 with NaOH; used at a final concentration of 50 ml per
8 liter medium. Glucose stock: Glucose, 25; used at a final concentration of 10- 40 ml per liter
9 medium. Glycerol stock: Glycerol, 250; used at a final concentration of 10 - 40 ml per liter
10 medium. Lactose stock: Lactose, 100; used at final concentrations of 10-40 ml per liter
11 medium and grown for 24 h, at 37°C with shaking at 250 rpm. During auto-induction,
12 expression levels were analyzed at 3 h intervals by 15% SDS-PAGE.

13 14 *Purification of rPaa*

15
16 The induced bacteria were collected by centrifugation and incubated in 50ml of buffer
17 (Tris 0.1 M, pH 7.0; EDTA 1 mM; lysozyme 1 mg/mL) for 1 h at room temperature to ensure
18 cell lysis, and the cell lysate was sonicated on ice with three 5-second pulses at high intensity.
19 Because the rPaa protein is insoluble, it was washed in buffer: Tris 0.1 M, pH 8.0, NaCl 1.5
20 M, EDTA 20 Mm and Triton X-100 2%. The protein content of the purified rPaa was
21 measured using the Bradford method and analyzed on 12% SDS-PAGE gels.

22 23 *SDS PAGE and Western blot*

24
25 Lysates were suspended in electrophoresis sample buffer (0.025 M Tris-HCl, 2% SDS,
26 15% glycerol, 2.5% 2-mercaptoethanol, pH 6.8), boiled for 5 min, and electrophoresed on
27 10% SDS-PAGE gels. The gels were either stained with Coomassie blue or used for Western
28 blots. For Western blots, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Pharmacia
29 Biotech) (Towbin; Gordon, 1984), and the membranes were blocked in blocking buffer (PBS
30 + 0.1% Tween 20 + 5% nonfat dry milk) for 1 h at room temperature with agitation. The
31 membranes were washed in PBS-T (PBS + 0.1% Tween 20) and incubated for 1 h with
32 serum. The proteins were then incubated with anti-pig stained with peroxidase (Sigma
33 Immuno Chemicals). The membranes were washed, and rPaa was detected via incubation

1 with substrate/chromogen solution. Protein molecular mass markers (Rainbow™ colored,
2 Amersham Life Science) were used as standards.

3

4 **Results**

5

6 *paa* gene isolation from a positive PEPEC genome was performed by PCR. For the
7 PCR, the primers were designed based on conserved sequences of the *paa* gene coding region
8 from some *E. coli* strains. Sequences from *E. coli* O55, PEPEC O45, and ETEC 70463 were
9 aligned using ClustalW (1.81) Multiple Sequence Alignments (data not shown). The forward
10 primer was designed from position 37 bp, and the reverse primer until the position 738 bp.
11 After *paa* ORF cloning and sequencing, the sequence was analyzed for similarity to other
12 strains using the BLASTN and BLASTP tools.

13 The analysis of the *paa* gene coding region from the PEPEC strain indicated that the
14 nucleotides showed high identity (99%) with the sequence from the other PEPEC strains.

15 When the amino acid sequence of Paa protein from the Brazilian PEPEC strain was
16 compared with other strains, 91 % similarity with PEPEC 045 (Bruant et al., 2009), 99%
17 similarity with *E. coli* 0103 and 055, and 100 % similarity with *E. coli* O157:H7 str. EC4115
18 were observed.

19 The recombinant plasmid pTrcHis/*paa* showed the *paa* gene inserted at the correct
20 position of the vector. The amount of time that was adequate for the induction of the protein
21 with IPTG was 18 h. The induced Paa protein was recovered from the pellet of the lysed
22 bacteria, as it is insoluble.

23 The auto-induction protocol had excellent results for rPaa protein production in simple
24 batch cultivations. *E. coli* BL21(DE3)-RP exhibited the highest quantity with 0.4% (w/v)
25 lactose, an induction time of 16 to 18 h, and an induction temperature of 37° C.

26 The rPaa was purified with Triton X-100 wash as a total antigen. The SDS-PAGE
27 results showed a 30 kDa rPaa, which was absent in the negative control (Figure 1A). Western
28 blotting analysis showed that the antibody reacted with the 30 kDa protein induced by IPTG
29 (Fig. 1.B).

30

31

32

1 Discussion

2
3 The association of the *paa* gene of PEPEC with other ETEC virulence genes suggests
4 its importance in the virulence of PEPEC (Leclerc et al., 2007; Vidotto et al., 2013).

5 In this study, the sequence of the Paa protein from a Brazilian PEPEC showed 99%
6 similarity with the Paa protein previously characterized from other strains in different
7 countries. Although there was 91% similarity with PEPEC 045 (Bruant et al., 2009), the
8 similarity with the *E. coli* O157:H7 strain EC4115 was 100%. Trabulsi *et al.* (2002) also
9 observed that some atypical EPEC strains are genetically closer to the EHEC strains of the
10 O157:H7 serotype than to typical EPEC. Similarly, LECLERC et al (2007) found that the
11 sequence of the Paa protein is highly conserved among ETEC strains and is very similar to
12 that of porcine EPEC and EHEC, suggesting common ancestry and recent dissemination of
13 the gene coding for this virulence factor.

14 The serogroup O45 is important among PEPEC strains, and based on its virulence
15 gene content, the O45 PEPEC strain is an atypical EPEC, LEE-positive *E. coli* lacking the
16 *stx1* and *stx2* genes (Bruant, 2009). The PEPEC O45 deletion mutant lost its toxigenicity to
17 Vero cells and was found to be safe for mice and pigs. Oral immunization can induce specific
18 immune responses in mice and pigs, and this mutant strain could be used as an attenuated
19 vaccine candidate against PEPEC O45 (Hu et al., 2009).

20 The cost and composition of culture media are critical for commercial-scale
21 production of recombinant proteins in *E. coli*. The rPaa protein was produced with the use of
22 lactose instead of IPTG for induction. Generally, the protein is expressed by recombinant
23 bacteria via induction with IPTG, which is a good inducer and commonly used in molecular
24 biology. However, it is costly and potentially toxic. Lactose is a natural substrate of the
25 bacterial enzyme that is controlled by the *lac* operon, which is natively induced. Lactose is a
26 low-cost, harmless and avirulent compound (Donovan et al., 1996, Deacon et al., 2008).

27 Additionally, a simple purification process for the recombinant protein is important
28 for commercial-scale production. The rPaa was purified with Triton X-100 wash as total antigen
29 instead of being purified with affinity chromatography in columns loaded with Ni(+2). The
30 genetic construct included an N-terminal histidine tag sequence that facilitated recovery,
31 purification, and proper refolding of the vaccine candidate by affinity chromatography;
32 however this procedure is a high-cost.

33 The results suggest that rPaa could be included in the development of a vaccine
34 against swine colibacillosis.

1 Acknowledgements

2

3 This work was supported by the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
4 Tecnológico” (CNPq).

5

6 References

7

8 An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Harel, J., 1999. Distribution of a novel locus called
9 Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv.*
10 *Exp. Med. Biol.* 473, 179-184.

11 An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Mabrouk, T., Dugourd, D., Dezfulian, H., Harel, J.,
12 2000. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing
13 *Escherichia coli* and characterization of eae, espA, espB and espD genes of PEPEC (pig
14 EPEC) strain 1390. *Microb. Pathog.* 28, 291-300.

15 Batisson, I., Guimond, M.P., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., Fairbrother, J.M.,
16 Jacques, M., Harel, J., 2003. Characterization of the novel factor paa involved in the
17 early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect.*
18 *Immun.* 71, 4516-4525.

19 Bruant, G, Zhang, Y, Garneau, P, Wong, J, Laing, C, Fairbrother, J.M., Gannon, V.P.J. and
20 Harel, J. Two distinct groups of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* strains of
21 serogroup O45 are revealed by comparative genomic hybridization and virulence gene
22 microarray. *BMC Genomics* 2009, 10:402.

23 Deacon S.E., Roach P.C.J., Postis V.L.G., Wright G.S.A., Xia X., Phillips S.E.V., Knox J. P.,
24 Henderson P. J.F., Mcpherson M. J., Baldwin S.A. Reliable scale-up of membrane
25 protein over-expression by bacterial auto-induction: From microwell plates to pilot scale
26 fermentations. *Molecular Membrane Biology*, 2008; 25(8): 588-598.

27

28 Donovan, R.S.; Robinson, C.W.; Glick, B.R. Review: Optimizing inducer and culture
29 conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J.*
30 *Industr. Microb.* 1996, 16, 145–154.

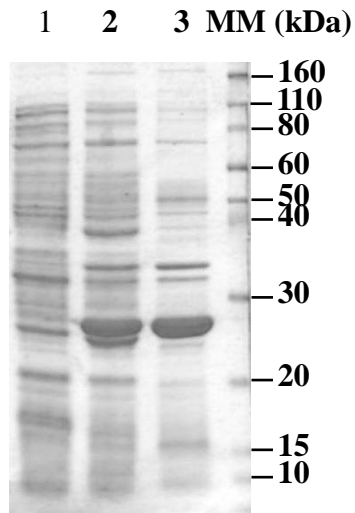
31

- 1 Girard F., [Oswald I. P.](#), [Taranu I.](#), [Hélie P.](#), [Appleyard G.D.](#), [Harel J.](#) and [Fairbrother J.M.](#)
2 Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in
3 weaned pigs . *Infect Immun.* 2005;73(9):5514-23.
- 4 [Hu Y.](#), [Song J.](#), [Zhao B.](#) Construction and immunization of an attenuated vaccine candidate
5 enteropathogenic *Escherichia coli* O45. [Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.](#) 2009
6 Feb;25(2):181-8.
- 7 Leclerc, S., Boerlin, P., Gyles, C., Dubreuil, J. D., Mourez, M., Fairbrother, J. M., Harel, J.,
8 2007. *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also
9 associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res. Microbiol.* 158, 97-104.
- 10
- 11 Trabulsi L.R, Keller R., Tardelli Gomes T.A. Typical and atypical enteropathogenic
12 *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002, 8(5):508-513.
- 13
- 14 Vidotto M.C.,Lima, N.C.S., Fritzen, T.T. J., Freitas J.C, Venâncio, E.J., Ono, M.A. 2009.
15 Frequency of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with
16 diarrhea in the North Parana State, Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 40:199-204.
- 17
- 18 Vidotto, M. C.; Florian, E. C.T.; Ono, M. A. 2013. Prevalence of the *Paa* gene (porcine
19 attaching and effacing associated) in porcine enteropathogenic *Escherichia coli*
20 (PEPEC) associated with postweaning diarrhea in south Brazil. *Brazilian Journal of*
21 *Microbiology.* 44, 2, 515-517
- 22
- 23 Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M.S., Beaudry, M., Fairbrother,
24 J.M., 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45
25 from swine postweaning diarrhea. *Infect. Immun.* 62, 4153-4159.
- 26 Zhu, C., Harel, J., Jaques, M. Fairbrother, J.M., 1995. Interaction with pig ileal explants of
27 *Escherichia coli* O45 isolated from swine with postweaning diarrhea. *Can. J. Vet. Res.*
28 59, 118-123.
- 29
- 30
- 31

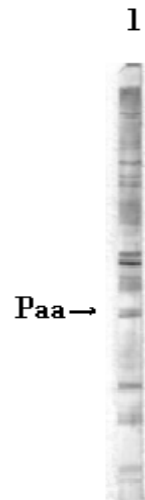
1 Figure 1. A. Expression and purification of rPaa protein from clone BL21/pTrcHis-paa. A. 12%
2 SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, BL21; lane 2, BL21/ pTrcHis-paa
3 induced with 1 mM IPTG; lane 3, Paa protein. MM = molecular mass. B. Western blotting of rPaa
4 with polyclonal serum produced against PEPEC strain.

5

A)



B)



6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11 **Resposta imune humoral de matrizes suínas vacinadas com proteínas recombinantes**
12 **(F4, F5, F6, F18, F41 e Paa) de *Escherichia coli* patogênicas**

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **Resposta imune humoral de matrizes suínas imunizadas com vacinas de proteínas**
2 **recombinantes de *Escherichia coli* patogênicas**

3

4 Daniele Araujo Pereira¹, Caio Abércio da Silva, Mario Augusto Ono², Marilda Carlos
5 Vidotto¹,

6 1 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina –
7 UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

8 2 Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL,
9 Londrina, Paraná, Brasil.

10 3 Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina,
11 Paraná, Brasil.

12

13 **Resumo**

14

15 Os distúrbios entéricos nos suínos estão relacionados com as fímbrias F4 (K88), F5
16 (K99), F6 (987P), F41 e F18. Além da ETEC, outra categoria de *E. coli* pode causar diarreia
17 nos suínos, denominada de PEPEC (*porcine pathogenic E. coli*), a qual produz a adesina Paa
18 (*Porcine attaching adherence*). A imunização das matrizes com adesinas é importante para
19 estimular a produção de anticorpos e a conseqüente transferência destes aos leitões através do
20 colostro. O presente estudo teve como objetivo avaliar uma vacina de proteínas recombinantes
21 de *Escherichia coli* patogênicas em matrizes suínas. A resposta imune das matrizes
22 imunizadas com as proteínas recombinantes (F4, F5, F6, F18, F41 e Paa) foi comparada com
23 a resposta imune de uma vacina comercial com as bacterinas de ETEC. O trabalho foi
24 realizado em uma Granja Comercial, onde foram utilizadas nove matrizes suínas prenhes
25 divididas em três grupos, G1 vacinado com as proteínas recombinantes (n=3), G2 vacinado
26 com vacina comercial (n=3) e G3 com salina tamponada estéril (PBS) (n=3). Todas as
27 matrizes foram alimentadas com ração balanceada sem antibiótico e água *ad libitum*. A vacina
28 de proteína recombinante estimulou a resposta imune humoral específica das matrizes
29 vacinadas. Houve um aumento estatisticamente significativo dos níveis de anticorpos para as
30 fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) e F18, quando comparado com o grupo controle. Para
31 a adesina rPaa, não foi obtido aumento significativo nos níveis de anticorpos. Os leitões
32 apresentaram níveis significativamente maiores de anticorpos para as fímbrias K88, K99, 987,
33 F18, F41 em relação ao grupo e controle, demonstrando assim transferência de anticorpos via

1 colostro das matrizes para os leitões. Os resultados mostram a importância da vacinação das
2 matrizes para aumentar os níveis de anticorpos anti-fimbrias e assim prevenir a diarreia.

3
4 Palavras-chave: Colibacilose, diarreia, ETEC, PEPEC, Paa recombinante.

5
6 **Abstract**

7
8 Enteric disorders in pigs are related to the fimbriae F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41 and
9 F18. In addition to the ETEC *E. coli* another category can cause diarrhea in pigs, called
10 PEPEC (porcine pathogenic *E. coli*), which produces the adhesin Paa (Porcine attaching
11 adherence). Immunization of sows with adhesins is important to stimulate the production of
12 antibodies and the subsequent transfer of these piglets through colostrum. The present study
13 aimed to evaluate a vaccine of recombinant proteins in *Escherichia coli* pathogenic in sows.
14 The immune response of sows immunized with the recombinant proteins (F4, F5, F6, F18,
15 F41 and Paa) was compared with the immune response of a commercial bacterin vaccine with
16 ETEC. This study was conducted on a commercial farm, where they were used nine pregnant
17 sows divided into three groups, G1 vaccinated with the recombinant proteins (n = 3) , G2
18 vaccinated with the commercial vaccine (n = 3) and G3 with sterile buffered saline (PBS) (n =
19 3). All sows were fed with balanced diet without antibiotics and water *ad libitum*. The
20 recombinant protein vaccine stimulated a specific humoral immune response of vaccinated
21 sows. There was a statistically significant increase in antibody levels for fimbriae F4 (K88),
22 F5 (K99), F6 (987P) and F18, compared with the control group. For rPaa adhesin was not
23 obtained significant increase in antibody levels. The piglets had significantly higher levels of
24 antibodies to fimbriae K88, K99, 987, F18, F41 compared to the control group and, thus
25 demonstrating transfer of antibodies via the colostrum of sows for piglets. The results show
26 the importance of vaccinating in sows to increase the levels of anti- fimbriae antibodies and
27 prevent diarrhea.

28
29 Keywords: Colibacilose, diarreia, ETEC, PEPEC, recombinant Paa.

30

31

1 **Introdução**

2

3 A principal causa de perdas econômicas em suínos jovens está relacionada às
4 infecções do trato intestinal. Clinicamente ocorre diarreia ou morte súbita, diminuição de
5 peso, prejuízo na conversão alimentar e refugagem. Entre os diversos patógenos que causam
6 diarreia nos leitões lactentes, a *Escherichia (E.) coli* enterotoxigênica (ETEC) pode ser
7 considerada a causa mais importante capaz de provocar doença e morte em leitões neonatos e
8 desmamados (FRANCIS, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2007).

9 A colibacilose pode apresentar uma taxa de mortalidade de 25% se medidas como a
10 prevenção e tratamento não forem adotadas (MORÉS; MORENO, 2007). A unidade suínicola
11 pode maximizar a produção na fase de maternidade se os fatores de riscos como a presença de
12 diarreia nos leitões, alta taxa de mortalidade, coeficiente de variação do peso ao desmame e o
13 ganho de peso médio diário até o desmame, não forem evitados (SILVA *et al.*, 1998).

14 As ETEC que causam diarreia em suínos possuem dois fatores de virulência
15 fundamentais, as adesinas e enterotoxinas (FAIRBROTHER *et al.*, 2005). Varias adesinas
16 fimbriais K88 (F4), K99 (F5), 987p (F6), F41 e F18 tem sido descritas em ETEC, as quais se
17 ligam aos receptores específicos dos enterócitos (FRANCIS, 2002; MORÉS; MORENO,
18 2007; VIDOTTO *et. al.* 2009). As enterotoxinas termo-estáveis ST (Sta e Stb) e termo-lábeis
19 (LT-1 e LT-2) são as responsáveis por causar desequilíbrio no sistema de absorção e secreção
20 de eletrólitos e água pelos enterócitos e posterior diarreia, desidratação e morte dos animais
21 (GYLES, 1992).

22 Outra categoria de *E. coli* que causa diarreia neonatal em suínos foi denominada de
23 PEPEC (porcine pathogenic *E. coli*), semelhante à *E. coli* que causam infecções entéricas em
24 humanos e animais através das lesões A/E (*attaching and effacing*) (AN *et al.*, 1999). A
25 caracterização fenotípica e genotípica das PEPEC mostrou que não possuem os fatores de
26 virulência de ETEC, mas apresentam sequências de nucleotídeos *paa* (“porcine attaching and
27 effacing associated gene”) associados à capacidade de produzir lesão A/E nos leitões e
28 secções de íleo de suínos (ZHU *et al.*, 1994; LECLERC *et al.*, 2007).

29 Alta frequência e várias combinações de genes virulentos, em cepas de *E. coli* isoladas
30 de leitões, no estado do Paraná, Brasil, foram encontradas, sendo que a F4 foi a adesina mais
31 prevalente (VIDOTTO *et al.*, 2009). O gene *paa* também foi encontrado em associação com
32 genes para outras adesinas e toxinas, e este gene foi encontrado em 22% das estirpes de *E.*
33 *coli* isoladas de leitões (VIDOTTO *et al.*, 2013).

1 Os prejuízos causados pela ETEC nas granjas, tem sido minimizados através de
2 programas de vacinação das matrizes antes do parto, vacinas autógenas em leitões, uso de
3 antibióticos profiláticos, (FAIRBROTHER *et al.*, 2005) e vacinação de leitões pela via
4 intranasal (LIN *et al.*, 2013). As matrizes suínas imunizadas com vacinas para Colibacilose são
5 capazes de proteger melhor seus leitões quando comparadas com matrizes não vacinadas
6 (HUR; LEE, 2012).

7 O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral de uma
8 vacina constituída de seis proteínas recombinantes em matrizes prenhes, comparando com
9 uma vacina comercial utilizada nas granjas contra ETEC.

10 **Material e Métodos**

11 *1. Obtenção das proteínas recombinantes*

12
13
14
15 Os genes que codificam as fímbrias F4, F6 e F41 foram clonados no vetor de
16 expressão pET102/D-TOPO (Invitrogen, EUA), o da fímbria F18 foi clonado em pETTEV,
17 e o gene *paa* foi clonado em pTrHisTOPO2. As proteínas recombinantes foram obtidas após a
18 indução das bactérias recombinantes *E. coli* BL21 (Star DE3), contendo os plasmídios
19 recombinantes de cada fímbria. Estas bactérias foram crescidas em meio SB (com adição de
20 lactose 0,4% e a 37°C por 18h. Após centrifugação por 20 min a 5.000 rpm, o pellet foi
21 ressuspenso em tampão (Tris 0,1M pH 7; EDTA 1Mm; Lisozima 1mg/mL). Em seguida as
22 células foram congeladas e descongeladas para serem lisadas no sonicador com três ciclos,
23 repetindo esta etapa três vezes. O pellet contendo o extrato bruto das proteínas recombinantes
24 foi centrifugado e lavado com 10 ml de tampão (Tris 0,1M pH 8,0; NaCl 1,5M; EDTA
25 20Mm) e incubado por uma hora em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em 10 ml
26 de tampão (Tris 50 Mm pH 8,0).

27 *2. Purificação das proteínas recombinantes*

28
29
30 As proteínas foram expressas e fusionadas à cauda de poli-histidina (6xHis tag) para
31 facilitar sua purificação em coluna contendo níquel ligado a resina (Qiagen Ni-NTA™), onde
32 foram purificadas em condições desnaturantes conforme orientação do fabricante (*ProBond*
33 *Purification Kit*, EUA). A coluna foi previamente preparada com lavagens com água destilada

1 e equilibrada com tampão B (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M GuHCl, pH8). O lisado
2 foi colocado na coluna e homogeneizado por 2 hora em temperatura ambiente, seguido de
3 quatro lavagens com tampão C (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M GuHCl, pH 6,4) e
4 duas lavagens com tampão D (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M GuHCl, pH 5,9).
5 Posteriormente, a primeira eluição com tampão E (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M
6 GuHCl, pH 4,5) e mais três eluições com tampão E (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris e 8 M
7 GuHCl, pH4).

8 Para avaliar o grau de pureza, foi feito um gel SDS-PAGE corado com *Comassie Blue*
9 G-250 e a quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford.

10

11 3. Preparo das vacinas

12

13 A vacina de proteínas recombinantes foi produzida com as cinco fímbrias (F4, F5, F6,
14 F18, F41) e a adesina Paa, foi constituída com 100 ug de cada proteína recombinante do
15 extrato bruto, sendo utilizado como adjuvante o Hidróxido de Alumínio 2mg/mL e
16 conservante Timerosal 0,02%, com volume final de 2 mL.

17 A vacina comercial continha as quatro fímbrias (F4, F5, F6, F41) e não possui a
18 fímbria F18 e a adesina Paa.

19

20 4. Delineamento Experimental

21

22 O trabalho foi realizado em uma granja comercial localizada no município de
23 Arapongas, estado do Paraná. Foram utilizadas nove matrizes suínas prenhes com 85 dias de
24 gestação sendo divididas em três grupos, um grupo (G1) vacinado com as proteínas
25 recombinantes (n=3), o segundo grupo (G2) vacinado com vacina comercial (n=3) e o terceiro
26 (G3) grupo inoculado com salina tamponada estéril (PBS) (n=3). Todas as matrizes foram
27 imunizadas pela via intramuscular (IM). Após o parto, foram selecionados quatro leitões de
28 cada matriz, com um total de 12 animais por grupo, sendo estes marcados com brincos. Ao
29 todo, 36 animais foram analisados quanto ao título de anticorpos anti-proteínas recombinantes
30 apresentados no soro. A primeira mamada foi assessorada e após 12 horas os leitões foram
31 pesados, para garantir que estavam saudáveis.

32

33

34

1 5. *Imunização dos animais e coleta das amostras*

2
3 O protocolo de imunização foi o mesmo já utilizado para a vacina comercial. As
4 matrizes prenhes foram imunizadas quatro e duas semanas antes da data provável do parto (85
5 e 100 dias de gestação). Foram coletadas amostras de sangue da veia jugular para avaliação
6 dos níveis de anticorpos, no dia da primeira imunização (dia 0), na segunda imunização (dia
7 14) e na data provável do parto (dia 28). As amostras foram coletadas em tubos sem
8 anticoagulante, centrifugadas e em seguida foi separado o soro para analisada através do teste
9 de ELISA.

10 Amostras de sangue dos leitões foram colhidas da veia cava cranial, no sétimo dia de
11 vida, para analisar resposta imune humoral dos anticorpos transferidos via colostro e
12 compará-los entre os grupos.

13 14 6. *Monitoramento dos animais*

15
16 Todas as matrizes foram alimentadas com ração balanceada para a fase, sem
17 antibiótico e água *ad libitum*. Foram mantidas na mesma sala de maternidade sob as mesmas
18 condições de manejo e temperatura. Os leitões foram acompanhados diariamente através da
19 observação de possíveis manifestações clínicas e incidência de diarreia durante o período
20 neonatal e duas semanas após o desmame.

21 22 7. *Ensaio imunoenzimático ELISA Indireto*

23
24 O teste ELISA foi utilizado para determinar os níveis de anticorpos de IgG total
25 específicos nos soros das matrizes imunizadas e nos soros dos leitões para as fímbrias
26 recombinantes F4, F5, F18, F41, 987 e Paa obtidos entre os três grupos.

27 As proteínas recombinantes purificadas em coluna e ressuspensas em tampão de
28 adsorção (carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6) foram usadas para sensibilizar as placas de
29 poliestireno, nas concentrações 0,5 ug/ml por 18h a 4°C. Após três lavagens com PBS-Tween
30 a 0,05%. Foi realizado o bloqueio com 150 µL de solução PBS-leite a 5% por 1h em
31 temperatura ambiente e lavada novamente com PBS-Tween a 0,05% , utilizando-se uma
32 lavadora de placa de ELISA (BioRad™ImmunoWash 8C, Franca). Em seguida, foi
33 acrescentado os soros diluídos 1:100 em PBS-Leite 1%, adsorvidos anteriormente com *E. coli*
34 com BL21, e incubado por 1h a 37 °C. Após as lavagens com PBS-Tween a 0,05%. Foi

1 acrescentado o conjugado contendo peroxidase anti-suino IgG (Sigma™) diluído 1: 10.000
2 em PBS-Leite 1% por 1h. A reação foi revelada com 100µL do substrato cromogeno (TMBZ
3 – tetrametil benzidina, Sigma™) incubada por 15 min, sendo protegida da luz. Após bloqueio
4 com 50 µL de H₂SO₄ 1N, a leitura foi feita em leitor de ELISA com filtro de 450nm
5 (BioRad™*imark Microplate Reader*, Japão).

6 O aumento da DO (Densidade Óptica) de cada teste foi calculado por meio da divisão
7 da absorvância da amostra de soro coletada após a segunda dose da vacina, pela absorvância
8 do soro pré-imune, depois foi feita uma média dos resultados por grupo.

9

10 8. *Análise estatística*

11

12 Os resultados foram considerados como dados não paramétricos e foram submetidos
13 ao Teste de *Kruskal-Wallis* para verificar se havia diferença entre as médias, quando houve
14 diferença entre elas, foi aplicado o Teste de Dunn a 6% de significância.

15 Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais OF. CIRC.
16 CEUA N° 241/2012.

17

18 **Resultados**

19

20 A Figura 1 mostra a indução e o grau de pureza das proteínas recombinantes do extrato
21 bruto utilizadas na vacina. As proteínas foram melhor induzidas com lactose do que com
22 IPTG, indutor geralmente utilizado, mas muito caro e tóxico.

23 O peso dos leitões após a primeira mamada (Tabela 1) mostram que os animais
24 estavam saudáveis após o nascimento e bem nutridos.

25 As matrizes prenhes vacinadas com as proteínas recombinantes de ETEC e PEPEC
26 apresentaram os níveis de anticorpos específicos para cada fímbria e rPaa maiores que os do
27 controle (Figura 2). Todas as matrizes suínas mostraram baixos títulos de anticorpos antes da
28 primeira vacinação. Todas as matrizes suínas do grupo controle permaneceram com os títulos
29 baixos (Figura 2). Os resultados obtidos com a resposta vacinal nas matrizes foram
30 significativos para as fimbrias F4 (p = 0,06); F5 (p = 0,03); F18 (p = 0,05); F6 (p = 0,02); mas
31 não foram significativos para fímbria F41 (p = 0,08) e rPaa (p = 0,73).

32 O aumento dos títulos de anticorpos para cada fímbria (F4, F5, F6, F18, F41) e Paa é
33 mostrado na Figura 3, comparando todos os antígenos analisados com os três grupos testados.
34 Os títulos aumentaram significativamente para a fímbria, F4, F5, F6, F18 e na vacina de

1 proteína recombinante em comparação ao grupo controle (PBS). Os animais inoculados com a
 2 vacina comercial não apresentaram diferenças significativas com nenhuma fímbria em relação
 3 ao grupo controle.

4 Os resultados obtidos com os soros dos leitões mostraram diferença significativa com
 5 as fímbrias F4 ($p = 0,06$), F5 ($p=0,05$); F6 ($p = 0,02$), F41 ($p = 0,03$); F18 ($p = 0,06$); em
 6 relação ao grupo controle, mas não foi significativa para o rPaa ($p = 0,14$), demonstrando
 7 assim a transferência de anticorpos via colostro (FIGURA 4).

8 Não foi observado diarreia nos leitões analisados; houve uma taxa de mortalidade de
 9 5,5% dos leitões, mas a causa foi o esmagamento.

10

11 Tabela 1. Peso dos leitões após mamarem 12 horas de colostro.

12

13	Grupo/Matriz	Data /Parto	Leitão 1	Leitão 2	Leitão 3	Leitão 4
14	1. PBS	16/04/12	1,450kg	1,740kg	1,750kg	1,800kg
15	2. PBS	16/04/12	1,102kg	1,040kg	1,180kg	0,920kg
16	3. PBS	16/04/12	1,672kg	1,420kg	1,675kg	1,920kg
17	1. Comercial	16/04/12	1,470kg	1,100kg	1,640kg	1,480kg
18	2. Comercial	16/04/12	1,700kg	1,845kg	1,985kg	1,475kg
19	3. Comercial	17/04/12	1,460kg	1,920kg	1,410kg	1,560kg
20	1. Proteína	17/04/12	1,590kg	1,670kg	1,500kg	1,380kg
21	2. Proteína	17/04/12	2,100kg	2,200kg	1,900kg	1,750kg
22	3. Proteína	18/04/12	1,655kg	1,785kg	1,800kg	1,620kg

23

24 **Discussão**

25

26 A imunização de matrizes suínas com fímbrias da *E. coli* (ETEC) é importante para
 27 que anticorpos específicos impeçam a adesão das fímbrias ao epitélio intestinal, como uma
 28 alternativa para impedir a colonização desta bactéria no intestino delgado (HOUSEBROUCK
 29 et al., 2004). Como a maioria das diarreias ocorrem na primeira semana de vida dos leitões, a
 30 imunidade passiva é mais importante, conseqüentemente as vacinas são realizadas em fêmeas
 31 prenhes.

32

33 Neste trabalho, a vacina composta por seis proteínas recombinantes (rK88, rK99,
 34 r987P, rF18, rF41 e rPaa) foi capaz de produzir uma resposta imune humoral maior quando
 comparada com a vacina comercial e grupo controle. O resultado foi significativo para as

1 fímbrias K88, K99, F18 e 987 no soro das matrizes e para as fímbrias K88, K99, 987, F18 e
2 F41 nos soros dos leitões.

3 Imunizações intramusculares com uma proteína de fusão FaeG-fedf-LT resultou na
4 indução de anticorpos IgA e inibiu a adesão de F4 e F18, protegendo os leitões contra os
5 sinais clínicos após infecção com ETEC F4+ (RUAN et al., 2011). Da mesma forma, neste
6 trabalho, houve uma resposta de anticorpos séricos significativa das matrizes imunizadas com
7 a vacina recombinante com epítomos múltiplos contendo F18, e altos níveis de anti F18 no
8 soro dos leitões.

9 Uma vacina produzida com os antígenos de *E. coli*: F4ab (K88ab) fímbria + F4ac
10 (K88ac) fímbria + F5 (K99) fímbria + F6 (987P) fímbria + LT toxóide como substâncias
11 ativas, foi testada em experimentos de desafio e todas as matrizes vacinadas mostraram um
12 aumento em títulos de anticorpos no soro antes do parto (RIISING et al, 2005).

13 A utilização da proteína fusionada foi uma estratégia interessante para o
14 desenvolvimento de uma vacina multivalente contra diarreia pós-desmame induzida por
15 ETEC. Osek et al., (1994) testaram oito diferentes vacinas nas matrizes, contendo diferentes
16 fímbrias e adjuvantes, obtendo melhores resultados com a vacina com K88 purificada, K99,
17 987 e enterotoxina LT. No presente estudo obtivemos melhores respostas vacinais com a
18 fímbria K88, K99, 987 e F18 nas matrizes.

19 Hur e Lee, (2012) fizeram uma avaliação comparativa de uma vacina candidata viva
20 com expressão de fímbrias ETEC e uma vacina ETEC comercial. A *E. coli* K88ab, K88ac,
21 K99, FASA e genes fímbrias F41 foram inseridos individualmente em plasmídeos para
22 expressão, que foram subsequentemente induzidas em *Salmonella* atenuada e utilizada como a
23 vacina. Da mesma forma como nossos resultados, a vacina de proteína recombinante com
24 epítomo múltiplos exibiu níveis de anticorpos significativamente maiores com relação aos
25 antígenos específicos em todas as matrizes e leitões vacinados, quando comparados com os
26 leitões do grupo controle.

27 As fímbrias 987 e K99 tem sido utilizadas nas vacinas em matrizes suínas (MORGAN
28 et al, 1978). Os leitões, após consumirem o colostro, apresentaram uma incidência menor de
29 diarreia e maior ganho de peso quando comparado com os outros grupos não vacinados, após
30 serem desafiados pela via intragástrica. Neste trabalho foi obtido um aumento dos títulos no
31 soro das matrizes e leitões para fímbria 987 e K99.

32 A presença do gene *paa* foi correlacionada com a presença de genes que codificam as
33 adesinas fimbriais F4, F5, F6, F18, F41 e as toxinas LT II, STa e STb encontrados nas
34 linhagens estudadas (VIDOTTO et al., 2009; VIDOTTO et al., 2013). Vacinas polivalentes,

1 destinadas a estimular a respostas imunes contra os fatores de virulência comuns, incluindo
2 STb, LT-I, EAST1, AIDA-I e paa, pode ser mais apropriado para a prevenção da infecção por
3 *E. coli* entérico em suínos jovens (LIU et al., 2014). Neste trabalho a proteína rPaa foi
4 acrescentada na vacina de proteína recombinante, porém os resultados não foram
5 estatisticamente significativos.

6 Os leitões podem ser protegidos eficazmente pela via lactogênica através de porcas
7 prenhes imunizadas pela via parenteral no período neonatal, mas acredita que esta proteção
8 desaparece no desmame (MELKEBEEK et al, 2013). Os resultados deste trabalho mostram a
9 importância da imunização das matrizes e consequente transferência de anticorpos para os
10 leitões no período neonato. Matrizes que tiveram altos níveis de anticorpos produzidos com a
11 vacinação conseguiram passar estes para os leitões, via colostro. Comparando os resultados
12 do teste ELISA dos leitões que receberam o colostro das matrizes imunizadas com as
13 proteínas recombinantes em relação ao grupo controle, os resultados para as fímbrias K88,
14 K99, F18 e F41 foram significativos.

15

16 **Conclusão**

17

18 A vacina de proteína recombinante estimulou a resposta imune humoral
19 específica das matrizes vacinadas. Houve um aumento estatisticamente significativo dos
20 níveis de anticorpos para as fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) e F18, quando
21 comparado com o grupo controle. Para a adesina rPaa, não foi obtido aumento significativo
22 nos níveis de anticorpos.

23 Os leitões apresentaram níveis significativamente maiores de anticorpos para as
24 fímbrias F4, F5, F6, F18, F41 em relação ao grupo controle, demonstrando assim
25 transferência de anticorpos via colostro das matrizes para os leitões.

26

27

28

29

30

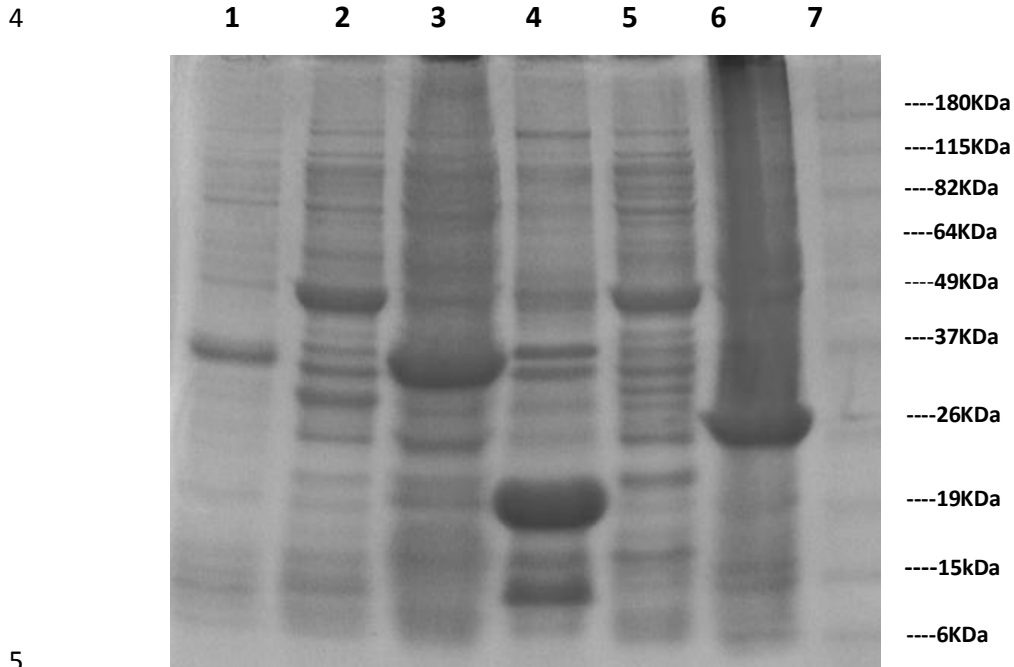
31

32

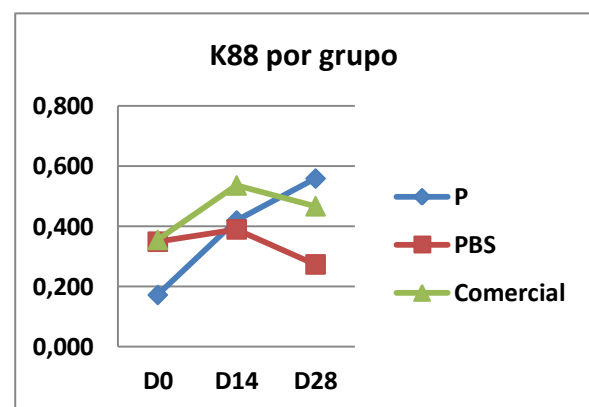
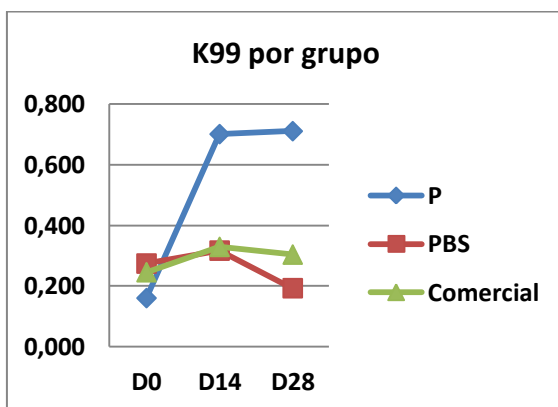
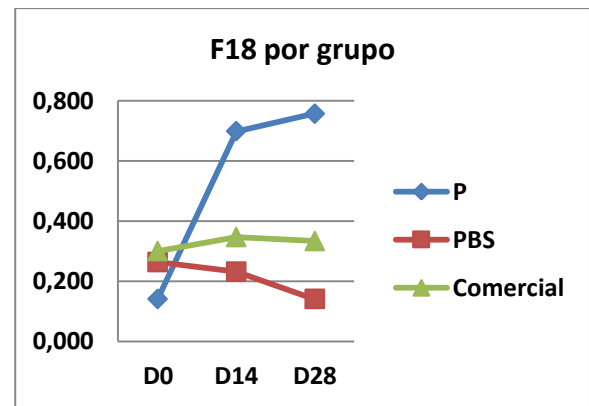
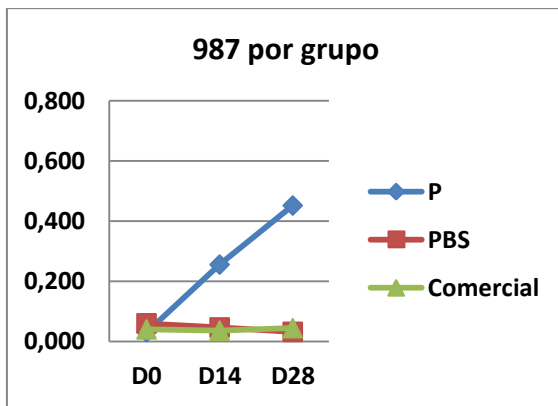
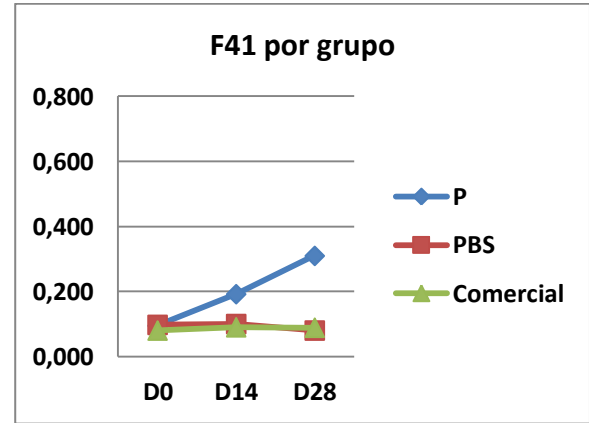
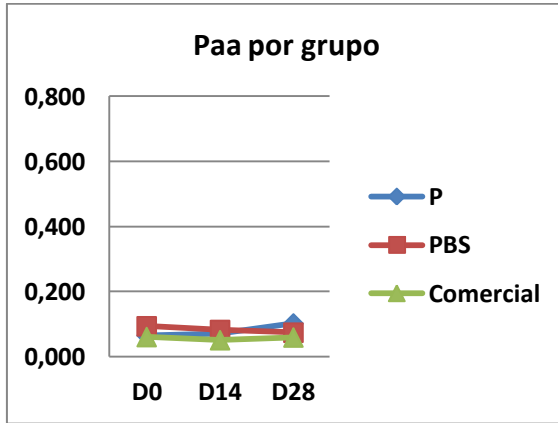
33

34

1 **Figura 1.** Gel SDS-PAGE de eletroforese do extrato bruto das proteínas recombinantes
2 fimbriais e rPaa incluídas na vacina de *E. coli*. 1- F18, 2- K88 , 3- K99, 4- 987 , 5- F41, 6-
3 rPaa, 7- P.M.



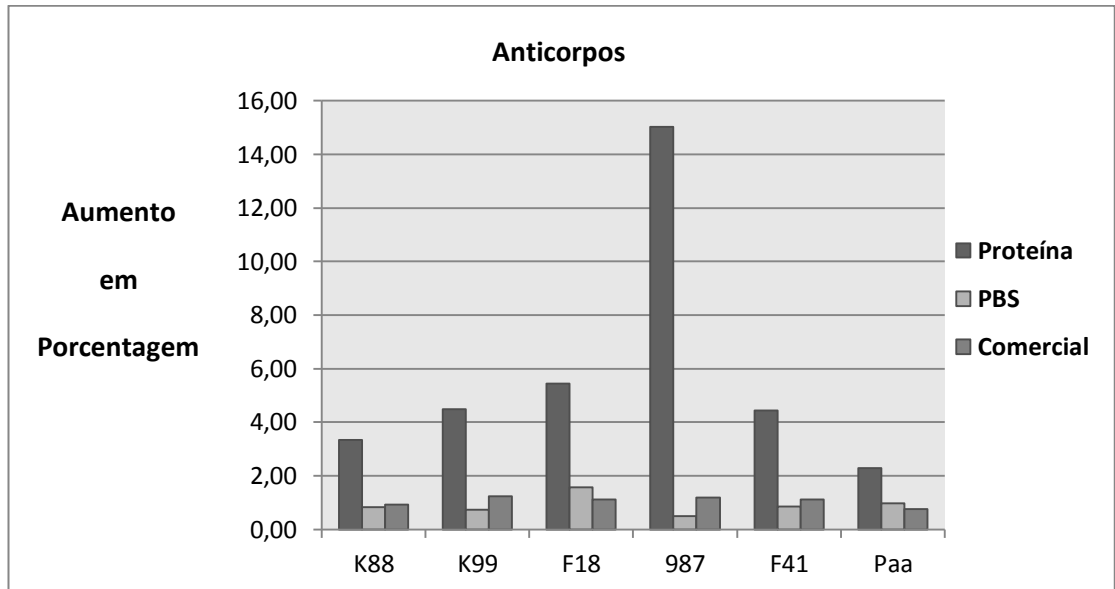
1 **Figura 2.** Resultado da DO do teste ELISA para cada fímbria e Paa dos soros das matrizes
 2 prenhes vacinadas, no dia da primeira Imunização (D=0), na segunda imunização (D=14) e na
 3 data provável do parto (D=28). P (Proteína recombinante) PBS (Solução Tamponada Estéril).
 4



9
 10
 11
 12
 13
 14

1 **Figura 3.** Divisão da DO (Densidade Óptica) da segunda imunização (D=28) em relação à
 2 pré-imunização (D=0) dos soros das matrizes, demonstrando o aumento dos níveis de
 3 anticorpos em porcentagem.

4

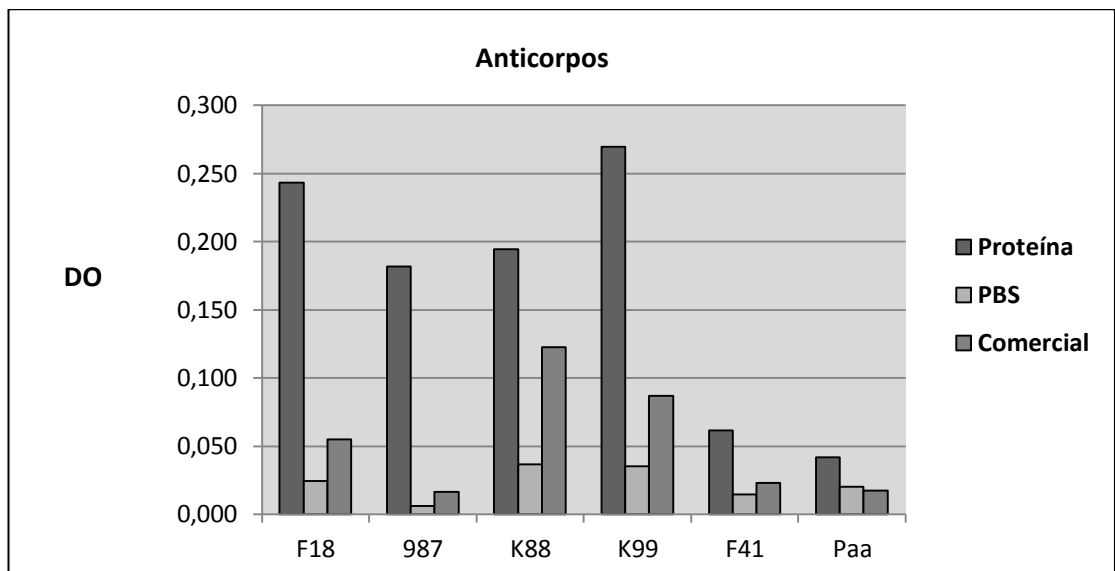


5

6

7 **Figura 4.** Resultado da DO (Densidade Óptica) do teste ELISA para cada fímbria e Paa dos
 8 soros dos leitões através da imunidade passiva.

9



10

REFERÊNCIAS

- 1
2
3 ALMEIDA, F. S.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; MALUTA, R. P. ÁVILA, F. A.
4 Diarréia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes
5 isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP,
6 v. 23, n.3, pp. 151-157, 2007.
7
8 AN, H.; FAIRBROTHER, J. M.; DESAUTELS, C.; HAREL, J. Distribution of a novel locus
9 called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*.
10 **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.473.pp.179-184, 1999.
11
12 FAIRBROTHER, J. M., NADEAU, E.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* in postweaning
13 diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal**
14 **Health Research Reviews**, v. 6. n.1 .pp. 17-39, 2005.
15
16 FRANCIS, D. H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis,
17 **Journal Swine Health and Production**, v.10, n.4.pp. 171-175, 2002.
18
19 GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of**
20 **Microbiology**. v.38.pp.734-746, 1992.
21
22 HAESEBROUCK F, PASMANS F, CHIERS K, MAES D, DUCATELLE R, DECOSTERE,
23 A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect. **Veterinary**
24 **Microbiology**. v. 100.pp.255–68.2004.
25
26 HUR, J.; LEE, J. H. Comparative evaluation of a vaccine candidate expressing
27 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesions for colibacillosis with a commercial
28 vaccine using a pig model. **Vaccine**. v.30: 3829-3833, 2012.
29
30 LECLERC, S.; BOERLIN, P.; GYLES, C. DUBREUIL, J. D.; MOUREZ, M.;
31 FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J. Paa, originally identified in attaching and effacing
32 *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. **Research in Microbiology**.
33 v.158.pp. 97-104, 2007.
34
35 LIN, J.; MATEO, K. S. ZHAO, M.; ERICKSON, A. K.; GARCIA, N.; HE, D.; MOXLEY, R.
36 A.; FRANCIS, D. H. Protection of piglets against enteric colibacillosis by intranasal
37 immunization with K88ac (F4ac) fimbriae and heat labile enterotoxin of *Escherichia*
38 *coli*. **Veterinary Microbiology**. v. 152, pp. 731-739, 2013.
39
40 LIU, W.; YUAN, C.; MENG, X.; DU, Y.; GAO, R.; TANG, J. SHI, D. Frequency of virulence
41 factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. **The**
42 **Veterinary Journal**. v. 199. pp. 286-289. 2014.
43
44 MELKEBEEK V.; GODDEERIS, B. M.; COX, E. ETEC vaccination in pigs. **Veterinary**
45 **Immunology Immunopathology**. v. 152. pp. 37-42, 2013.
46
47 MORÉS, N; MORENO, A. M. Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J.;
48 BARCELLO, D.E.S.N. (Eds). **Doenças dos suínos**. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial.pp.110-
49 114, 2007.
50

- 1 MORGAN, R. L.; ISAACSON, R. E.; MOON, H. W.; BRINTON, C. C.; TO C. C.
2 Immunization of Suckling Pigs Against Enterotoxigenic *Escherichia coli*-Induced Diarrheal
3 Disease by Vaccinating Dams with Purified 987 or K99 Pili: Protection Correlates with Pilus
4 Homology of Vaccine and Challenge. **Infeccion and Immunity**. v.33.n 3.pp.771-777, 1978.
5
- 6 OSEK, J.; TRUSZCYSKI, M.; TARASIUK, K.; PEJSAK, Z. Evaluation of different vaccines
7 to control of pig colibacillosis under large-scale farm conditions. *Comparative Immunology,*
8 *Microbiology and Infection of Diseases*. v. 18. n.1..pp. 1-8. 1995.
9
- 10 RIISING, H. J.; MURMANS, M.; WITVLIET, M. Protection against neonatal *Escherichia*
11 *coli* diarrhea in pigs by vaccination of sows with a new vaccine that contains Purified
12 Enterotoxigenic *E. coli* virulence factors F4ac, F4ab, F5 and F6 fimbrial antigens and heat-
13 labile *E. coli* enterotoxin (LT). **Journal of Veterinary Medicine Series B**. v. 52.pp. 296-
14 300, 2005.
15
- 16 RUAN, X., LIU, M., CASEY, T.A., ZHANG, W. A tripartite fusion, FaeGFedF
17 LT(192)A2:B, of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) elicits antibodies that neutralize
18 cholera toxin, inhibit adherence of K88 (F4) and F18 fimbriae, and protect pigs against
19 K88ac/heat-labile toxin infection. **Clinical Vaccine Immunology**. v.18, pp. 1593–1599,
20 2011.
21
- 22 SILVA, C. A.; BRITO, B. G.; MORES, N.; AMARAL, A. L. Fatores de riscos relacionados
23 com o desempenho de leitões lactentes em granjas de suínos na região do Norte do Paraná.
24 **Ciência Rural**. v. 28. n. 4. pp. 677-681. 1998.
25
- 26 VIDOTTO, M. C., LIMA, N. C. S., FRITZEN, J. T. T., FREITAS, J. C. D., VENANCIO, E.
27 J.; ONO, M. A. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with
28 diarrhea in the Paraná, South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.44.n.2.pp.515-
29 517. 2009.
30
- 31 VIDOTTO, M. C.; FLORIAN, E. C.T.; ONO, M. A. Prevalence of the *Paa* gene (porcine
32 attaching and effacing associated) in porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (PEPEC)
33 associated with postweaning diarrhea in south Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*.
34 v.44. n. 2, pp.515-517. 2013.
35
- 36 ZHU, C.; HAREL, J.; JACQUES, M.; DESAUTELS, C.; DONNENBERG, M. S.
37 BEAUDRY, M.; FAIRBROTHER, J. M. Virulence properties and attaching-effacing of
38 *Escherichia coli* O45 from swine post weaning diarrhea. **Infection and immunology**. v. 62,
39 pp.4153-4159, 1994.
40
41
42
43
44
45
46
47

CONCLUSÃO FINAL

- 1
2
3 **1.** A sequência da proteína Paa, clonada da amostra de PEPEC isolada no Paraná-Brasil, é
4 altamente conservada (99% de homologia) entre amostras de PEPEC e ETEC de outros
5 países e apresentou 100% de homologia com a EHECO157.
6
- 7 **2.** A Paa recombinante purificada, de 30 kDa, não induziu um aumento significativo nos
8 níveis de anticorpos para a adesina Paa nas matrizes imunizadas.
9
- 10 **3.** A vacina de proteína recombinante estimulou a resposta imune humoral específica das
11 matrizes vacinadas e houve transferência de anticorpos através do colostro para os
12 leitões.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

APÊNDICE

1. Resultados da DO (Densidade Óptica) do Elisa Indireto.

Fímbria K88

Fímbria	Grupo	D0	D14	D28	D28/D0 (Progressão)
K88	Proteína	0,257	0,525	0,701	2,733
K88	Proteína	0,117	0,253	0,190	1,631
K88	Proteína	0,139	0,479	0,785	5,647
K88	PBS	0,191	0,252	0,201	1,050
K88	PBS	0,402	0,385	0,234	0,583
K88	PBS	0,452	0,531	0,383	0,847
K88	Comercial	0,424	0,586	0,516	0,015
K88	Comercial	0,358	0,468	0,446	1,246
K88	Comercial	0,281	0,553	0,437	1,558

Fímbria K99

Fímbria	Grupo	D0	D14	D28	D28/D0 (Progressão)
K99	Proteína	0,167	0,383	0,447	2,682
K99	Proteína	0,150	0,226	0,226	1,877
K99	Proteína	0,164	1,495	1,460	8,902
K99	PBS	0,232	0,311	0,235	1,015
K99	PBS	0,316	0,347	0,154	0,488
K99	PBS	0,275	0,293	0,190	0,690
K99	Comercial	0,222	0,355	0,345	1,558
K99	Comercial	0,258	0,296	0,298	1,155
K99	Comercial	0,257	0,337	0,269	1,047

Fímbria F18

Fímbria	Grupo	D0	D14	D28	D28/D0 (Progressão)
F18	Proteína	0,108	0,327	0,562	5,199
F18	Proteína	0,161	0,316	0,409	2,537
F18	Proteína	0,152	1,455	1,301	8,587
F18	PBS	0,28	0,212	0,188	0,673
F18	PBS	0,275	0,247	0,150	0,544
F18	PBS	0,235	0,235	0,084	0,344
F18	Comercial	0,328	0,441	0,487	1,487
F18	Comercial	0,317	0,164	0,164	0,518
F18	Comercial	0,255	0,435	0,349	1,367

1 **Fímbria 987**

Fímbria	Grupo	D0	D14	D28	D28/D0 (Progressão)
987	Proteína	0,025	0,071	0,258	10,300
987	Proteína	0,032	0,169	0,262	8,317
987	Proteína	0,032	0,524	0,834	26,476
987	PBS	0,060	0,050	0,039	0,655
987	PBS	0,086	0,061	0,040	0,465
987	PBS	0,031	0,025	0,013	0,410
987	Comercial	0,041	0,040	0,030	0,720
987	Comercial	0,032	0,026	0,069	2,156
987	Comercial	0,044	0,039	0,030	0,678

2

3 **Fímbria F41**

Fímbria	Grupo	D0	D14	D28	D28/D0 (Progressão)
F41	Proteína	0,163	0,127	0,223	1,372
F41	Proteína	0,066	0,126	0,183	2,765
F41	Proteína	0,057	0,324	0,524	9,184
F41	PBS	0,106	0,090	0,081	0,759
F41	PBS	0,125	0,170	0,097	0,772
F41	PBS	0,063	0,042	0,064	1,008
F41	Comercial	0,075	0,097	0,104	1,380
F41	Comercial	0,080	0,094	0,098	1,219
F41	Comercial	0,087	0,081	0,066	0,763

4

5 **Paa**

Adesina	Grupo	D0	D14	D28	D28/D0 (Progressão)
Paa	Proteína	0,110	0,043	0,041	0,373
Paa	Proteína	0,064	0,122	0,188	2,938
Paa	Proteína	0,022	0,050	0,078	3,545
Paa	PBS	0,073	0,033	0,046	0,630
Paa	PBS	0,070	0,132	0,055	0,786
Paa	PBS	0,138	0,082	0,121	0,877
Paa	Comercial	0,046	0,036	0,020	0,435
Paa	Comercial	0,057	0,059	0,105	1,842
Paa	Comercial	0,079	0,058	0,053	0,671

6