



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JULIANA TORRES TOMAZI FRITZEN

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS IGY DE  
GALINHAS POEDEIRAS NO CONTROLE DE DIARRÉIA PÓS  
DESMAME EM LEITÕES**

---

Londrina  
2008

JULIANA TORRES TOMAZI FRITZEN

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS IGY DE  
GALINHAS POEDEIRAS NO CONTROLE DE DIARRÉIA PÓS  
DESMAME EM LEITÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina  
2008

## Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F919a Fritzen, Juliana Torres Tomazi.  
Avaliação da utilização de anticorpos IgY de galinhas poedeiras no controle de diarreia pós desmame em leitões / Juliana Torres Tomazi Fritzen. – Londrina, 2008.  
55 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2008.

1. Patologia veterinária – Teses. 2. Leitão (Suíno)- Diarreia – Teses. 3. Galinha – Imonoglobulina G – Teses. I. Ono, Mário Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 619:616.092

JULIANA TORRES TOMAZI FRITZEN

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS IGY DE GALINHAS  
POEDEIRAS NO CONTROLE DE DIARRÉIA PÓS DESMAME EM  
LEITÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Mario Augusto Ono  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara  
Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Nilo Ikuta  
Universidade Luterana do Brasil

Londrina, 16 de dezembro de 2008.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho ao meu marido Eduardo, aos meus filhos, Julia e Mateus pela paciência e aos meus pais, Zelma e Nelson pelo incentivo e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro de todos os agradecimentos é para o meu marido e companheiro, Eduardo, pela paciência e cumplicidade. Devo a ele a possibilidade de realizar esse trabalho.

Em seguida, aos meus pais, Nelson e Zelma, pelo eterno apoio as minhas decisões e por terem possibilitado meu crescimento profissional. Aproveito para agradecer a Eliana, esposa do meu pai, e ao Osvaldo, falecido marido da minha mãe pelo suporte em horas difíceis.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono, pela orientação, juntamente com Prof. Dr. Emerson José Venancio e Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto, pelos anos compartilhados para realização desse trabalho. Eles me acolheram em seus laboratórios e me ensinaram grande parte do que sei hoje.

Merecem agradecimentos, meus colegas e amigos de turma do mestrado e alunos também do doutorado pelas muitas horas de estudo e esforço.

Aos professores e funcionários, que me ajudaram com seus conhecimentos facilitando sempre o desenvolvimento dos trabalhos. Nomeando alguns e pedindo desculpas àqueles que aqui não forem citados, Pedro Sebastião Raimundo Dionísio Filho (Pedrinho), Jesus Antônio Vargas (Zui), Alexandre Yukio Saito (Teco), Nilson de Jesus Carlos, Mári Kaminami, Ana Maria Rodrigues (Aninha), Vânia Darc, Maria Angélica Watanabe, Célia Guadalupe, Renata Kobayashi (Renatinha), Irene Maria da Silva (Dona Irene), Jussevânia dos Santos, Halha Ostrensky Saridakis.

Aos amigos, do laboratório, Melina Galvão, Raquely Lenzi, Atílio Calefi, Gabriela Oliveira, Jacqueline Bueno, Priscila Yamaoka, especialmente a Tatiane Petroni, principalmente pela cumplicidade. A outros não menos amigos, Andrea Koishi, Thiago Massuda, Natália Lima, Priscila Cassolla, Alexandre Pelloso, Eliandro Tavares, Lucimila Luchesi, Amanda Pitz, Débora Vituri, Ana Angelita Sampaio, Carolina Matsui, Newton Hashimoto, Elisaine Souza e Henrique Canato.

Uma dedicatória especial para minha amiga Érica Akemi Kavati, pela ajuda na resolução de problemas profissionais e emocionais.

Acredito que esse trabalho não seria possível sem a ajuda dos funcionários da fazenda escola Pedro Dias (Seo Pedro), Mauro Inocência (Seo Mauro), José Aparecido Azevedo (Zé), Antônio Dias (Seo Antônio), Gilberto Inácio da Silva (Inácio) e Jorge Jacinto da Silva. Sem dúvida com aprovação e ajuda do Prof. Dr. Caio Abércio Silva.

Por fim, agradeço aos animais que participaram desses experimentos e todos aqueles que já me ajudaram a me tornar a profissional que sou hoje.

Pode-se vencer pela inteligência, pela habilidade ou pela sorte, mas nunca sem trabalho." **(A. Destoef)**

FRITZEN, J. T. T. **Avaliação da utilização de anticorpos IgY de galinhas poedeiras no controle de diarreia pós desmame em leitões.** 2008. 55 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, 2008.

## RESUMO

*Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é uma das principais causas de diarreia pós desmame em leitões e acarreta grandes perdas econômicas na suinocultura industrial. A utilização de alternativas para o controle dessa enfermidade vem sendo amplamente estudada. A imunoproteção com anticorpos da gema do ovo de galinhas (IgY) é uma alternativa atraente, considerando o custo de produção desses anticorpos e a substituição necessária dos antibióticos utilizados rotineiramente. O objetivo desse trabalho foi produzir anticorpos IgY anti-fímbrias de *E. coli* F4, F6 e F41 em galinhas poedeiras para a avaliação da imunoproteção na diarreia pós desmame experimental em leitões. As galinhas apresentaram uma boa resposta aos antígenos inoculados, possibilitando a purificação de anticorpos policlonais anti-F4, anti-F6 e anti-F41 em quantidades suficientes para realização dos experimentos de imunoproteção. Os animais tratados com IgY anti-F6 (grupo Y) apresentaram ganho de peso 34,07% e 30,41% superior ao grupo que recebeu somente o inóculo bacteriano (grupo B) nas pesagens do dia 11 e 18, respectivamente. Os animais do grupo Y não apresentaram diarreia no decorrer do experimento, enquanto que do grupo B 60% dos animais apresentaram diarreia. No experimento utilizando IgY anti-F4 ambos os grupos apresentaram diarreia. No grupo B 80% dos animais apresentaram diarreia, o que refletiu sobre o desenvolvimento desse grupo que perdeu 1,64% do peso na pesagem do dia 11 e somente ganhou 12,33% na pesagem seguinte. No grupo Y 20% dos animais apresentaram diarreia e esse grupo apresentou peso similar ao do início do experimento na pesagem do dia 11 e ganho de peso de 17,14% no dia 18. Em relação ao experimento utilizando IgY anti-F41 houve diferença no grupo Y o qual apresentou aumento de peso de 5,52% enquanto no grupo B houve perda de peso de 6,25%, na primeira pesagem. Na segunda pesagem o grupo Y apresentou diferença de ganho de peso de 14,88%. Nesse experimento 100% dos animais do grupo B apresentaram diarreia enquanto no grupo Y somente 37,5% dos animais apresentaram diarreia. Esses resultados indicam os anticorpos policlonais anti-fímbrias de *E. coli* produzidos em galinhas poedeiras constituem uma alternativa promissora para o controle da diarreia pós desmame em leitões.

**Palavras-chave:** Patologia veterinária. Leitão (Suíno) - Diarreia. Galinha - Imunoglobulina G - Métodos experimentais.

FRITZEN, J. T. T. **Evaluation of the using of IgY antibodies of laying hens in the control of post-weaning diarrhea in pigs.** 2008. 55 f. Thesis (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the most important causes of post-weaning diarrhea in piglets and causes economic losses in the pig industry. Alternatives methods in order to control this disease have been widely studied. Immunoprotection with antibodies from the egg yolk of hens (IgY) is an attractive alternative, taking into account the low cost of production and reduction of antibiotics use. The aim of this study was to produce IgY antibodies anti-fimbriae of *E. coli* F4, F6 and F41 in laying hens to use in immunoprotection of experimental post-weaning diarrhea in piglets. The chickens showed a good response to the recombinant antigens, allowing the purification of polyclonal antibodies anti-F4, anti-F6 and F41 in sufficient quantities for conducting the experiments of immune protection. Animals treated with anti-F6 IgY (Y group) showed weight gain of 34.07% and 30.41% higher than the group what received only the bacterial inoculum (B group) in weighing on days 11 and 18 respectively. The animals from Y group showed no diarrhea during the experiment, although 60% of the animals from B group showed diarrhea. In the experiment using anti-F4 IgY diarrhea was observed in both groups. In B group 80% of the animals were affected and showed a loss 1.64% of weight in weighing on day 11 and a gain of only 12.33% in the subsequent weighing. In Y group 20% of animals showed diarrhea and a weight similar to the beginning of the experiment at day 11 a weight gain of 17.14% on day 18. The experiment using anti-F41 IgY the Y group showed weight gain of 5.52% while in group B there was loss of weight of 6.25% in the first weighing. In the second weighing the Y group showed a weight gain of 14.88%. In this experiment 100% of the animals in B group showed diarrhea although in Y group only 37.5% of the animals were affected. These results indicate that polyclonal antibodies anti-fimbriae of *E. coli* produced in laying hens are a promising alternative to the control of post weaning diarrhea in pigs.

**Keywords:** Veterinary pathology. Pig – Diarrhea.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>DPD</b>	Diarréia pós desmame
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
<b>ELISA</b>	Ensaio de imuno-absorção ligado à enzima
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<b>g</b>	Grama
<b>GC-C</b>	Guanilato ciclase C
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato cíclica
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgY</b>	Imunoglobulina Y
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>LT</b>	Toxina termolábil
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Normal

<b>nm</b>	Nanômetro
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>ST</b>	Toxina termoestável
<b>TMBZ</b>	Tetrametil benzidina
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>V</b>	Volts
<b>xg</b>	Força gravitacional

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Valores da suinocultura brasileira em 2007.....	15
<b>Figura 2</b> - Doenças mais freqüentes nas criações de leitões .....	16
<b>Figura 3</b> - Mecanismo de ação das toxinas LT e STa de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC) .....	19
<b>Figura 4</b> - Comparação da estrutura da IgG de mamíferos e IgY de galinhas.....	24
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de ocorrência da diarreia em leitões causada por ETEC.....	26
<b>Figura 6</b> - Delineamento experimental da imunoproteção de leitões contra fimbrias F4, F6 e F41 de <i>E. coli</i> .....	33
<b>Figura 7</b> - Resposta imune humoral de galinhas poedeiras imunizadas com proteína recombinante das fimbrias F4, F6 e F41 utilizando ISCOMatrix como adjuvante.....	35
<b>Figura 8</b> - Detecção de anticorpos específicos para a fímbria F4.....	37
<b>Figura 9</b> - Análise do peso corpóreo em animais tratados e não tratados com IgY anti-F4.....	38
<b>Figura 10</b> - Análise da imunoproteção pela IgY anti-F6.....	40
<b>Figura 11</b> - Análise do efeito protetor de IgY anti-F41 .....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Produção, exportação e disponibilidade interna no Brasil.....	14
<b>Tabela 2</b> - Características das fímbrias de amostras de ETEC.....	21
<b>Tabela 3</b> - Comparação entre Imunoglobulina Y de galinhas e Imunoglobulina G de mamíferos.....	25
<b>Tabela 4</b> - Seqüência dos oligonucleotídeos para genes das fímbrias de <i>E.</i> <i>coli</i> enterotoxigênica.....	34
<b>Tabela 5</b> - Frequência das fímbrias de ETEC em diferentes lugares do mundo .....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
2.1. OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
3.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	28
3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY EM GALINHAS POEDEIRAS .....	28
3.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DAS FÍMBRIAS .....	29
3.3.1 ELISA Indireto .....	29
3.3.2 Western Blotting .....	30
3.4 PURIFICAÇÃO DA IGY .....	31
3.5 IMUNOPROTEÇÃO DE LEITÕES .....	31
3.5.1 Bactérias .....	32
3.5.2 Preparo do Inóculo Bacteriano .....	32
3.5.3 Delineamento Experimental .....	32
3.6 PCR DAS AMOSTRAS COLETADAS DOS LEITÕES .....	34
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

Na suinocultura mundial os quatro maiores produtores são a China, com 50 milhões de toneladas, a União Européia (com 25 países atuais), com 21 milhões, os EUA próximo a 10 milhões e o Brasil com 3 milhões de toneladas. Esses quatro maiores produtores mundiais de carne suína são responsáveis por cerca de 80 % da produção mundial.

O Brasil além de quarto maior produtor é o quarto maior exportador mundial de carne suína. Foram exportados 20,21% da produção total de 2007 para Rússia, Hong Kong e Ucrânia, totalizando 72,5% de toda carne suína exportada.

No Brasil o consumo *per capita* foi de 13 Kg em 2007, com previsão semelhante para 2008, ocupando o décimo quarto lugar no mundo. A tabela a seguir mostra valores de produção, exportação e disponibilidade interna da suinocultura brasileira.

**Tabela 1** - Produção, exportação e disponibilidade interna no Brasil  
(mil toneladas)

Variável	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008*
Produção	2.872	2.697	2.620	2.708	2.943	2.998	3.054
Exportação	476	491	508	625	528	606	650
Disponibilidade interna	2.396	2.206	2.112	2.083	2.415	2.392	2.403
Consumo per capita (kg)	13,8	12,6	11,9	11,6	13,3	13	12,9

\* estimativa

**Fonte:** Abipecs e Embrapa - Levantamento Sistemático da Produção e Abate de Suínos (LSPS)

De acordo com números divulgados pela Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPECS; EMBRAPA, 2007), o Brasil chegou a uma produção de 3 milhões de toneladas. O Brasil tem um plantel de 36,842 milhões de cabeças. Na figura a seguir estão os dados brasileiros da suinocultura em 2007.



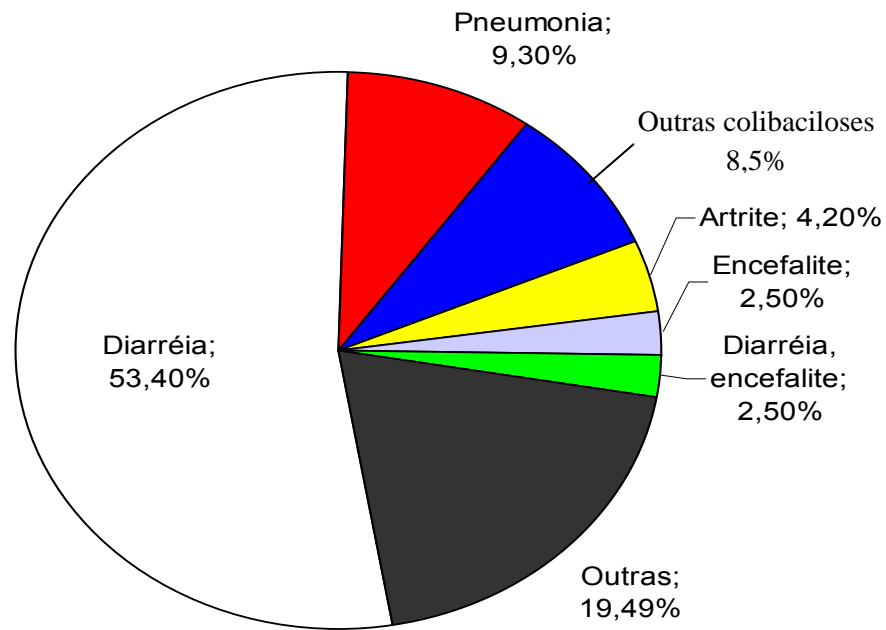
**Figura 1** - Valores da suinocultura brasileira em 2007.

**Fonte:** Abipecs e Embrapa - Levantamento Sistemático da Produção e Abate de Suínos (LSPS).

A região Sul que detém 53,07% da produção do país e apresenta melhor desempenho em qualquer um dos parâmetros de avaliação da suinocultura brasileira. O Paraná, que ocupa o terceiro lugar da região apresentou uma produção de pouco mais de 5 milhões cabeças, alojamento de 236 mil cabeças matrizes, tendo uma produtividade de 21,5 terminados/matriz/ano, peso médio de carcaça de 87 kg e produção de carne suína de 437 mil toneladas, no ano de 2007.

Esses dados demonstram a importância do rebanho suíno na economia nacional. A busca por melhorias na sanidade suína beneficia toda a cadeia produtiva, como: produção de carne, qualidade de carcaça, rendimento da carcaça, conversão alimentar entre outros parâmetros.

A sanidade suína tem importância significativa em relação ao custo das perdas no processo produtivo. Um estudo encomendado ao IPEESE (Instituto Paranaense de Pesquisas e Estudos Socioeconômicos Ltda.) em 2005, avaliando 120 propriedades, mostrou que a diarreia pós desmame é responsável por 53,4% das doenças nas criações de leitões (figura 2). Esse mesmo estudo mostrou que 51,2% dos suinocultores utilizam antibióticos para prevenção da diarreia pós desmame, utilização essa que leva a gastos excessivos, resistência bacteriana e desperdício de alternativas de tratamento.



**Figura 2** - Doenças mais freqüentes nas criações de leitões. Estudo realizado em 120 propriedades.  
**Fonte:** IPEESE, 2005.

No sistema de produção de suínos os animais são divididos em etapas conforme idade: do nascimento até no máximo 30 dias os animais permanecem na maternidade acompanhados da porca; dos 30 até 56-63 dias os animais ficam alojados na creche, onde recebem ração pré-inicial até os 42 dias e recebem ração inicial até o final dessa etapa; após os 56-63 dias os leitões vão para as salas de crescimento e terminação, onde recebem a ração de crescimento até os 50 Kg e depois ração de terminação até o abate.

Cada etapa tem seus períodos críticos pela mudança de ambiente e alimentação. Na fase de creche existem dois períodos importantes. O primeiro ocorre na chegada desses animais na creche, pois esses deixam a companhia da porca, em substituição ao leite materno passam a consumir somente ração e a mudança de ambiente e temperatura. O segundo, um pouco menos crítico que o primeiro, ocorre na mudança de ração aos 42 dias. A diarreia pós desmame ocorre principalmente na primeira etapa da fase de creche, podendo ocorrer também na segunda etapa (APCS, 2007).

A diarreia pós desmame (DPD) é uma doença multifatorial, destacando-se a *E. coli* enterotoxigênica como um importante agente infeccioso juntamente com Rotavírus e *Cryptosporidium parvum* (SILVA et al., 1999). A diarreia causada por *E. coli* enterotoxigênica é responsável por significativas perdas de leitões recém nascidos e recém desmamados, pela mortalidade que pode chegar a 10%, refugos e gastos com medicamentos (MORÉS; AMARAL, 2001).

A DPD pode acometer animais após início do consumo de ração pré-inicial, que ocorre por volta dos 10 dias de idade (SOBERTIANSKY; BARCELLOS, 2007). A idade do desmame está relacionado com a sanidade da granja, onde granjas com melhor sanidade o desmame ocorre precocemente. Idade de desmame essa que pode variar de 21 a 30 dias. A idade e o peso ao desmame tem forte influência sobre a incidência de diarreia na fase de creche (SVENSMARK et al., 1989), considerando ainda que problemas ocorridos na fase de aleitamento podem ser importantes fatores de risco para a ocorrência de diarreia pós desmame (MORÉS et al., 2000).

Outro problema é o fornecimento de ração de baixa digestibilidade que faz com que o substrato permaneça mais tempo no intestino delgado de leitões favorecendo a multiplicação da *E. coli* (SOBERTIANSKY; BARCELLOS, 2007). Levando em conta todos os danos causados pela DPD, essa é responsável por grandes perdas econômicas na suinocultura industrial. Essas perdas são devido à morte de leitões, deficiência no desenvolvimento, demora no ganho de peso, aumento da conversão alimentar e custos de manutenção, visto que um animal acometido leva mais tempo até alcançar o peso para abate.

### ***Escherichia coli* enterotoxigênica**

*E. coli* são bactérias anaeróbias facultativas, reduzem nitrato a nitrito, fermentam glicose e são oxidase-negativa e metabolizam uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas e aminoácidos, lipídios e ácidos orgânicos. Além disso, produzem catalase, utilizam glicose e amônia como fontes únicas de carbono e nitrogênio, respectivamente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

São considerados praticamente universais do trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente, embora não correspondam aos microrganismos dominantes nesses habitats. As amostras comensais podem

desempenhar um papel nutricional no trato intestinal, pela síntese de vitaminas, particularmente a vitamina K. Pela sua natureza aeróbia facultativa, auxilia no consumo de oxigênio, tornando o intestino grosso anóxico. Linhagens selvagens normalmente não apresentam exigências em relação a qualquer fator de crescimento (MADIGAN, 2004).

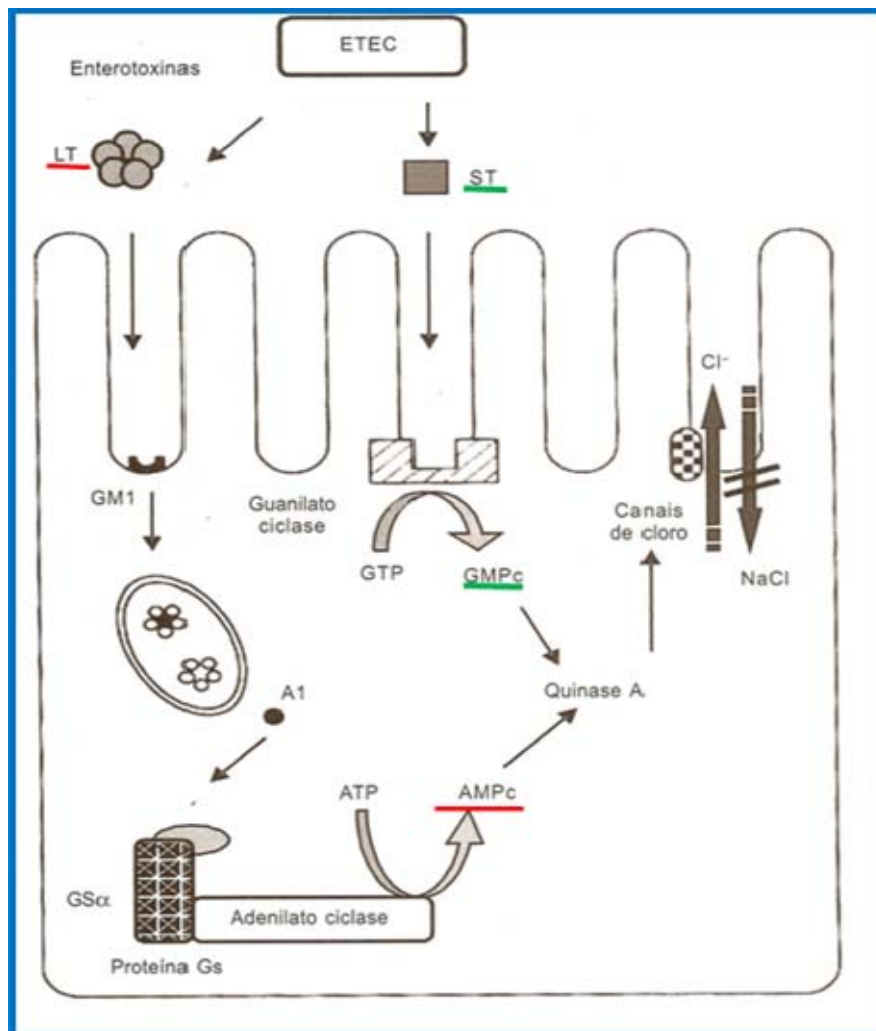
Uma das linhagens patogênicas são *Escherichia coli* diarreio gênicas, e estas são divididas em cinco grandes grupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Dentre essas, a ETEC é a principal responsável pela diarreia em leitões, tanto no período neonatal como pós-desmame.

*E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é definida por produzir pelo menos uma das duas enterotoxinas: termo estável (ST) ou termo lábil (LT) (NATARO; KAPER, 1998). Foi primeiramente reconhecida por causar diarreia em leitões e o mecanismo da doença também foi descrito em suínos, inclusive a existência de plasmídeos que codificam as toxinas. A doença ocorre pela colonização do microorganismo na superfície da mucosa do intestino delgado, onde produz suas toxinas, dando origem a um estado secretório líquido. As ETECs causam diarreia pela ação de toxinas LT e ST descrita a seguir.

O grupo da toxina LT é composto por LT-I e LT-II, que não apresentam reação imunológica cruzada. LT-I está presente em amostras humanas e animais, enquanto a LT-II é mais encontrada em amostras animais. LT-I é composta por uma subunidade A e cinco subunidades B, é internalizada pelo enterócito por endocitose. A subunidade catalítica A1 (a subunidade A é clivada em duas subunidades A1 e A2) é translocada para dentro da célula e para dentro do retículo endoplasmático. A1 cataliza a ADP-ribosilação da arginina 201 da subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_s$ . A proteína  $G_{s\alpha}$  ADP-ribosilada estimula a atividade da adenilato ciclase, mantendo permanentemente ativada, que leva a níveis intracelulares aumentados de AMPc. O AMPc é um mensageiro intracelular que regula o transporte de membrana de muitas células epiteliais intestinais e outras enzimas das células do hospedeiro, e apresenta também efeitos sobre o citoesqueleto. A ativação da quinase A dependente de AMPc resulta na fosforilação dos transportadores de membrana apicais, resultando na secreção de ânions ( $Cl^-$  diretamente e  $HCO_3^-$  indiretamente) pelas células das criptas intestinais e uma

diminuição da absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  pelas células de absorção (figura 3). AMPc também tem efeito importante nos transportadores basolaterais e nos níveis de cálcio intracelular, ambos podem aumentar a magnitude dos efeitos no transporte de fluidos e íons. A toxina LT-II apresenta duas variantes antigênicas LT-IIa e LT-IIb. LT-II aumenta o AMPc intracelular por mecanismo semelhante ao LT-I, porém não há evidência de estar associada à doença nem nos animais nem em humanos (NATARO; KAPER, 1998).

Na figura a seguir são apresentados os mecanismos de ação das toxinas LT e STa.



**Figura 3** - Mecanismo de ação das toxinas LT e STa de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).

Fonte: Trabulsi e Alterthum, 2005.

Ao contrário das grandes oligoméricas LT, as toxinas ST são pequenas e monoméricas, com múltiplos resíduos de cisteína que conferem a estabilidade térmica a essas toxinas. Existem duas classes de toxinas ST (STa e STb) que são distintas tanto pela estrutura quanto pelo mecanismo de ação. A toxina STa está presente em ETEC, mas pode ser encontrada em outras bactérias gram-negativas. Tem como receptor a guanilato ciclase C (GC-C) que está localizado na membrana apical das células epiteliais intestinais, que se liga com o ligante extracelularmente e estimula atividade enzimática intracelularmente. A ligação STa e GC-C estimula a atividade de GC levando a um aumento dos níveis intracelulares de GMPc (NATARO; KAPER, 1998). Essa atividade estimula a secreção de cloretos e/ou inibição da absorção de cloreto de sódio, resultando em secreção de fluido intestinal (figura 3).

Diferente da toxina STa, a toxina STb somente está presente em ETECs. Essa toxina causa dano ao epitélio intestinal, promovendo perda das vilosidades das células epiteliais e atrofia parcial das vilosidades. STb estimula a secreção de bicarbonato pelas células intestinais, estimula o aumento dos níveis intracelulares de cálcio por fontes extracelulares, levando assim ao quadro secretório.

### **Fímbrias**

Para causar diarreia as ETECs precisam primeiramente aderir aos enterócitos do intestino delgado, processo esse mediado por fímbrias dispostas por toda volta da bactéria podendo ser visualizadas muitas fímbrias em uma mesma bactéria. Essas fímbrias permitem que as bactérias façam adesão ao epitélio intestinal de maneira específica para a cada espécie, como por exemplo, a fímbria F5 adere em enterócitos de bezerros, ovelhas e leitões enquanto F4 é específica para leitões (NATARO; KAPER, 1998).

Fímbrias são estruturas filamentosas de natureza protéica, imunogênicas, as quais se projetam da superfície celular e reconhecem receptores específicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). ETECs isoladas de suínos apresentam cinco adesinas diferentes, todas são fímbrias: F4, F5, F6, F18 e F41 (FRANCIS, 2002). Algumas características destas fímbrias estão apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2** - Características das fímbrias de amostras de ETEC.

Fímbria	Diâmetro (nm)	Massa molecular (kDa)	Localização gene
F4	2,1	27,5	Plasmidial
F5	4,8	18,5	Plasmidial
F6	7	20	Plasmidial
F18	4.6	17	Plasmidial
F41	3,2	29,5	Cromossomal

**Fonte:** (GAASTRA; DE GRAAF, 1982) e (RIPPINGER *et al.*, 1995)

A fímbria F4, anteriormente descrita como K88, foi descoberta em 1961 (ORSKOV *et al.*, 1961). Estudos posteriores descreveram a fímbria F4 como um antígeno protéico, que bactérias positivas para F4 eram recobertas por material de aparência filamentosa e seu diâmetro era de 2.1 nm. Em 1964, foram descritas as variantes antigênicas F4ab e F4ac e somente em 1979 foi descrita a F4ad. Essa fímbria apresenta massa molecular entre 23,5 e 26 kDa dependendo da variante. A fímbria F4 é espécie específica para suínos e as características aglutinantes da variante F4ab são melhores em hemácia de galinha e é estável a temperatura ambiente. As variantes F4ab e F4ac aglutinam eritrócito de cobaio somente a temperaturas entre 0 a 3°C (GAASTRA; E DE GRAAF, 1982), e o meio de indução para essa fímbria é o ágar glicose.

A fímbria F5, anteriormente descrita como K99, foi descrita por Isaacson (1977). Essa fímbria é um antígeno com uma única subunidade, codificada por plasmídeo, com massa molecular de 18,5 kDa, ponto isoelétrico 9,7 e apresenta uma estrutura helicoidal com diâmetro de 4,8nm. Essa fímbria pode ser isolada de amostras provenientes de bovinos, ovinos e suínos e uma de suas características é de aglutinarem eritrócitos de cavalo e ovelha (GAASTRA; DE GRAAF, 1982). A produção dessa fímbria pode ser induzida em meio Minca (FRANCIS *et al.*, 1982).

A fímbria F6, anteriormente descrita como 987p, foi isolada e purificada por Fusco *et al* (1978). Essa fímbria tem massa molecular de 20kDa, diâmetro de 7nm e ponto isoelétrico 3,7 (GAASTRA; DE GRAAF, 1982). Essa fímbria não aglutina eritrócitos de mamíferos, mas se liga a receptores somente encontrado em células intestinais de suínos (ZHU *et al.*, 2005). O meio de cultura indicado para indução dessa fímbria é o ágar sangue (FRANCIS *et al.*, 1982).

A fímbria F18 foi descrita de formas diferentes por alguns grupos de pesquisadores. O centro internacional de *Escherichia e Klebsiella* (The International

*Escherichia* and *Klebsiella* Center), em Copenhagen, sugeriu que o fator de colonização 8813 e a fímbria 2134 fossem designados como F18. Esta fímbria apresenta 4,6 nm de diâmetro e massa molecular de aproximadamente 15 kDa. Descreveram que as fímbrias F107 e 2134P e fator de colonização 8813 eram antigenicamente relacionados e propuseram duas variantes sorológicas distintas para F18: fímbria F18 ab, para F107 e F18 ac, para 2134P e 8813 (RIPPINGER et al., 1995). A fímbria da amostra O141 de Kennan foi incluída no grupo F18 ac por Imberechts et al (1994) e a amostra AV24 também é descrita com pertencente ao grupo F18 ac (DEAN-NYSTROM et al., 1997). Até o momento não foi descrito um meio específico para indução dessa fímbria.

A fímbria F41 foi purificada e caracterizada por De Graaf e Roorda (1982), descrita como estrutura filamentosa composta por subunidades protéicas com massa molecular de 29,5kDa. A F41 tem um diâmetro de 3,2nm e é ligeiramente mais fino que a F5 e apresenta uma limitada homologia com esta (GAASTRA; DE GRAAF, 1982). Esta é a única fímbria que tem a localização de seus genes no cromossomo, sendo as demais plasmidiais (NAGY; FEKETE, 1999). Amostras podem ser isoladas de bovinos e suínos e tem capacidade de aglutinar eritrócitos de humanos, cobaio, cavalo e ovelha (GAASTRA; DE GRAAF, 1982). A produção dessa fímbria pode ser induzida em meio Minca como a fímbria F5.

As principais fímbrias encontradas em ETECs relacionadas com DPD de leitões são F4 e F18 (FAIRBROTHER et al., 2005; ZHANG et al., 2007). As fímbrias F41, F5 e F6 estão mais relacionadas com diarreia neonatal, porém não é surpresa que essas fímbrias estejam presentes no desmame, pois este vem ocorrendo cada vez mais cedo com o decorrer dos anos.

Existem hoje algumas formas de minimizar, ou evitar, o dano causado pela ETEC nos período neonatal e pós desmame. Rotineiramente são utilizadas técnicas como a vacinação das porcas antes do parto, vacinas autógenas em leitões, utilização de antibióticos de forma profilática e/ou como promotores de crescimento em granjas de suínos. Porém novas alternativas estão sendo estudadas, como por exemplo, a seleção de animais que não apresentam genes de codificam receptores para as fímbrias, imunização ativa (vacinação intramuscular com fímbrias, imunização oral com cepas atenuadas ou avirulentas que contenham fímbrias), imunização passiva (administração oral de imunoglobulinas da gema de

ovos (IgY) contra fímbricas, administração de proteínas do plasma em pó), probióticos bacterianos (*Rhizobium* e *Bacillus*) e bacteriófagos (FAIRBROTHER et al., 2005).

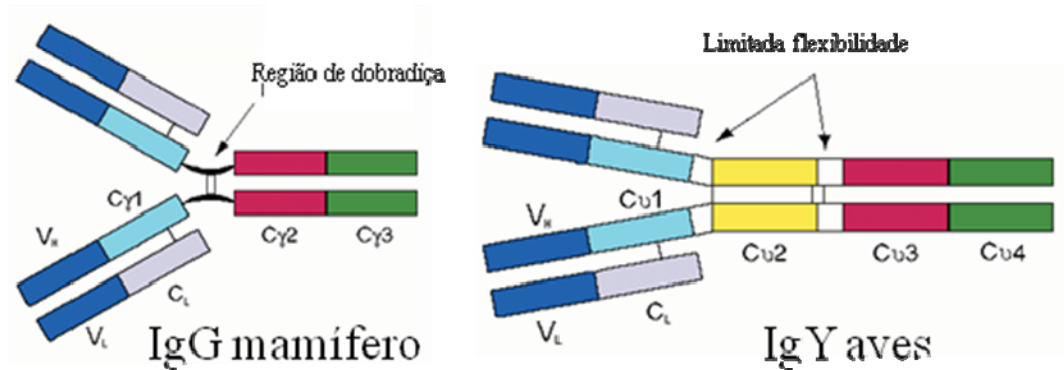
### **IgY: aspectos gerais**

A utilização de IgY no diagnóstico e tratamento vem crescendo, tanto na medicina humana como veterinária. A disponibilidade de produtos comerciais como kits de purificação de IgY, padrões de IgY e anticorpos marcados com fosfatase alcalina, fluoresceína e peroxidase (SCHADE et al., 2005) têm propiciado o crescimento da utilização de IgY no diagnóstico e tratamento tanto na medicina humana quanto na veterinária. Além disso, a utilização de galinhas para produção de anticorpos é uma alternativa apropriada já que a utilização de mamíferos está associado com problemas éticos (Bollen et al., 1996) e a obtenção de anticorpos da gema do ovo (IgY) apresenta várias vantagens em relação ao método de obtenção de anticorpos em mamíferos.

Uma dessas vantagens é a possibilidade de obter um ovo por dia com elevada concentração de anticorpos da gema do ovo, dispensando desta forma a sangria de mamíferos para obtenção de grandes quantidades de anticorpos (DE MEULENAER et al., 2002; LEVESQUE et al., 2007). Além disso, a quantidade de IgY purificada é maior que a IgG produzida em coelho (GASSMANN et al., 1990; BOLLEN et al., 1996). Outra vantagem é a maior imunogenicidade de antígenos de mamíferos quando inoculados em frangos, devido a fatores filogenéticos que influem diretamente na imunogenicidade (GASSMANN et al., 1990; NARAT, 2003). A molécula de IgY é a única classe de imunoglobulina encontrada em quantidades significativas na gema do ovo (BOLLEN et al., 1996), propiciando facilidade e rapidez da purificação dos anticorpos (CAMENISCH et al., 1999).

A molécula de IgY quando comparada com IgG apresenta algumas diferenças. Ela é considerada como equivalente funcional da IgG em aves, porém as seqüências do DNA que codificam a IgY são mais similares àqueles genes da IgE de mamíferos do que da IgG (WARR et al., 1995). A massa molecular das duas imunoglobulinas são distintas, 167,25 kDa e 165 kDa, IgY e IgG respectivamente (SCHADE et al., 2005). A IgY apresenta quatro domínios constante da cadeia pesada enquanto a IgG apresenta três. Existe discreta homologia entre o terceiro e quarto domínio da cadeia pesada da IgY com o segundo e o terceiro da IgG. Acredita-se que o segundo domínio da cadeia pesada da IgY represente a região de

dobração da IgG, sendo essa região menos desenvolvida na IgY como demonstrado na figura 4.



**Figura 4** - Comparação da estrutura da IgG de mamíferos e IgY de galinhas.  
**Fonte:** Adaptado de Narat (2003)

O custo baixo de manutenção de galinhas para experimentação (Narat, 2003; Schade *et al.*, 2005) e a manutenção de ovos a 4°C por até um ano, são aspectos benéficos a serem considerados. Além disso, a IgY pode ser produzida e coletada diariamente por mais de dois anos do mesmo animal em condições de imunização com intervalos regulares. Devido à compartimentação natural dos ovos, a IgY é facilmente separada das imunoglobulinas A e M, pois essas estão presentes na clara do ovo (Krief *et al.*, 2002). A seguir, na tabela 3 são apresentadas as principais diferenças entre as imunoglobulinas Y e G.

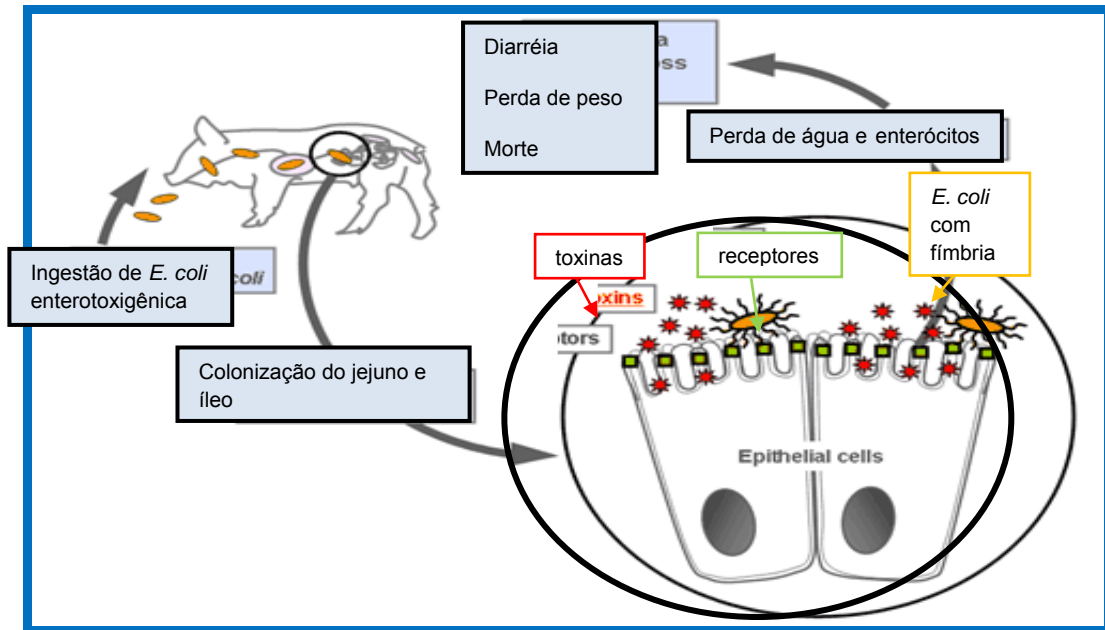
**Tabela 3** - Comparação entre Imunoglobulina Y de galinhas e Imunoglobulina G de mamíferos.

	IgY	IgG
Domínio constantes da cadeia pesada	4	3
Massa molecular da Ig	167,25KDa	165 kDa
Flexibilidade da Ig (região dobradiça)	Menor	Maior
Cadeias de carboidratos	2	1
Concentração	100-200mg/ovo	200mg/sangria (40ml de sangue)
Quantidade de Ig/mês	~3000mg*	200mg
Anticorpos específicos	2-10%**	~5%***
Estabilidade pH ácido	menor	maior
Ligação a proteína A e proteína G	não	sim
Interferência com IgG mamífero	não	sim
Interferência com fator reumatóide	não	sim
Ativação do complemento mamífero	não	sim

**Fonte:** Adaptado de (SCHADE et al., 2005) e (SCHADE et al., 1997).\*- Considerando média de 150 mg por ovo e 20 ovos em um mês.\*\*- aproximadamente 10 mg.\*\*\*- entre 22.4–112 mg (NARAT, 2003)

Os anticorpos IgY são uma alternativa promissora para utilização em imunoterapia e imunodiagnóstico (ERHARD et al., 2000). A base da administração oral de IgY é atribuída pela interferência na adesão da bactéria ou neutralização de toxinas produzidas pelas bactérias (AKITA; NAKAI, 1993). Vários estudos demonstraram que a utilização de imunoglobulina Y apresenta resultados promissores na prevenção de diarreia pós desmame (IMBERECHTS et al., 1997; YOKOYAMA et al., 1997; MARQUARDT et al., 1999; OWUSU-ASIEDU et al., 2003).

A figura 5 apresenta um esquema do mecanismo de ação das ETECs de suínos, onde se busca interferir para minimizar os danos causados por essas bactérias.



**Figura 5** - Mecanismo de ocorrência da diarreia em leitões causada por ETEC.  
**Fonte:** [www.ecl-lab.com/en/ecoli/pathogenesis.asp](http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/pathogenesis.asp) acessado em 18/09/08.

Esse mecanismo consiste na ingestão da *E. coli* enterotoxigênica – cepa capaz de induzir doença na espécie – colonização do intestino delgado através da adesão das fímbrias ao epitélio e a diarreia é desencadeada pela ação das toxinas. O desequilíbrio hidroeletrólítico causado leva à diarreia, desidratação, perda de peso e até a morte. Danos esses responsáveis pelas perdas econômicas na suinocultura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de Imunoglobulina Y no controle de diarreia pós desmame experimental em leitões por *E. coli*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a produção de anticorpos IgY em galinhas poedeiras imunizadas com proteína recombinante das fímbrias F4, F6 e F41 de *E. coli* enteropatogênica para suínos.

Avaliar a especificidade dos anticorpos da classe IgY para as proteínas recombinantes e nativas de fímbrias F4, F6 e F41 de *E. coli* enteropatogênica para suínos.

Avaliar a capacidade de imunoproteção através da administração oral de IgY em leitões recém desmamados com diarreia induzida experimentalmente por *E. coli*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

As proteínas recombinantes foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL. As fímbrias F4, F6 e F41 foram clonadas em pET102/D-TOPO (Invitrogen, EUA), as proteínas foram induzidas em *E. coli* BL21 Star DE3 com a adição de 1mM de IPTG e purificadas em coluna de resina de agarose-níquel, em condições desnaturantes, conforme orientação do fabricante (*ProBond* Purification Kit, Invitrogen, EUA). Em seguida, o grau de pureza foi avaliado em gel SDS-PAGE corado com comassie blue G-250 e a quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford.

#### 3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGY EM GALINHAS POEDEIRAS

Para a produção de anticorpos IgY em galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) foram utilizados animais com 23 semanas de vida. Todos os animais foram imunizados com três doses iniciais e doses de reforço a cada quatro semanas. Todas as doses foram de 50 µg de proteína recombinante utilizando ISCOMatrix como adjuvante.

ISCOMatrix é um adjuvante composto por Fosfatidilcolina, colesterol e Quil A. Foram dissolvidos em clorofórmio, 100 mg de fosfatidilcolina e 50 mg de colesterol. Após a evaporação do clorofórmio, o filme formado foi ressuspensionado em 3 ml de tampão Tris 140 mM com 100 mg Quil A. Posteriormente a solução foi liofilizada e ressuspensionada em 30 ml de água, solução essa pronta para uso. Para as imunizações foi utilizado a relação de 1 volume de ISCOMatrix para 1 volume de proteína recombinante.

Foram imunizadas três galinhas por fímbria. As doses foram administradas por via intramuscular no peito em pelo menos dois pontos. Ração

comercial e água foram fornecidos *ad libitum*. Os ovos foram coletados diariamente, identificados e mantidos a 4°C até sua avaliação e processamento. As aves foram mantidas no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, PR. Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEA/UEL) com o número 19/2008.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DAS FÍMBRIAS

A avaliação da especificidade da IgY contra cada uma das fímbrias foi realizada pelas técnicas de ELISA indireto e Western Blotting.

#### 3.3.1 ELISA Indireto

Para essa análise foram selecionados um ovo a cada sete dias. As gemas foram separadas da clara e da membrana da gema e diluídas 1:1000 para a avaliação. Os valores de densidade ótica encontrados foram extrapolados para o intervalo entre amostras.

Inicialmente foram sensibilizadas placas de poliestireno com 96 orifícios de fundo chato com 170 ng/poço da proteína recombinante de cada fímbria em tampão carbonato bicarbonato de sódio por 18 horas a 4°C.

Após o período de incubação a placa foi lavada três vezes com solução PBS-Tween a 0,05%. Em seguida, foram adicionados 150 µL de solução PBS-Leite a 5% em cada orifício. Após a solução de PBS-Leite foi descartada e a placa foi lavada novamente três vezes com PBS-Tween a 0,05%. Logo após, foram acrescentados em cada orifício 100 µL da gema diluída 1:1000 em solução de PBS-Leite a 1%. As amostras de gema foram mantidas por 1 hora a temperatura ambiente.

A seguir, a placa foi lavada com PBS-Tween 0,05% e 100µL de anti-IgY peroxidase diluída 1:40000 em PBS-Leite a 1% foram adicionados em cada orifício. Após 1 hora a temperatura ambiente, a placa foi lavada com PBS-Tween 0,05% e 100 µL do substrato (TMBZ - tetrametil benzidina) foram acrescentados em cada orifício. A placa foi incubada por 15 minutos em local protegido de luz, e em seguida a reação foi bloqueada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1N e a leitura da densidade ótica foi realizada em aparelho multiskan a 450 nm.

### 3.3.2 Western Blotting

Para o Western Blotting, inicialmente as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) e a seguir transferidas para membrana de nitrocelulose, a uma voltagem de 30V a temperatura de 4°C por 18 horas. A membrana foi corada com Ponceau 0,1% para verificar a eficácia da transferência. Essa membrana foi incubada com solução PBS-Leite a 5% por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação.

Em seguida, a membrana foi lavada cinco vezes de cinco minutos com PBS-Tween 0,05% e incubada por mais uma hora com a IgY purificada diluída 1:250 em solução de PBS-Leite a 1%, sob agitação.

Após cinco lavagens de cinco minutos com PBS-Tween 0,05%, os anticorpos anti-IgY peroxidase diluídos 1:20000 em PBS-Leite a 1% foram adicionados a membrana que foi incubada por mais 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação.

A seguir a membrana foi lavada cinco lavagens com PBS-Tween 0,05% e o substrato (DAB - Diaminobenzidina) foi adicionado, por 15 minutos, sob agitação. A reação foi bloqueada pela substituição do substrato por água destilada.

A IgY purificada utilizada foi adsorvida duas vezes com E. coli BL21 Star (DE3). A bactéria foi crescida em LB caldo por 18 horas a 37°C, após foi centrifugado a 3000 xg por 5 minutos. A IgY purificada foi adicionada em volume igual ao de sedimento de bactéria. Mantido em rotação orbital por 12 horas cada adsorção.

### 3.4 PURIFICAÇÃO DA IGY

As gemas foram selecionadas pela técnica de ELISA, onde todas as amostras que apresentaram densidade ótica superior a  $DO_{450nm}$  0,8 foram encaminhadas para a purificação. A avaliação das gemas foi realizada a cada sete dias, portanto a extração da IgY do intervalo entre cada amostra foi feito considerando o resultado linear entre elas.

A técnica da purificação foi realizada separando as gemas da clara e da membrana da gema. O peso foi convertido na relação 1:1 em ml (exemplo 1g = 1ml). A gema foi diluída em três vezes seu volume em Polietilenoglicol (PEG) 4,66% o qual foi adicionado vagorosamente. Em seguida foi incubado por 5 minutos sob agitação e centrifugado 10.000 xg por 15 minutos à 4°C.

O sobrenadante foi filtrado em gaze e diluído (3:1) com PEG 48%. Após foi incubado por cinco minutos, sob agitação e centrifugado a 10.000 xg por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 2 ml de PBS estéril por gema.

A quantificação de proteína do purificado pelo método de Bradford. A avaliação da pureza da IgY por gel SDS-PAGE 10%, corado com comassie blue, amostras de IgY adicionadas ou não de  $\beta$ -mercaptoetanol.

As amostras de anticorpos IgY obtidas após a purificação apresentaram rendimento médio 50 mg por ovo. Sendo assim, para realização de um experimento de imunoproteção são necessários aproximadamente 8 ovos/leitão. Nos experimentos realizados foram utilizados 10 leitões, portanto foram necessários processar 80 ovos para obtenção dos 400 mg de IgY para cada leitão do experimento.

### 3.5 IMUNOPROTEÇÃO DE LEITÕES

Experimentos aprovados pelo CEEA/Uel com o número 19/2008.

### 3.5.1 Bactérias

Cada um dos experimentos foi realizado utilizando uma bactéria distinta. No primeiro foi utilizada amostra F4ab, portadora do gene para a fímbria F4 e para a toxina LT. No segundo foi utilizada a amostra S33 é portadora do gene para a fímbria F6, adesina não fimbrial paa e toxina Sta e no terceiro a amostra F41, portadoras do gene para a fímbria F41 e para as toxinas Sta e LT.

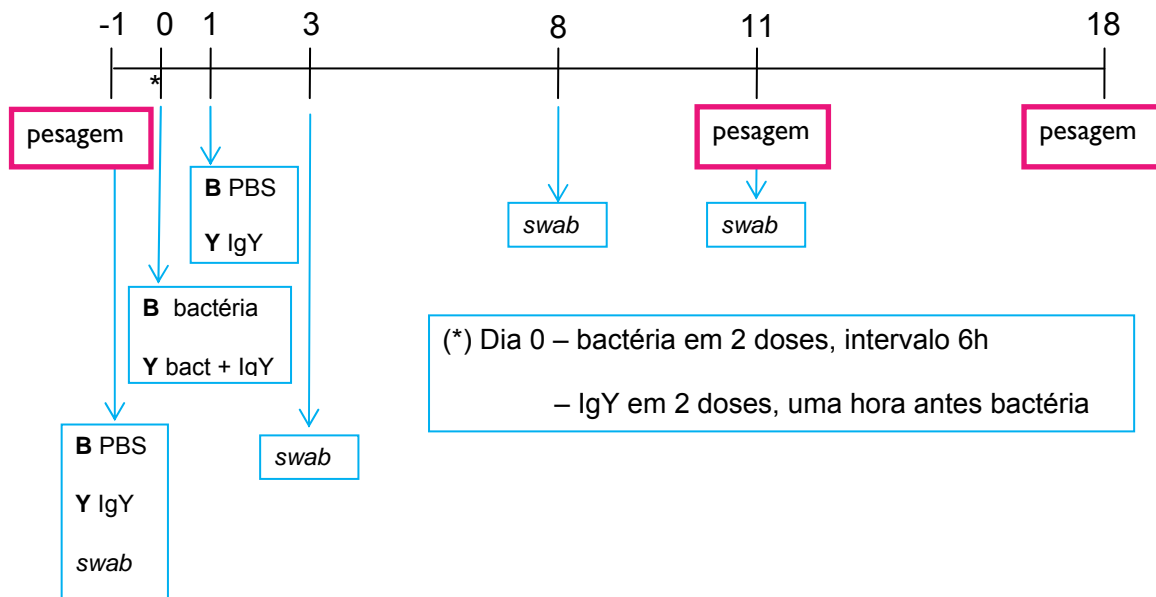
### 3.5.2 Preparo do Inóculo Bacteriano

As bactérias foram cultivadas em meio TSB por 18 horas, cada uma independentemente. Foram utilizados 60 ml de cultura para cada leitão, o qual foi centrifugado a 3.000 xg por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 6 ml de PBS estéril e administrado em cada um dos leitões.

As bactérias apresentaram crescimento em 18 horas de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Portanto, a quantidade administrada foi de  $6 \times 10^{10}$  UFC/dose/leitão, após padronização de dose necessária para a ocorrência da doença conforme acontece naturalmente.

### 3.5.3 Delineamento Experimental

Os leitões recém desmamados, com 21 dias de idade, de ambos os sexos, foram divididos em dois grupos, grupo B e Y. Os animais foram pesados logo após o desmame, identificados individualmente e divididos conforme seus pesos, para que os grupos apresentassem peso médio semelhante. O delineamento experimental está demonstrado na figura a seguir.



**Figura 6** - Delineamento experimental da imunoproteção de leitões contra fimbrias F4, F6 e F41 de *E. coli*. Os animais do grupo B (**B**) e Y (**Y**) receberam bactéria no dia 0. Nos dias -1 e 1 os animais do grupo Y receberam IgY nos dias -1, 0 e 1. Os animais foram pesados nos dias -1, 11 e 18. Foi coletado amostras de fezes em swab anal nos dias -1, 3, 8 e 11, e nos dias que os animais apresentassem diarreia.

O grupo B recebeu o inóculo bacteriano no dia 0 em duas doses a cada 6 horas e PBS enquanto o grupo Y recebeu IgY. O grupo Y recebeu a mesma dose de inóculo bacteriano e IgY em quatro doses de 100 mg cada, divididos nos dias -1, 0 e 1 após inoculação, e no dia 0 os animais receberam duas doses após a inoculação da bactéria. As inoculações foram feitas por via oral com a utilização de pistola dosadora.

Os leitões foram pesados no primeiro dia de experimento e nos dias 11 e 18 após a inoculação com bactéria. Foram feitas coletas com *swab* anal nos dias 0, 3 e 11 em todos os animais e nos animais que apresentaram diarreia nos outros dias de experimento. A avaliação da diarreia nos leitões era realizada uma vez ao dia observando o traseiro dos animais, quando os leitões apresentavam diarreia o traseiro apresentava-se sujo de fezes e muitas vezes molhado pela diarreia aquosa presente.

Os *swabs* coletados foram semeados em ágar Mac Conkey e cinco colônias de cada amostra foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) caldo para extração de DNA pela técnica de fervura. Essas amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR).

### 3.6 PCR DAS AMOSTRAS COLETADAS DOS LEITÕES

Cinco colônias de cada amostra coletada foram utilizadas para a PCR. Foram feitas reações de 25 µl, 2 µl de cada DNA (totalizando 10 µl de DNA molde), 0,25 µl de *Taq* DNA Polimerase (1,25U), 12,5 µl de MIX PCR 2x (100 µl de MgCl<sub>2</sub> – 50mg/ml –concentração final 2,5mM, 200 µl Tampão 10X, 4 µl de cada DNTPs - 100 µM e água ultra pura q.s.p. 1ml), 1 µl de cada um dos oligonucleotídeos (20 pmol – forward/F e reverse/R). As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados estão mostradas na tabela 4.

**Tabela 4** - Seqüência dos oligonucleotídeos para genes das fímbrias de *E. coli* enterotoxigênica.

Seqüência dos oligonucleotídeos	pb	Referência
F4: F: 5' – GAA TCT GTC CGA GAA TAT CA - 3' R:5' – GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG – 3'	499	(Boerlin <i>et al.</i> , 2005)
F6: F: 5' – GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC – 3' R: 5' – AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC –3'	409	(Boerlin <i>et al.</i> , 2005)
F41: F: 5' – AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG – 3' R: 5' – CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC – 3'	612	(Ojeniyi <i>et al.</i> , 1994)

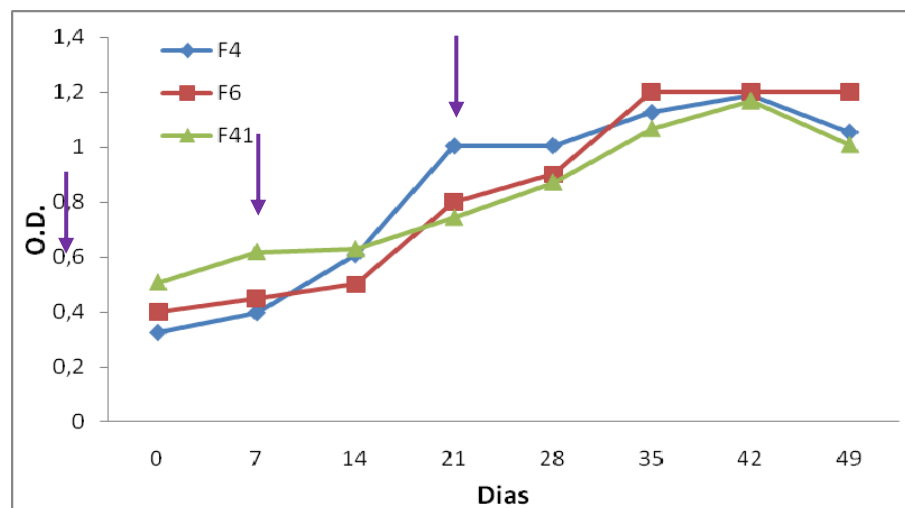
O programa utilizado foi 94°C por 5 minutos, depois 30 ciclos 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguido de 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados foram utilizados os testes ANOVA one-way, seguido de Tukey. Foram consideradas significativamente diferentes resultados com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunização de galinhas poedeiras para obtenção de anticorpos policlonais vem sendo utilizada de maneira crescente, principalmente pelas vantagens que apresenta quando comparada com a produção de anticorpos em mamíferos. Nesse trabalho o nível de produção de anticorpos IgY em galinhas imunizadas com as proteínas recombinantes foi semelhante independente da proteína recombinante utilizada. Os resultados obtidos mostram um aumento discreto dos níveis de anticorpos IgY após a primeira imunização até o décimo quarto dia. Após esse período um grande aumento nos níveis de anticorpos foi observado até o trigésimo quinto dia, quando os níveis se estabilizam. O tempo que a resposta permanece estável é bastante variável, tanto pela proteína recombinante inoculada quanto por fatores individuais das galinhas. A figura 7 apresenta a resposta de galinhas às diferentes proteínas inoculadas após três semanas da terceira imunização, porém a resposta manteve-se alta por mais de um ano devido aos reforços realizados a cada 4 semanas.

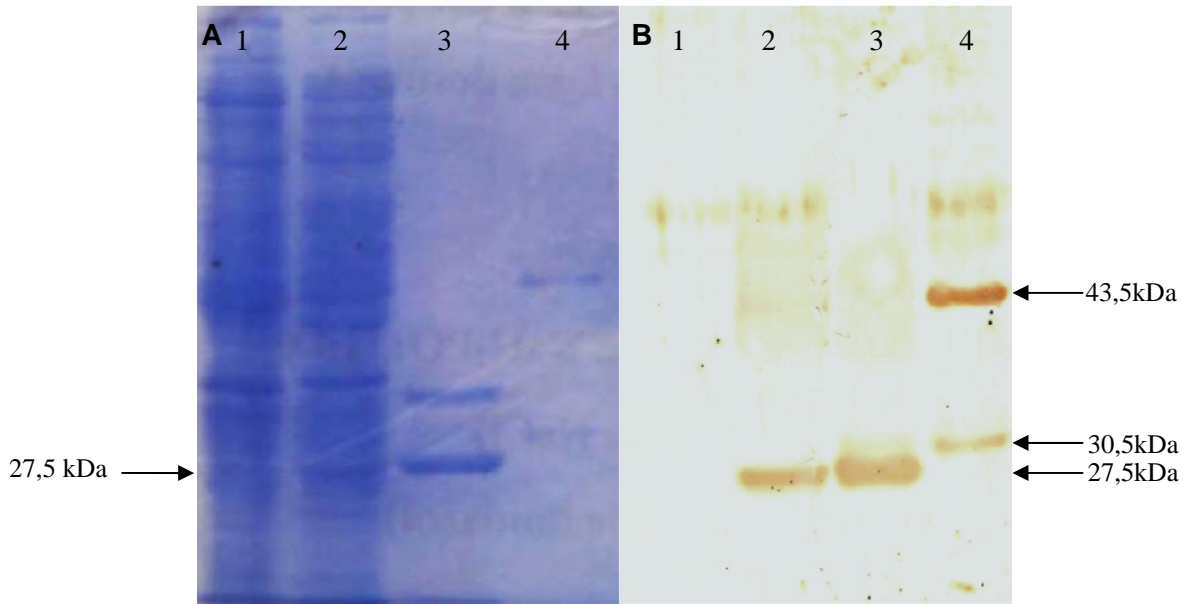


**Figura 7** - Resposta imune humoral de galinhas poedeiras imunizadas com proteína recombinante das fímbrias F4, F6 e F41 utilizando ISCOMatrix como adjuvante. Foi realizada a avaliação por ELISA de um ovo a cada sete dias. Setas = primeiras imunizações.

Schade et al (2005) descreveram a cinética de títulos de anticorpos em galinhas e observaram que após a primeira imunização há um aumento discreto e após os reforços há um aumento exponencial até os 10 dias e então os níveis se mantêm altos por cerca de 10 dias, quando começam a declinar.

O adjuvante utilizado foi o ISCOMatrix baseado em estudo anterior que demonstrou não haver uma diferença significativa nos níveis de anticorpos em comparação com o adjuvante de Freund (FRITZEN *et al.*, 2007). Por isso, considerando o baixo custo e facilidade de manipulação, o adjuvante ISCOMatrix foi selecionado. Além disso, a utilização de adjuvante de Freund vem cada vez mais sendo desaconselhado pelos comitês de ética e bem estar animal devido ao dano tecidual causado e desconforto ao animal.

Os anticorpos obtidos foram analisados por Western Blotting não reagiram com antígenos de *E. coli* BL21 após adsorção com essa mesma bactéria por duas vezes consecutivas. A IgY específica para cada uma das fímbrias reconhece a proteína recombinante e a proteína nativa extraída de bactéria sabidamente positiva para cada uma das fímbrias, induzida em meios específicos. A figura 8 mostra um Western Blotting com anticorpos anti-F4 e fímbria F4. A fímbria F41 apresentou resultados semelhantes. A IgY anti-F6 reconhece a proteína recombinante e não a *E. coli* BL21 Star, mas não foi analisado quanto ao reconhecimento da proteína bruta por não possuir um meio de expressão satisfatório para que fosse possível obter a fímbria bruta.



**Figura 8** - Detecção de anticorpos específicos para a fímbria F4. A- Gel SDS-PAGE 12% corado com comassie blue; linha 1: *E. coli* BL21; linha 2: amostra de bactéria positiva para F4 crescida em ágar glicose; linha 3: antígeno nativo da fímbria F4 e linha 4: proteína recombinante F4. B- Análise por Western Blotting; mesma seqüência de amostras do gel SDS-PAGE. A fímbria F4 apresenta massa molecular de 27,5 kDa.

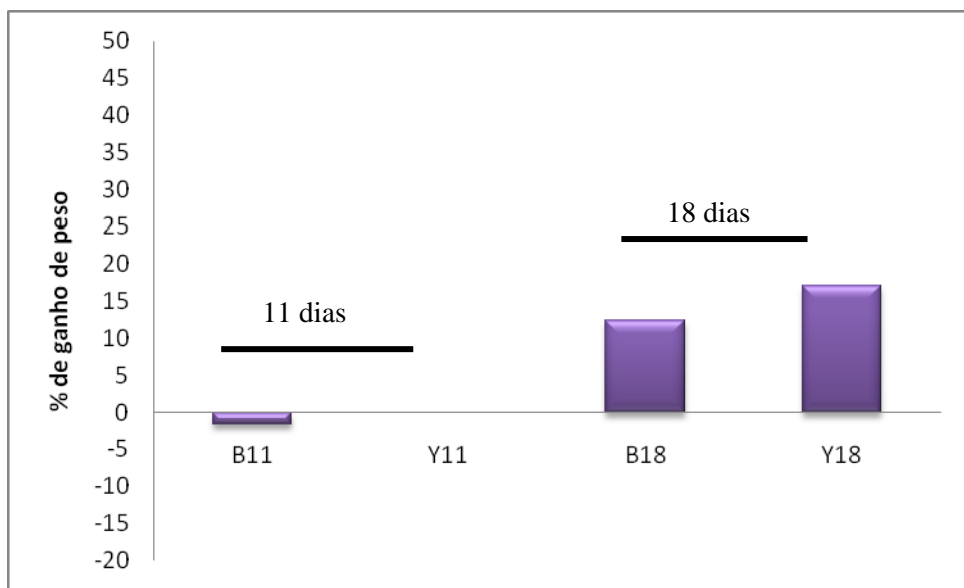
A proteína recombinante F4 apresenta reatividade em duas bandas distintas: uma banda de 30,5kDa e uma de 43,5kDa, representado na figura 8. A presença de peptídeo sinal nessa proteína pode ser responsável pela sua clivagem e essa ser reconhecida pelo anticorpo específico. As proteínas recombinantes expressas a partir do vetor pET102/D-TOPO tem 16kDa maior que a proteína bruta. Ocorre a adição de 3kDa na posição C-terminal e 13kDa na posição N-terminal (manual do usuário - Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits – Invitrogen, EUA). A proteína recombinante de F6 e F41 apresenta somente uma banda após a purificação, tendo reconhecimento específico.

Há poucos estudos utilizando amostras de ETEC para reprodução experimental da DPD, pela dificuldade de reproduzir a doença de forma similar a que acontece em leitões (FAIRBROTHER et al., 2005). Uma forma de reprodução da doença é a utilização de dose de rotavírus previamente ao inóculo bacteriano de *E. coli* (COX et al., 1991; NIEWOLD et al., 2007). A utilização de altas concentrações

de bactéria também é uma alternativa para se reproduzir a doença (MARQUARDT et al., 1999; OWUSU-ASIEDU et al., 2003; GIRARD et al., 2006).

No presente trabalho foram realizados experimentos independentes para as fímbrias F4, F6 e F41. Utilizando duas doses de *E. coli* F4, F5 ou F6, dependendo do anticorpo IgY a ser avaliado, em uma concentração de  $6 \times 10^{10}$  UFC/dose. Dose essa que se mostrou eficiente em reproduzir a doença em leitões recém desmamados.

No experimento utilizando a fímbria F4, os animais do grupo B (n=5) apresentaram porcentagem de ganho de peso inferior em ambas as pesagens, aos 11 e 18 dias. No 11º dia houve uma diferença de 1,64% entre as medianas dos dois grupos, enquanto no 18º dia o grupo Y (n=5) apresentou porcentagem de ganho de peso 4,81% maior que o grupo B. Não apresentando diferença estatística entre os grupos (figura 9).



**Figura 9** - Análise do peso corpóreo em animais tratados e não tratados com IgY anti-F4. No dia 11 os animais do grupo B (B11) apresentaram perda de peso 1,64% em quanto o grupo Y (Y11) apresentou peso equivalente ao primeiro dia de experimento. No dia 18 os animais do grupo B (B18) apresentavam ganho de 12,33% enquanto os do grupo Y (Y18) apresentaram ganho de peso de 17,14% a mais que o peso no início do experimento. Valores expressos em mediana. Não houve diferença estatística entre os grupos nos diferentes dias.

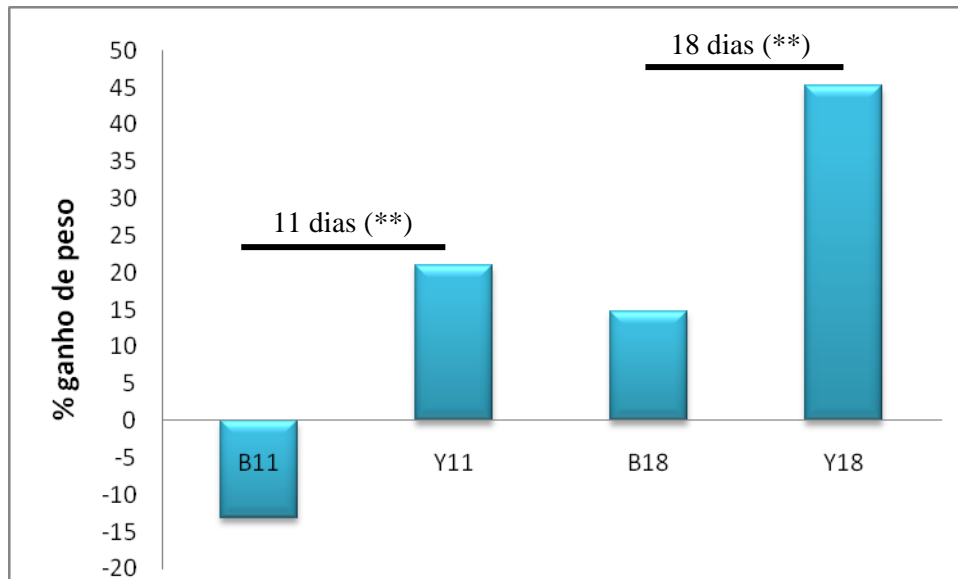
Os animais de ambos os grupos apresentaram diarreia, sendo que no grupo Y, 20% dos animais foram acometidos e no grupo B 80%. Demonstrando

que os anticorpos IgY anti-F4 diminuem a incidência de diarreia e favorece um melhor desenvolvimento dos animais quanto ao ganho de peso no decorrer do experimento. Nesse experimento a amostra foi reisolada no sexto dia de experimento e identificada pela técnica de PCR.

Resultados com proteção efetiva dos leitões foram descritas por MARQUARDT et al (1999), que demonstraram em experimento utilizando leitões de 21 dias de idade recém desmamados inoculados com duas doses de  $5 \times 10^{12}$  UFC/ml de ETEC F4<sup>+</sup>, que a utilização de três doses diárias por dois dias consecutivos de IgY anti-F4 protegeu os animais, com ausência de diarreia e ausência de morte no grupo que recebeu IgY, enquanto que os animais não tratados desenvolveram diarreia grave 12h após inóculo bacteriano e perda de peso após 48h e ocorreu 30% de morte dos animais desse grupo.

No experimento realizado com a fímbria F6 o desenvolvimento dos animais do grupo Y (n=5) foi significativamente melhor que o grupo B (n=5) em ambas as pesagens. Na pesagem do dia 11 os animais do grupo B apresentavam perda de peso de 13,11% enquanto o grupo Y ganhou 20,96%. Na pesagem do dia 18 os animais do grupo B não conseguiram atingir o mesmo ganho dos animais do grupo Y na pesagem do dia 11. Ainda no 18º dia os animais do grupo Y apresentaram um ganho de peso de 45,16%.

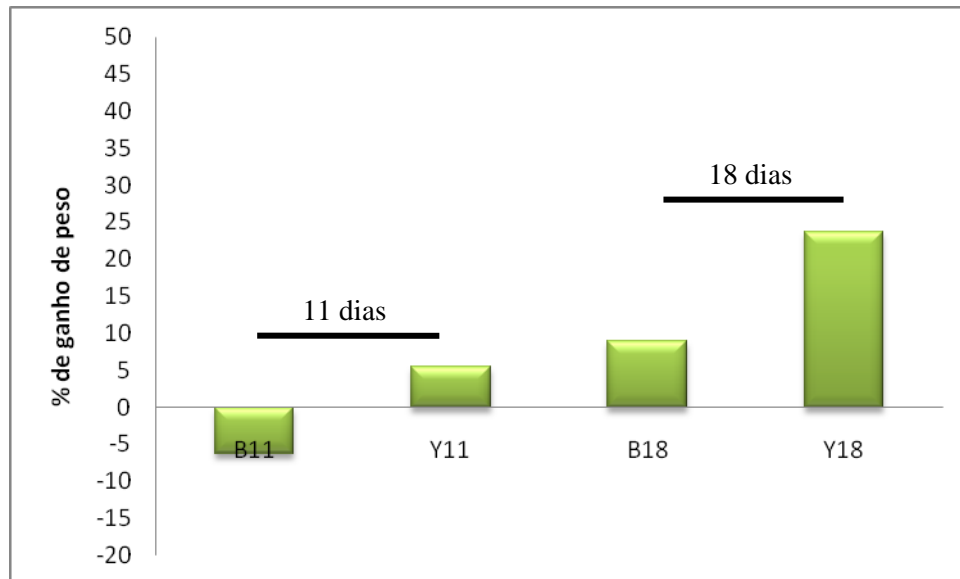
Nesse experimento houve diferença estatística ( $p < 0,01$ ) em ambas as pesagens, sendo os anticorpos IgY anti-F6 considerados protetores contra a DPD causada por ETEC F6<sup>+</sup> nesse modelo experimental. Esses resultados estão demonstrados na figura 10.



**Figura 10** - Análise da imunoproteção pela IgY anti-F6. No dia 11 os animais do grupo B (B11) apresentaram perda de peso 13,11% em quanto o grupo Y (Y11) apresentou ganho de peso de 20,96%. No dia 18 os animais do grupo B (B18) apresentavam ganho de 14,75% enquanto os do grupo Y (Y18) apresentaram ganho de peso de 45,16% a mais que o peso no início do experimento. Valores expressos em mediana. (\*\*)  $p < 0,01$  entre o grupo B e Y.

No grupo B, 60% dos animais apresentaram diarreia e um animal veio a óbito pelo quadro clínico induzido pela inoculação da bactéria nos animais e nenhum animal do grupo Y apresentou sinais clínicos da doença, resultado semelhante ao descrito anteriormente para a fímbria F4 (Marquardt *et al.*, 1999). A bactéria inoculada foi reisolada dos animais do grupo B nos dias em que os animais estavam com diarreia e identificada pela técnica de PCR.

No experimento realizado com a fímbria F41, o grupo Y (n=8) apresentou um ganho de peso de 5,52% no 11º dia enquanto o grupo B (n=5) uma perda de 6,25%, dando uma diferença nas medianas de 11,77%. Na pesagem do dia 18 ambos os grupos ganharam peso, porém o grupo Y apresentou maiores valores, 23,73% enquanto o grupo B 8,85%. Os resultados estão demonstrados na figura 11.



**Figura 11** - Análise do efeito protetor de IgY anti-F41. No dia 11 os animais do grupo B (B11) apresentaram perda de peso 6,25% em quanto o grupo Y (Y11) apresentou ganho de peso de 5,52%. No dia 18 os animais do grupo B (B18) apresentavam ganho de 8,84% enquanto os do grupo Y (Y18) apresentaram ganho de peso de 23,73% a mais que o peso no início do experimento. Valores expressos em mediana. Não houve diferença estatística entre os grupos nos diferentes dias.

Todos os animais do grupo B apresentaram diarreia enquanto no grupo Y somente três animais (37,5%) apresentaram o mesmo sintoma. A bactéria inoculada foi reisolada no quinto dia de experimento e identificada pela técnica de PCR.

Não houve diferença significativa entre os valores de ganho de peso dos dois grupos, porém houve diferença nas porcentagens de ganho de peso indica que a IgY confere alguma proteção, favorecendo um melhor desenvolvimento dos leitões tratados, talvez pela diminuição dos danos causados ou até pela diminuição do grau de infecção pela bactéria.

Os experimentos com as fímbrias F5 e F18 não estão incluídas nesse trabalho, porém são indicados para pesquisas futuras, visando a produção de um produto comercial para imunoproteção de leitões no período pós desmame que consiga abranger todas as fímbrias encontradas em ETEC de leitões para auxiliar no controle, tratamento e profilaxia, da diarreia pós desmame.

A prevalência das diferentes fímbrias de *E. coli* é bastante variável nos diferentes lugares do mundo. No trabalho realizado por Vidotto *et al* (2008) onde foram analisados 100 animais e pelo menos três colônias de *E. coli* por animal,

foram encontradas freqüências de 44% amostras positivas para F4, 30% para F5, 25% para F6, 32% para F41 e 38% para F18, podendo estar associadas ou não em uma mesma amostra. A técnica utilizada para pesquisa dessas fímbrias foi hibridação com sonda não radioativa. Freqüências essas caracterizam todas essas fímbrias como de possível ocorrência e portanto podem estar associadas a diarreia pós desmame no estado do Paraná, Brasil.

No estado de Santa Catarina, o maior produtor de suínos do Brasil, foi realizado um estudo com 40 amostras de quadros clínicos de diarreia em leitões, onde 82,5% das amostras foram positivas para pelo menos um dos genes pesquisados que codificam genes de virulência pela técnica de PCR. As prevalências encontradas foram de 27,5% para F18, 22,5% para F4, F5 e F41. Nesse experimento nenhuma amostra de diarreia apresentou positividade para fímbria F6 (COSTA et al., 2006).

Outro estudo realizado, no estado de Minas Gerais, avaliou 144 amostras de *E. coli* isoladas de leitões lactantes e recém desmamados. A técnica utilizada para esse estudo foi PCR multiplex. Das 144 amostras 42 apresentaram positividade para pelo menos um dos fatores de virulência estudados (toxinas e fímbrias). Dessas 42 amostras 14,3% eram positivas para F4, 33% para F5, 14,3% para F6, 19% para F18 e 9,5% para F41, podendo estar associadas ou não em uma mesma amostra (MACÊDO et al., 2007).

Blanco et al. (2006) avaliaram 36 amostras de leitões com diarreia da região central de Cuba. Dessas amostras 69% apresentaram positividade para pelo menos uma fímbria pela técnica de PCR. As freqüências encontradas foram 61% para F18 sendo dessas 82,6% de animais recém desmamados, 8% para F6 não sendo nenhuma das amostras isoladas de diarreia pós desmame. Nenhum isolado foi positivo para os genes das fímbrias F4, F5 e F41.

Nos Estados Unidos, foram analisadas por PCR multiplex 304 amostras de leitões com diarreia. Dessas amostras 58% foram positivas para pelo menos uma fímbria. A maioria foi positiva para F4 (64,6%) e F18 (34,3%). Somente uma amostra foi positiva para F41 (0,57%) e outro isolado foi positivo para F5 (0,57%). Nenhuma das amostras analisadas apresentou resultado positivo para F6 (ZHANG et al., 2007).

Vu Khac et al (2006) analisando por PCR 101 amostras de *E. coli* de leitões com diarreia pós desmame na Eslováquia mostraram que 60% das amostras

continham o gene para pelo menos uma fímbria. Dessas amostras 34,65% foram positivas para F18, 18,81% para F4, 4,95% para F6 e para F5 e F41 somente 0,99%.

Amostras de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia na Coréia do Sul foram analisadas por PCR multiplex. Das 188 amostras isoladas, 7,45% foram positivas para F4, 29,79% para F5, 6,38% para F6, 15,43% para F18 e 3,72% para F41. Porém essas são as porcentagens das amostras de leitões lactante e recém desmamados. Quando analisamos somente as amostras de leitões com diarreia pós desmame as frequências são as seguintes: F4 7,59%, F5 31,65%, F6 10,13%, F18 17,72% e F41 3,8% (LEE, 2008).

A variação nas frequências encontradas pode ser pelo número de amostras avaliadas, idade dos animais avaliados e locais da coleta. Na tabela a seguir estão algumas diferentes frequências encontradas no mundo e mostra que a avaliação das amostras de *E. coli* na diarreia de leitões deve ser feita na região onde se pretende realizar seus experimentos.

País	Nº amostras	Técnica utilizada	F 4 (%)	F 5 (%)	F 6 (%)	F 18 (%)	F 41 (%)	Referência
Brasil – PR	300	hibridação com sonda não radioativa	44	30	25	32	38	(Vidotto <i>et al.</i> , 2008)
Brasil – MG	144	PCR multiplex	2,77	4,16	4,16	5,55	9,72	(Macêdo <i>et al.</i> , 2007)
Brasil – SC	40	PCR	22,5	22,5	0	27,5	22,5	(Costa <i>et al.</i> , 2006)
Cuba	36	PCR	0	0	8	61	0	(Blanco <i>et al.</i> , 2006)
Estados Unidos	304	PCR multiplex	64,6	0,57	0	34,3	0,57	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
Eslováquia	101	PCR	18,81	0,99	4,95	34,65	0,99	(Vu Khac <i>et al.</i> , 2006)
Coréia do Sul	188	PCR multiplex	7,59	31,65	10,13	17,72	3,8	(Lee <i>et al.</i> , 2008)

**Tabela 5** - Frequência das fímbrias de ETEC em diferentes lugares do mundo. Demonstração das cinco principais fímbrias de ocorrência em leitões com diarreia, fímbrias F4, F5, F6, F18 e F41.

Pela baixa prevalência encontrada, não existem trabalhos utilizando as fímbrias F5, F6 e F41 em ensaios de imunoproteção em leitões recém desmamados, pois quando os animais vão ficando mais velhos tornam-se mais resistentes a essas fímbrias. Porém essas fímbrias estão sendo encontradas em amostras isoladas nesse quadro clínico. Macêdo *et al.* (2007) descreveram três possíveis explicações para o fato dessas fímbrias estarem presentes em isolados de animais com diarreia pós desmame: manejo de desmame precoce, animais que tiveram diarreia por essas amostras anteriormente, mas que essas amostras não estejam envolvidas no processo de diarreia atual e por fim, que a infecção concomitante por outros agentes causadores de diarreia poderia mudar a distribuição por faixa etária.

Já foram descritos anteriormente experimentos de imunoproteção realizados com IgY contra fímbrias de ETEC em leitões recém desmamados (IMBERECHTS *et al.*, 1997; YOKOYAMA *et al.*, 1997; MARQUARDT *et al.*, 1999; OWUSU-ASIEDU *et al.*, 2002; CHERNYSHEVA *et al.*, 2003; OWUSU-ASIEDU *et al.*, 2003).

Imberechts *et al.* (1997) realizaram dois experimentos. O primeiro utilizando amostra *E. coli* F18ab<sup>+</sup> responsável por causar doença do edema em suínos. No segundo experimento todos os animais foram inoculados com amostra *E. coli* F18ac<sup>+</sup> (aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC) que é responsável por diarreia pós desmame em leitões. Observaram que no primeiro experimento não houve sinais clínicos em nenhum dos animais e que a excreção da bactéria somente foi estatisticamente diferente nos dias 7 e 8. Avaliando o segundo experimento, observaram que animais que receberam pó de gemas de ovos de galinhas imunizadas com fímbria F18ab purificada (grupo experimental) apresentaram menos diarreia em quantidade e número de animais acometidos que o grupo controle que recebeu pó de gema de ovos comerciais (grupo controle). Avaliaram a excreção de *E. coli* F18ac<sup>+</sup> por grama de fezes e observaram número significativamente inferior no grupo experimental dos dias 7 até 12. No grupo controle dois animais morreram e nenhum no grupo experimental. Considerando assim que os anticorpos anti-F18ab reduzem a excreção de *E. coli* F18ac<sup>+</sup> e que os animais que receberam esses anticorpos apresentaram-se clinicamente melhores, indicado pelo ganho de peso, número de animais com diarreia e mortes.

Outro trabalho utilizando amostra de *E. coli* F18<sup>+</sup> os animais foram divididos em três grupos. O grupo 1 não recebeu pó de gema (controle). No grupo 2 foi utilizada na ração uma relação 1:10 e no grupo 3 uma relação de 1:50 de pó de gema de galinhas imunizadas com fímbria F18 purificada. Esse experimento mostrou que os animais do grupo 3 apresentaram ganho de peso de 80% contra 52% dos grupos 1 e 2 ao final do experimento. A frequência de diarreia foi significativamente diferente entre os grupo 1 e 3 nos dias 2, 3 e 4 após inoculação e o grupo 2 somente foi diferente do grupo 1 no dia 2. Avaliando escore fecal, o grupo 3 apresentou diarreia menos severa e duração de episódios de diarreia inferiores ao grupo 1. O grupo 2 a partir do dia 4 apresentou escore fecal semelhante ao grupo 1. Analisando a suplementação de anticorpos de gema de ovos específicos para fímbria F18, mostraram que reduz a frequência, gravidade e duração da diarreia. Esses efeitos foram dose dependente, pois a utilização da relação 1:50 apresentou melhores resultados que a utilização da relação 1:10 de pó de gema de galainhas imunizadas (YOKOYAMA et al., 1997).

Outros pesquisadores realizaram experimentos para determinar se havia anticorpos para amostras de ETEC mais comuns em plasma de suíno em pó e plasma de ruminantes em pó e se o efeito de estimulação do crescimento em leitões recém desmamados era pela presença desses anticorpos nesses produtos. Para isso, utilizaram ambos autoclavados ou não. Adicionaram a esses preparados, pó de gema de galinhas não imunizadas e pó de gema de galinhas imunizadas. Constataram a presença de anticorpos anti-F4 e anti-F18 no soro de suíno em pó e anti-F4, anti-F5, anti-F6 e anti-F41 no plasma de ruminantes em pó. Concluíram que a suplementação com pó de gema de galinhas imunizadas aumenta numericamente o ganho de peso diário, que a autoclavagem diminui a palatabilidade do alimento diminuindo assim o consumo e que a adição de anticorpos de gema de ovo de galinhas imunizadas no plasma de suíno em pó autoclavado e a alimentação com plasma de suíno em pó reduz a incidência e a gravidade da diarreia de leitões recém desmamados inoculados com 6 ml de 10<sup>10</sup> UFC/ml *E. coli* F18<sup>+</sup> (OWUSU-ASIEDU et al., 2002).

Em outro estudo dessa mesma equipe foi utilizado proteína isolada de ervilha (PPI) suplementada com IgY anti-F4 e anti-F18 visando substituir o plasma de suíno em pó (SDPP), sugerindo assim alternativas para o controle da diarreia pós desmame causada por ETEC. Os animais foram inoculados com ETEC

F4<sup>+</sup> (6 ml de 10<sup>10</sup> UFC/ml) e tratados com PPI e SDPP suplementados ou não com IgY anti-F4 e anti-F18 e também com uma associação entre PPI e SDPP. Somente o ganho de peso dos animais tratados com PPI sem IgY foi significativamente inferior aos demais tratamentos ao final do experimento. Esse mesmo grupo apresentou ocorrência e gravidade de diarreia superior aos demais grupos além de apresentar maior número de mortes no decorrer do experimento. Sugerindo assim que a presença dos anticorpos anti-F4 e anti-F18 confere melhor desenvolvimento para leitões recém desmamados e possibilitando assim a substituição do SDPP por PPI suplementada com esses anticorpos diminuindo assim os custos da produção e a não utilização de porcos para obtenção de plasma (OWUSU-ASIEDU et al., 2003).

No experimento realizado por Chernysheva et al (2003) os animais foram divididos em quatro grupos de 12 animais cada. Grupo 1 foi controle negativo. Grupo 2,3 e 4 receberam inoculo bacteriano (5x10<sup>11</sup> de E. coli F4ac<sup>+</sup>), porém o grupo 3 recebeu 0,32% da dieta de anticorpos e o grupo 4 recebeu 3,2% da dieta de anticorpos anti-F4, anti-F5 e anti-F6. Todos os animais foram eutanasiados após 36h a administração do inoculo bacteriano. O grupo 1 não desenvolveu diarreia e os outros três grupos apresentaram diarreia em 8, 9 e 7 animais nos grupo 2, 3 e 4, respectivamente. Indicando assim que a IgY não protege leitões do desenvolvimento da diarreia após o inoculo bacteriano nas condições desse experimento.

A obtenção de um modelo de imunoproteção para infecções por ETEC suína mostra-se necessária, em um cenário de utilização indiscriminada de antibióticos que pode levar a resistência bacteriana e também a resíduos em carnes para consumo humano (YOKOYAMA et al., 1997).

## 5 CONCLUSÕES

- A produção de anticorpos policlonais em galinhas poedeiras após a purificação mostrou-se eficiente, tanto em quantidade quanto na especificidade desses anticorpos aos diferentes antígenos fimbriais.
- Os resultados obtidos com a utilização desses anticorpos na imunoproteção de leitões no período pós desmame veio confirmar os resultados já descritos na literatura.
- Apesar de não apresentar bloqueio total da diarreia, foi demonstrado o melhor desempenho dos animais que receberam IgY anti-F6 como tratamento e diminuição na ocorrência de diarreia nos animais tratados com IgY anti F4 e anti-F41.

## 6 PERSPECTIVAS

- Utilização dos anticorpos IgY no combate à diarreia neonatal;
- Utilização dos anticorpos IgY no combate à doença do edema;
- Avaliação de outras vias de administração e forma do preparado administrado;
- Avaliação da utilização da IgY em granjas de suínos, para tratamento e/ou profilaxia.
- Produção de anticorpos contra as toxinas de *E. coli*;
- Avaliação de possível resposta imune de mucosas, quando da administração continuada desses anticorpos.

## REFERÊNCIAS

ABIPECS; EMBRAPA. **Levantamento sistemático da produção e abate de suínos - 2006**. Disponível em: <www.abipecs.com.br>: Acesso em: 10 out. 2008.

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). **J Immunol Methods.**, v.162, n.2, p.155-64, 1993.

BLANCO, M. et al. Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic Escherichia coli isolated from Cuban pigs with diarrhea. **Int Microbiol.**, v.9, n.1, p.53-60, 2006.

BOERLIN, P. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of Escherichia coli isolates from swine in Ontario. **Appl Environ Microbiol.**, v.71, n.11, p.6753-61, 2005.

BOLLEN, L. S. et al. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **Journal of immunol. Meth.**, v.191, p.113-120, 1996.

CAMENISCH, G. et al. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . **FASEB J.**, v.13, n.1, p.81-8, 1999.

CHERNYSHEVA, L. V. et al. Field trial assessment of the efficacy of specific egg-yolk antibody product for control of postweaning E. coli diarrhea. **Vet Ther**, v.4, n.3, p. 279-84, 2003.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de Escherichia coli isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.1, p.5-8, 2006.

COX, E. et al. Experimental induction of diarrhoea in newly-weaned piglets. **Zentralbl Veterinarmed A**, v.38, n.6, p.418-26, 1991.

DE GRAAF, F. K.; ROORDA, I. Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic Escherichia coli strain B41M. **Infect Immun**, v.36, n.2, p.751-8, 1982.

DE MEULENAER, B. et al. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Bisphenol A Using Chicken Immunoglobulins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.19, p.5273-5282, 2002.

DEAN-NYSTROM, E. A. et al. Presence of F18ac (2134P) fimbriae on 4P-Escherichia coli isolates from weaned pigs with diarrhea. **J Vet Diagn Invest**, v.9, n.1, p.77-9, 1997.

ERHARD, M. H. et al. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. **Poult Sci**, v.79, n.9, p.1264-70, 2000.

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E.; GYLES, C. L. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Anim Health Res Rev**, v.6, n.1, p.17-39, 2005.

FRANCIS, D. H. Enterotoxigenic Escherichia coli infection in pigs and its diagnosis. **Journal of Swine Health and Production**, v.10, n.4, p.171-175, 2002.

FRANCIS, D. H.; REMMERS, G. A.; DEZEEUW, P. S. Production of K88, K99, and 987P antigens by Escherichia coli cultured on synthetic and complex media. **J Clin Microbiol**, v.15, n.1, p.181-3, 1982.

FRITZEN, J. T. T. et al. Avaliação da utilização de dois adjuvantes na imunização de galinhas poedeiras para produção de imunoglobulina Y (IgY). In: CONGRESSO LONDRINENSE DE BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE, 7; AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE DOIS ADJUVANTES NA IMUNIZAÇÃO DE GALINHAS POEDEIRAS PARA PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y, 3., 2007. Londrina. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2007.

FUSCO, P. et al. The purification and characterization of four types of E. coli pili and the specificity of E. coli pili for immunity, colonization and adhesion. In: JAPAN CONFERENCE ON CHOLERA, 12., 1978, Atlanta. **Anais...** Atlanta: [s.n.], 1978.

GAASTRA, W.; DE GRAAF, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. **Microbiol Rev.**, v.46, n.2, p.129-61, 1982.

GASSMANN, M. et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB J.**, v.4, n.8, p.2528-32.

GIRARD, F. et al. Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.46, n.3, p.340-50, 2006.

IMBERECHTS, H.; DEPREZ, P.; VAN DRIESSCHE, E.; POHL, P. Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. **Vet Microbiol.**, v.54, n.3-4, p.329-41.

IMBERECHTS, H. et al. Sequences related to the major subunit gene *fedA* of F107 fimbriae in porcine *Escherichia coli* strains that express adhesive fimbriae. **FEMS Microbiol Lett**, v.119, n.3, p.309-14, 1994.

ISAACSON, R. E. K99 surface antigen of *Escherichia coli*: purification and partial characterization. **Infect Immun.**, v.15, n.1, p.272-9, 1977.

KRIEF, A.; LETESSONB, J.; BILLENA, D. Comparison between 'IgY technology' from chickens and 'IgG technology' from mice for production of tailor-made antibodies. **Tetrahedron Letters**, v.43, p.1843-1846, 2002.

LEE, S. I.; KANG, S. G.; KANG, M. L.; YOO, H. S. Development of multiplex polymerase chain reaction assays for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli* and their application to field isolates from piglets with diarrhea. **J Vet Diagn Invest.** v.20, n.4, p.492-6, 2008.

LEVESQUE, S.; MARTINEZ, G. E.; FAIRBROTHER, J. M. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. **Poult Sci**, v.86, n.4, p.630-5, 2007.

MACÊDO, N. R. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1117-1123, 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. et al. **Microbiologia de Brock**. São Paulo, 2004.

MARQUARDT, R. R. et al. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.23, n.4, p.283-8, 1999.

MORÉS, N.; AMARAL, A. L. Patologias associadas ao desmame. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: [s.n.], 2001.

MORÉS, N. et al. Fatores de risco associados aos problemas dos leitões na fase de creche em rebanhos da região Sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.3, 2000.

NAGY, B. E.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals. **Vet Res.**, v.30, n.2-3, p.259-84, 1999.

NARAT, M. Production of Antibodies in Chickens. **Food Technol. Biotechnol.**, v.41, n.3, p.259-267.

NATARO, J. P. E.; KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clin Microbiol Rev.**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NIEWOLD, T. A. et al. Dietary specific antibodies in spray-dried immune plasma prevent enterotoxigenic Escherichia coli F4 (ETEC) post weaning diarrhoea in piglets. **Vet Microbiol.** v.124, n.3-4, p.362-9, 2007.

OJENIYI, B.; AHRENS, P.; MEYLING, A. Detection of fimbrial and toxin genes in Escherichia coli and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.41, n.1, p.49-59, 1994.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SOJKA, W. J.; E LEACH, J. M. Simultaneous occurrence of E. coli B and Lantigens in strains from diseased swine. Influence of cultivation temperature. Two new E. coli Kantigens: K 87 and K 88. **Acta Pathol Microbiol Scand.**, v.53, p.404-22, 1961.

OWUSU-ASIEDU, A. et al. Response of early-weaned pigs to spray-dried porcine or animal plasma-based diets supplemented with egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia colil. **J Anim Sci.**, v.80, n.11, p.2895-903, 2002.

OWUSU-ASIEDU, A. et al. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic Escherichia coli (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody. **J Anim Sci.**, v.81, n.7, p.1781-9, 2003.

RIPPINGER, P. et al. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. **Vet Microbiol** v.45, n.4, p.281-95, 1995.

SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Altern Lab Anim**, v.33, n.2, p.129-54, 2005.

SCHADE, R. et al. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21, ATLA, 1997.

SILVA, C. A. et al. Ecopatologia da diarreia pós-desmame em granjas de suínos da região Norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.39-43, 1999.

SOBERTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: [s.n.]: 2007.

SVENSMARK, B. et al. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. III. Rotavirus infection. **Acta Vet Scand**. v.30, n.1, p.63-70, 1989.

TRABULSI, L. R. E.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

VIDOTTO, M. C. et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea in the Paraná, South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** (Aceito). 2008.

VU KHAC, H. et al. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. **BMC Vet Res.**, v.2, p.10, 2006.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunol Today**, v.16, n.8, p.392-8, 1995.

YOKOYAMA, H. et al. Effect of oral egg antibody in experimental F18+ *Escherichia coli* infection in weaned pigs. **J Vet Med Sci.**, v.59, n.10, p.917-21, 1997.

ZHANG, W. et al. Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Vet Microbiol.**, v.123, n.1-3, p.145-52, 2007.

ZHU, G. et al. Histone H1 proteins act as receptors for the 987P fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli. **J Biol Chem.**, v.280, n.24, p. 23057-65, 2005.