



MARCINA GARCIA 165

Este exemplar corresponde a redação
final da tese defendida pela candida-
ta Marcina Garcia e aprovada pela
Comissão Julgadora.

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE UMA VACINA
OLEOSA CONTRA COLIBACIOSE NEONATAL
BOVINA**

Tese apresentada ao Curso de
Imunologia do Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas -
UNICAMP para obtenção do
grau de mestre

- CAMPINAS -
1992



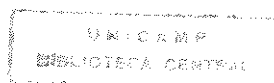
9205711

MARCINA GARCIA

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE UMA VACINA
OLEOSA CONTRA COLIBACILOSE NEONATAL
BOVINA**

Orientador: Prof. Dr. TOMOMASA YANO

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Universidade Estadual de Campinas
São Paulo - Brasil
1992



Para a realização deste trabalho, foi concedida bolsa de Mestrado pela, Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES). O auxílio financeiro ao projeto foi concedido pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À minha família, em
especial aos meus
pais, pela constante
dedicação e incentivo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. TOMOMASA YANO, pela orientação, amizade e constante estímulo durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO, pela atenção e inúmeras sugestões apresentadas durante a revisão do texto final.

Ao Prof. DOMINGOS DA SILVA LEITE, pela amizade e valiosa colaboração durante a realização deste trabalho.

À Profa. MARIA SILVIA VICCARI GATTI, pela ajuda na realização do ensaio imunoenzimático (ELISA), e a MIRTIS e NATALÍCIA pela ajuda e colaboração.

À médica veterinária GONÇALA MARIA MARTINS ARITA, pelo constante estímulo e ajuda na realização deste trabalho.

Ao Centro Nacional de Gado de Corte, EMBRAPA, MS, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

Ao Laboratório SALSBURY, pela permissão de uso de equipamentos em seus laboratórios e pelo fornecimento de material.

Ao Laboratório de Imuno-Parasitologia, GASTROCENTRO, Hospital das Clínicas - UNICAMP, pela permissão de uso de equipamentos.

Ao Sr. JORGE AMADEU RONDELLI, do Haras Elcajo II, pelo fornecimento de sangue de cavalo, utilizado neste trabalho.

Ao MANOEL BERNARDES DA SILVA e ANA STELLA MENEGON, pela valiosa ajuda no laboratório e pela amizade constante.

As secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia LUCIA e CLEIDE, pela constante atenção.

Ao Prof.Dr. MARCOS GARCIA COSTA, então coordenador do curso de Pós-Graduação de Imunologia, pelo incentivo e apoio.

Ao secretário FLÁVIO da Pós-graduação, pela sua atenção e colaboração

À Profa. LEONILDA MARIA BARBOSA DOS SANTOS, pelo seu apoio e colaboração.

Ao Prof Dr. IRINEU J.B. de CAMARGO e Profa. CLARICE W. ARNS pelas críticas e sugestões.

À Profa. Dra. MARLENE BRAIDE SERAFIM e demais professores deste Departamento pela permissão do uso de equipamentos nos diversos laboratórios.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela amizade.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. AMOSTRA.....	17
3.2. PROVA DE MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE RESISTENTE (MHMR).....	17
3.2.1. Preparo das suspensões bacterianas.....	17
3.2.2. Padronização das hemácias.....	18
3.2.3. Teste de Microhemaglutinação Manose Resistente (MHMR).....	18
3.3. SEMI-PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS K99-F41.....	19
3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida..	20
3.3.2. Montagem do gel.....	21
3.3.3. Coloração do gel.....	22
3.4. ANTICORPO.....	22
3.5. PREPARO DA VACINA.....	23
3.6. IMUNIZAÇÃO DOS BOVINOS (VACAS PRENHAS).....	24
3.6.1. Coletas de sangue.....	26
3.7. DESAFIO DOS BEZERROS.....	27
3.8. TESTES SOROLÓGICOS.....	27
3.8.1. Imunodifusão dupla.....	28
3.8.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	28
3.8.2.1. Titulação em bloco do antígeno	

soro e conjugado.....	29
3.3.2.2. Aplicação do ELISA direto na	
qualificação dos anticorpos	
anti-K79-F41.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. TESTES SEROLÓGICOS.....	33
4.1.1. Imunodifusão dupla.....	33
4.1.2. Ensaio imunoenzimático.....	37
4.2. DOSES DE VACINA.....	44
4.3. DESAFIO.....	44
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	57
7. RESUMO.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
9. APÊNDICE.....	78

1. INTRODUÇÃO

A colibacilose neonatal, em bovinos, é uma das moléstias mais importantes, que se caracteriza por ser uma enfermidade aguda e geralmente fatal. Na maioria dos casos, provoca elevados prejuízos econômicos aos pecuaristas dedicados as criações bovinas (corte e leite).

O principal agente causal desta enfermidade é a *Escherichia coli*, enterotoxigênica (ETEC).

Sabe-se hoje que estas amostras de *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) possuem na sua superfície celular apêndices filamentosos, não flagelares de constituição proteica denominados por Duguid & Edmunds 1955 de "fímbrias" também chamados de antígenos de aderência, adesina ou fator de colonização, que se aderem às células epiteliais no intestino delgado (Duguid & Edmunds 1955, Brinton 1965, Jones 1977). Estas fímbrias apresentam a capacidade de, uma vez no trato intestinal, aderirem a receptores específicos das células das vilosidades do intestino delgado, ocasionando a colonização do mesmo e impedindo que as bactérias sejam eliminadas rapidamente através dos movimentos peristálticos.

Com a aderência das bactérias e a sua multiplicação, é que aumentam as condições para que ocorra no intestino delgado a produção de grande quantidade de enterotoxina, que leva

os bezerros a apresentarem a diarreia típica encontrada na colibacilose.

Dentre os vários antígenos de aderência já conhecidos, K88, F42, EAF44, 987P, F1 (Sojka 1965, Leite 1986, Yano 1987, Nagy & Isaacson 1976, 1977, Orskov & Sojka 1975), o mais importante fator de colonização de ETEC em bezerros, são os antígenos K99-F41. Quanto a enterotoxina, somente a STa, está envolvida na colibacilose bovina causada por ETEC (Burgess & Newsonw 1978, Sherwood & Lawson 1983, Sivanswany & Gyles 1976, Acres 1985). Esta enterotoxina é um peptídeo de baixo peso molecular e não imunogênica em condições naturais, sendo capaz de induzir a formação de anticorpos quando acoplada a um antígeno completo (Alderete & Robertson 1978, Evans & Pierce 1973, Gyles 1971, Sack 1975). Os antígenos de aderência, K99 e F41, ao contrário da enterotoxina STa, são imunogênicos, o que tem levado vários pesquisadores a estudarem a sua utilização em vacinas contra a colibacilose (Moon 1981, Porte & Allen 1974, Rutter 1975, Soderlind & Mollby 1982).

Não existe no Brasil uma vacina eficiente contra a colibacilose neonatal de bezerros. As vacinas existentes, são importadas, produzidas com antígeno K79 purificado e embora sejam consideradas bastante eficientes, empregam uma infraestrutura altamente sofisticada e dispendiosa para a sua produção industrial. Por outro lado existe a bacterina, que é uma cultura de *Escherichia coli*,

produtora do antígeno K99-F41, que após crescimento em meio líquido é inativada pelo formol. Este tipo de vacina mesmo levando a uma proteção dos bezerros que mamarem o colostro de vacas imunizadas, provocam uma série de inconvenientes que precisam ser mencionados:

a) tratando-se de uma bacterina, composta por células bacterianas totais apresentam além dos antígenos de aderência (K99-F41), antígenos flagelares somáticos, capsulares ou envólucro, e uma série de outros componentes intracelulares. Em tais condições o produto pode conter uma grande quantidade de endotoxina que entre outras reações, tais como febre, hipotensão, choque, etc., pode provocar abortos (Gojka 1965)

b) o controle da quantidade dos antígenos K99-F41, tornar-se difícil de ser realizado, porque cada partida pode apresentar quantidades diferentes de antígeno, tornando o produto heterogêneo.

c) esta vacina, de produção aparentemente fácil, requer uma infraestrutura que permita avaliar periodicamente a quantidade dos antígenos K99-F41 presentes em cada partida da mesma, o que nem sempre está ao alcance dos laboratórios.

Diante do exposto, consideramos que uma solução para este impasse seria a produção de uma vacina contendo os antígenos K99-F41 semi-purificados.

O desenvolvimento de vacina contendo os antígenos K99-F41 semi-purificados poderá beneficiar, principalmente, as indústrias nacionais no sentido da transferência da tecnologia a ser implantada e da facilidade de ser a mesma absorvida, evitando-se a importação de vacinas sofisticadas ou a necessidade de aquisição de equipamentos específicos ou demasiadamente dispendiosos. A vacina poderá ser facilmente padronizada através de provas de microhemaglutinação manose-resistente, levando a partidas homogêneas bem como um conteúdo extremamente baixo ou quase nulo de endotoxina, evitando-se as reações adversas já mencionadas que podem ocorrer com bacterinas.

Com base nestes raciocínios o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Produção de uma vacina oleosa contendo os antígenos K99-F41 semi-purificados.
2. Padronização e verificação da dosagem de vacina a ser utilizada em vacas prenhas.
3. Padronização e aplicação do ensaio imunoenzimático (ELISA), para detecção de anticorpos anti-K99-F41 em soros bovinos.
4. Testar a eficiência da vacina, através de conversão sorológica, e do desafio dos bezerros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A bactéria *Escherichia coli*, usualmente faz parte da flora intestinal do homem e de animais domésticos, sendo uma das bactérias mais importantes, como componente natural do segmento posterior do trato intestinal, região do íleo e colon, onde vive em condições favoráveis de comensalismo (Mackowiak, 1982). A flora normal estimula o desenvolvimento das defesas imunológicas e a regulação desta flora intestinal é devida a interações competitivas antagônicas, as bacteriocinas secretadas e a imunidade local, entre outras (Willinger & Weber 1978). Sua função principal consiste na regulação de processos intestinais de decomposição e produção de importantes vitaminas do complexo B e de vitamina K.

A *Escherichia coli* exerce sua ação patogênica através de pelo menos 2 fatores de virulência que permitem a colonização do intestino delgado e a produção de enterotoxinas (Smith 1979). Sabe-se hoje que o principal grupo de *E.coli* enteropatogênica nos animais, principalmente em bovinos é denominado de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).

A ETEC produz duas enterotoxinas, uma

termolábil (LT) e outra termoestável (ST). A enterotoxina termolábil é atualmente classificada em dois tipos LT-I e LT-II (Holmes, 1986). A enterotoxina LT-I é uma proteína imunogênica, de alto peso molecular, semelhante sorológica e biologicamente à toxina colérica (TC), neutralizável por antissoros preparados com a TC e a LT-I de origem humana ou suína. Tanto a LT-I como a TC têm como receptor o gangliosídeo GM1, presente na membrana das células epiteliais do intestino do homem e de animais sensíveis (Gyles 1971, Holmgren & Svennerholm 1982, Sack 1975). A LT-I ativa a adenil-ciclase, provocando um aumento do AMP cíclico que, por sua vez, determina o bloqueio da absorção de NaCl pelas células apicais da mucosa, estimulando ainda a excreção desse sal pelas células das criptas. Como consequência destas alterações no metabolismo hidrossalino, ocorrerá um aumento da quantidade de líquido na luz intestinal e, conseqüentemente, aparece uma diarreia do tipo osmótico.

A enterotoxina LT-II assemelha-se a LT-I quanto ao aumento intracelular do AMP cíclico, mas não é neutralizada pelos antissoros acima mencionados e não tem como receptor o gangliosídeo GM1 (Holmes & Pickett 1986).

Em contraste a enterotoxina termoestável (ST), classificada em dois tipos, STa e STb através das propriedades biológicas, é um peptídeo de baixo peso molecular (1500 a 3000 daltons) não imunogênica (Saeed

1983, Smith & Gyles 1970, Alderete & Robertson 1970, Takeda 1979). Até o presente momento, somente a enterotoxina STa está envolvida na colibacilose bovina causada por ETEC (Burgess & Newsome 1978, Sherwood & Lawson 1983, Sivaswamy & Gyles 1976, Acres 1985).

A enterotoxina STa não é imunogênica em condições naturais, sendo capaz de induzir a formação de anticorpos quando acoplada a um antígeno completo, sendo portanto considerada como um hapteno (Alderete & Robertson 1978, Evans & Pierce 1973, Gyles 1971, Sack 1975).

A STa tem a capacidade de alterar o metabolismo hidrossalino da mucosa intestinal, ativando a guanil-ciclase a nível de membrana da célula da vilosidade intestinal, o que ocasiona um aumento do GMP cíclico (GMPc) intracelular (Field & Smith 1970, Gyles 1971), ocasionando o aparecimento de diarreia aguda, com desidratação, perda de peso e morte de grande número de animais afetados, entre 48-72 horas após o início dos sintomas.

A *E.coli* possui na sua superfície apêndices filamentosos, não flagelares de constituição proteica, visíveis ao microscópio eletrônico (Houwink & Irterson 1950), denominados por Duguid et alii 1955 de "fímbrias", termo este usado para descrever filamentos presentes na superfície bacteriana de amostras de *E.coli* e de outras bactérias gram-negativas e gram-positivas, conhecidos como organelas responsáveis pela sua propriedade adesiva

(Duguid, Anderson & Campbel 1966, Jones 1977). Estas fímbrias também promovem hemaglutinação frente a vários tipos de hemácias na presença de D-manose diferenciando-as entre si, em vários tipos (Levine & Hughes 1980, Jones & Rutter 1974, Cravioto & Rowe 1980).

Estas amostras de ETEC com fímbrias, uma vez no trato intestinal de animais sensíveis se ligam a receptores específicos das células das vilosidades do intestino delgado, levando conseqüentemente a multiplicação e colonização. A aderência impede que as bactérias sejam eliminadas através dos movimentos peristálticos intestinais (Guinée & Jansen 1979, Moon 1978, Pohl & Schotte 1983, Isaacson 1980, Orskov 1983, Smith & Huggins 1978)

Morris & Sojka 1977, 1978, 1982, observaram em uma amostra de *E.coli* denominada B41 (0101:K30:K77) isoladas de bezerros com diarreia, dois antígenos K99 quanto a mobilidade eletroforética. Estes resultados foram também confirmados por Isaacson 1977, sugerindo que a amostra de *E.coli* B41 possuía dois antígenos de superfície distintos, um de natureza catiônica e outro de natureza aniônica.

De Graaf e Roorda 1981, descreveram que o antígeno K79 (componente catiônico) aglutinava fortemente hemácias de cavalo e mais fracamente hemácias de carneiro, não sendo capaz de aglutinar hemácias de cobaio.

Quanto ao componente aniônico, agora denominado de antígeno "F41", foi verificado que este aglutinava fortemente hemácias de cobaio e fracamente as de carneiro e cavalo. A proteína com mobilidade eletroforética do tipo catiônico, o antígeno K99, tem um peso molecular de 18.400 daltons e ponto isoelétrico de 9,75 e a outra proteína o componente aniônico, o antígeno F41, tem um peso molecular de 29.000 daltons, com ponto isoelétrico de 4,6 (De Graaf & Gastra 1981, Isaacson 1977).

A colonização do intestino delgado é o evento principal na patologia da colibacilose entérica (Morin & Lallier 1976, Smith & Huggins 1978) portanto a colonização envolve um aumento do número de ETEC e consequentemente um aumento na proporção das bactérias que estão ligadas na mucosa intestinal (Hadaad & Gyles 1982 a,b, Smith & Lingood 1972). Em bezerro normal, das bactérias que estão no lumen intestinal, somente 10 a 20% estão ligadas à mucosa intestinal, em contraste os animais com colibacilose entérica a situação é inversa, cerca de 80 a 90% das ETEC estão ligadas, à mucosa (Hadaad & Gyles 1982 a,b).

O mecanismo exato desta aderência a nível molecular não está bem definido, contudo informações sugerem que, a superfície das células bacterianas e epiteliais intestinais, estão ambas carregadas negativamente, portanto há uma tendência natural delas se repelirem. A fímbria K99 na superfície celular bacteriana

inicia a ligação extendendo-se através da região de repulsão para alcançar os sítios de receptores específicos nas células epiteliais do intestino (Chan & Costerton 1982, Hadad 1982 a,b)

Resistência natural à colibacilose entérica.

A diarreia causada por ETEC ocorre em bezerros principalmente durante os primeiros dias de vida. Estudos epidemiológicos indicam que mais de 90% dos casos clínicos causados por ETEC K99+F41+ ocorre em bezerros jovens com menos de 4 dias de idade (Acres & Radostits 1977, de Leeuw & Baanvinger 1980, Moerman & Tiessink 1982, Gherwood & Lawson 1983)

Smith & Halls 1967, através de estudos experimentais, usando bezerros de várias idades desafiados com ETEC por inoculação oral, demonstraram que os animais inoculados no 1º dia de vida desenvolviam diarreia e tinham a metade posterior do intestino delgado colonizada por ETEC. Em contraste, bezerros inoculados após o 1º dia de vida mostraram aumento da resistência, que era completa com 48 a 96h de idade. O mecanismo desta relação idade-resistência não está bem claro. Esta resistência não é mediada por anticorpo passivo, porque os bezerros

desprovidos de colostro também são refratários ao desafio no 2º ou 3º dia de vida.

Runnels et alii 1980, sugerem através de estudos realizados "in vitro" que as células intestinais desenvolvem resistência para o antígeno K99 a medida que os bezerros ficam mais velhos.

Portanto, parece que as células epiteliais das vilosidades intestinais sensíveis a K99 presentes no nascimento ou perdem seu receptor para K99 ou são substituídas por novas populações de células que não possuem receptores.

Entretanto, bezerros são susceptíveis a colonização por ETEC K99+ por somente um breve período de tempo imediatamente após o nascimento (Acres 1985).

Imunidade para colibacilose entérica

O colostro contém uma variedade de fatores específicos e não específicos que potencialmente podem prevenir infecções bacterianas

Logan et alii 1977 demonstraram que, bezerros que mamam o colostro de vacas não imunizadas 2 horas antes do desafio experimental com bactéria não tiveram o intestino colonizado por ETEC e não desenvolveram diarreia,

enquanto que aqueles que mamaram entre 2h a 6h, após o desafio tiveram o intestino colonizado, apresentaram diarreia e desenvolveram lesão intestinal semelhante aqueles bezerros privados de colostro, demonstrando desse modo que o tempo de mamar o colostro em relação ao tempo de infecção é um importante fator e que é necessário consumir o colostro antes que ocorra a infecção para o estabelecimento e proteção de uma barreira imunológica no intestino delgado. O mecanismo de proteção dado pelo colostro de vacas não imunizadas não está bem caracterizado. Logan et alii 1974 demonstraram que a alimentação por soro colostrar antes do desafio previne contra a diarreia, mas que imunoglobulinas IgG, IgM e frações de IgA preparadas do soro e alimentos separadamente sómente reduziram a severidade da diarreia mas não preveniram contra ela, sugerindo assim, que a menor parte da proteção era devido as imunoglobulinas, mas que outros fatores também podem ter contribuído, tais como, anticorpos contra antígeno somático da amostra usada para o desafio.

Outros autores (Acres & Kapitany 1982, Myers 1978) também relataram uma proporção variável de bezerros resistentes a infecção experimental, muito embora não tenham encontrado nenhum anticorpo contra a amostra de desafio no colostro das vacas.

Foram detectados em colostro de vacas não imunizadas, outros fatores que podem inibir a infecção por

ETEC apresentando semelhança estrutural dos sítios receptores da fímbria e da enterotoxina nas células epiteliais. Esses receptores semelhantes poderiam efetivamente bloquear a patogenia por se ligarem a fímbria ou enterotoxina antes destas se ligarem a células das vilosidades intestinais (Porter 1979, Reiter 1978).

Quanto à imunidade específica, mediada por anticorpos, bezerros recém nascidos dependem de anticorpos derivados de colostro para prevenção contra infecção sistêmica e localizada por *E.coli* enterotoxigênica.

Os anticorpos de colostro que são absorvidos no lúmen do intestino delgado através da circulação sistêmica durante as primeiras 24h de vida, previnem contra colisepticemia generalizada, mas induzem pouca ou nenhuma proteção contra ETEC.

Por outro lado, anticorpos não absorvidos em especial do tipo IgA ou IgG, neste último caso não destruído por causa de inibidores de enzimas proteolíticas existentes no colostro permanecem no lúmen do intestino delgado ou são adsorvidos a superfície das vilosidades das células epiteliais, previnem contra infecção por ETEC, mas não contra colisepticemia (Logan & Penhale 1974, Smith & Huggins 1979).

Mecanismo de proteção mediada por anticorpos.

Os anticorpos anti-fímbrias podem prevenir a diarreia por interferirem na ligação de ETEC na mucosa intestinal. É provável que os anticorpos se liguem aos receptores das fímbrias inibindo desse modo a ligação desta com o sítio específico do receptor nas células das vilosidade intestinais (Acres & Kapitany 1982, Moon 1982, Morris & Sojka 1983).

São descritos outros possíveis mecanismos de proteção, tais como a opsonização, a aglutinação ou trocas de cargas na superfície bacteriana, e ainda um mecanismo específico, que pode prevenir infecção por ETEC incluindo o efeito bactericida e bacteriostático dos anticorpos, existindo durante a infecção por ETEC um grande número de células potencialmente fagocíticas, principalmente neutrófilos, que migram para o lúmen do intestino delgado através da área de domínio das placas de Peyer's (Bellamy 1974, 1983).

A ETEC também pode ser inativada ou destruída por enzimas e substâncias antibacterianas, como a lactoferrina, liberada por desintegração de neutrófilos que tenham migrado através da parede do intestino (Mett & Vosbeck 1983, Reiter & Philips 1980).

Imunização

Atualmente são usadas numerosas vacinas contra ETEC em vários lugares do mundo, e também diversas vias de imunização com a finalidade de estimular imunidade contra amostra de ETEC, nos animais nascidos de vacas vacinadas.

As vacinas mais usadas comercialmente são administradas subcutaneamente ou intramuscularmente e estimulam a formação de anticorpos no soro que são transferidos e concentrados no colostro antes do parto (Logan & Penhale 1974). Os anticorpos são transferidos passivamente para os bezerros após o nascimento e agem localizadamente no intestino delgado para prevenir infecção por ETEC, sendo predominantes as classes de imunoglobulinas do tipo IgG e IgM.

A observação de que bezerros são sensíveis a colonização por ETEC sómente durante um período imediatamente após o nascimento, sugere ser possível prevenir a doença através da estimulação da formação de anticorpos protetores no colostro que poderiam ser transferidos para o intestino delgado de bezerros durante o período de sensibilidade, e conhecendo-se a estrutura da *E.coli* enterotoxigênica e a função da fímbria na patogenia

da diarreia poder-se identificar um antígeno que poderia induzir a formação de anticorpos específicos.

A evidência mais conclusiva para este tipo de proteção é obtida com antígeno bacteriano do tipo fímbria, principalmente K99-F41, estudos desses antígenos tem sido de ajuda considerável na purificação destes e por serem altamente imunogênicos são adequados para testes de vacinação (Isaacson 1980, de Graaf & Rorda 1982).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRA

Foi utilizada neste trabalho a amostra de *E.coli* B41 (0101:K99⁺F41⁺) enterotoxigênica (STa⁺) de origem bovina, gentilmente cedida pelo Dr.H.W.Moon, "National Animal Diseases Laboratory", Iowa, U.S.A.

3.2. PROVA DE MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE RESISTENTE (MHMR).

3.2.1. Preparo das suspensões bacterianas

A amostra de *E.coli* B41 foi pré-cultivada em TSB (Trypticase Soy Broth, DIFCO) e 200 μ l deste cultivo foram semeados em meio de cultura Minca, que favorece a produção dos antígenos K99-F41, conforme relatado por Guinée 1977.

O crescimento bacteriano obtido após 24 horas de incubação a 37^o C foi suspenso em salina fosfatada tamponada 0,05M, pH 7,4 contendo 0,5% de D-manose (INLAB)

(PBS-M), ajustando-se o número de células totais para aproximadamente 5×10^9 bactéria/ml. Para tal utilizou-se o tubo 3 da Escala de Mac Farland (Bier, 1930).

3.2.2. Padronização das hemácias

Hemácias de cavalo e carneiro foram coletadas e conservadas a 4°C em solução de Alsever. As hemácias de cobaio foram coletadas no dia do teste utilizando-se solução de citrato de sódio (3,8%) como anticoagulante. As hemácias foram lavadas 2 vezes em PBS e 1 vez em PBS-M e padronizadas a 1%.

3.2.3. Teste de Microhemaglutinação Manose Resistente (MHMR)

Para o teste propriamente dito, de MHMR foram utilizadas placas de microtítulos (Falcon Plastics) de base côncava. Suspensões bacterianas de *E.coli* B41 ou antígenos K79-F41, na forma solúvel, foram diluídas em série à razão de 2, diretamente nas placas de microtítulos, em volumes de 50 µl, utilizando-se como diluente PBS-M.

Sobre essas diluições colocou-se igual volume de hemácias padronizadas. Durante toda a realização do teste, os componentes da reação foram mantidos em banho de gelo, conforme recomendado por Jones & Rutter 1974. Após 1 hora de incubação nestas condições, procedeu-se a leitura do teste.

Uma unidade hemaglutinante manose resistente (UH), dos antígenos K99-F41 foi definida como a maior diluição da mistura dos antígenos que ainda era capaz de aglutinar respectivamente as hemácias de cavalo e cobaio.

3.3. SEMI-PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS K99-F41.

A amostra de *E.coli* B41 foi selecionada previamente quanto a uma maior produção dos antígenos K99-F41, conforme descrito no item 4, sendo cultivada em meio de Minca líquido, em fermentador de bancada (New Brunswick Scientific Co.Inc.), seguindo as indicações de Otírm 1967, a 37°C por 18 horas de incubação, com agitação a 250rpm, a 37°C, com a injeção de ar comprimido filtrado (15 psi), sendo as culturas então centrifugadas a 10.000 g por 20 min.

O sedimento resultante foi ressuspenso em pequena quantidade de tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 contendo

1M de NaCl, aquecido a 60°C, em banho maria por 20 min., com agitação ocasional, em seguida centrifugado novamente a 4°C por 20 min. a 10.000 g

O sobrenadante, rico em K99-F41, foi precipitado com sulfato de amônia (MERCK), na concentração de 60% de saturação. A mistura foi centrifugada e o precipitado ressuspenso em tampão 0,05M pH 7,2 e dialisado exaustivamente contra o mesmo tampão.

De acordo com Korhonen & Svanborg 1980 a fração obtida pela precipitação com sulfato de amônia (60%), foi tratada por 72 horas à 4°C com tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 contendo 0,5% de DDC (Desoxicolato de sódio, MERCK). Após este tratamento a amostra foi centrifugada a 10.000 g e a 4°C por 10 min. O material solúvel em DDC foi novamente dialisado contra tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 e examinado pela, MHMR frente a hemácia de cavalo para o antígeno K99 e com hemácia de cobaia para o antígeno F41.

3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE

Os antígenos K99-F41, foram examinados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguindo-se a indicação de Lammlí 1970.

Um volume de 20 μ l de antígeno foi tratado com 20 μ l do tampão de amostra, 2 vezes concentrado, contendo Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, 10% de 2-mercaptoetanol, 0,02% de azul de bromofenol, submetido a fervura (100°C), durante 1 min.

3.3.2. Montagem do gel

O gel de poliacrilamida foi montado em placas de vidro com dimensões de 9,5 x 9,5 cm, constituído de um gel separador a 12% de acrilamida e Tris-HCl 0,33% de persulfato de amônio e 0,033% de TEMED, sobreposto por um gel concentrador a 3% de acrilamida com 0,10% de N,N bis metileno acrilamida e de Tris-HCl 0,25M, pH 6,8, polimerizado quimicamente pela adição de persulfato de amônio 0,05% e TEMED 0,05%, onde foram feitas canaletas para aplicação das amostras. O tampão usado na corrida eletroforética continha Tris 0,025M, glicina 0,192M e SDS a 0,1% pH 8,3.

A corrida eletroforética foi realizada sob amperagem de 20 a 25 mA, 110V, à temperatura ambiente, até que se observasse a saída total do corante.

3.3.3. Coloração do gel

O gel foi corado com "Coomassie Brilliant Blue" (SIGMA) a 0,25%, em metanol 5% e ácido acético a 10%, durante 2h., à temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida o mesmo foi submetido à descoloração com solução contendo 50% de metanol comercial e em 10% de ácido acético glacial, até que foi possível a evidencição das bandas de proteínas.

Como marcadores de peso molecular foi usado o kit de baixo peso molecular da Pharmacia cod. nº 17.0446.

3.4. ANTISORO

Foi preparado antissoro anti-K99-F41, em coelhos adultos por uma inoculação intramuscular dos antígenos K99-F41 semi-purificados, emulsionados em adjuvante completo de Freund. Duas inoculações de reforço, foram feitas com intervalo de 25 dias, na dosagem de 100µg de antígeno, emulsionado em adjuvante incompleto de Freund. Após 30 dias da última inoculação, os animais foram sangrados, e o soro obtido foi conservado a -20°C, em aliquotas de 3ml.

3.5. PREPARO DA VACINA

Os antígenos K99-F41 semi-purificados assim preparados foram emulsionados em adjuvante oleoso.

A homogeneidade da emulsão, cuja composição e proporção dos componentes se encontram abaixo, foi controlada através de contraste de fase e estabilidade em água. Tal emulsão foi preparada de modo a conter aproximadamente 1500 unidades hemaglutinantes (UH), 750 UH e 300 UH dos antígenos K99-F41 por dose de vacina (4ml).

=====

PREPARO DA EMULSÃO

Fases	Composição	Proporção
aquosa 40%	Antígenos K99 e F41	98,0%
	Thimerosol	2,0%
oleosa 60%	óleo mineral	82,3%
	Arlacel	16,3%
	Tween 80	1,4%

=====

3.6. IMUNIZAÇÃO DOS BOVINOS (VACAS PRENHAS)

A utilização de vacas prenhas neste experimento foi realizado com a colaboração de Centro Nacional de Gado de Corte, EMBRAPA, MG, através da Dra. Maria Aparecida M. Shenk.

Foram utilizadas 89 vacas prenhas de 7 meses de gestação em média, as quais foram divididas em lotes, sendo o 1º lote de 54 vacas que foram submetidas a esquemas de vacinação e 23 vacas utilizadas como testemunhas (não vacinadas). 2º lote de 12 vacas em igual período de gestação foram divididas em 4 grupos A, B, C e D.

Foram realizados os seguintes esquemas de vacinação:

1º lote: foram inoculadas com 2 doses de vacina preparada com os antígenos K99-F41 semi-purificados, contendo 1500 UH (Unidade Hemaglutinantes).

1ª inoculação - 8 semanas antes do parto

2ª inoculação - 2 semanas antes do parto

2º lote: foram inoculadas com diferentes quantidades de UH dos antígenos K99-F41, inoculadas no período identico ao 1º lote.

Grupo A: Inoculações de vacina contendo 1500 UH (Unidades Hemaglutinantes)

Grupo B: Inoculações com vacina contendo 750 UH (Unidades Hemaglutinantes)

Grupo C: Inoculações com vacina contendo 380 UH (Unidades Hemaglutinantes)

Grupo D: Não foram vacinadas (testemunhas). As coletas de sangue foram efetuadas nos períodos correspondentes as vacinações dos outros lotes, ou seja 8 e 2 semanas antes do parto, e por ocasião deste.

A inoculação de uma dose vacinante (4ml) contendo 1500, 750 e 380 UH dos antígenos K99-F41 foi feita por via subcutânea, na tabua do pescoço, oito semanas antes do parto, conforme mencionados acima. A dose de reforço, foi aplicada de modo semelhante 2 semanas antes do parto.

Os soros provenientes da 1ª, 2ª e 3ª, coletas, bem como dos bezerros nascidos, foram estocados a -20°C para posterior exame de conversão sorológica.

3.6.1. Coletas de sangue:

Foram realizadas 3 coletas de sangue (50 a 60ml) de cada vaca e 1 coleta de sangue dos respectivos bezerros, sendo a 1ª coleta: antes de proceder a vacinação de cada animal, inclusive do lote de vacas testemunhas, a cujos soros, após separados foi adicionado azida sódica, sendo os mesmos armazenados a -20°C , para posterior verificação de conversão sorológica.

2ª coleta: foi realizada por ocasião da 2ª inoculação de cada animal, incluindo aqueles do lote testemunha, os soros foram separados e armazenados conforme descrito acima.

3ª coleta: ocorreu na ocasião do parto, os soros foram separados e armazenados conforme citado.

Bezerros: foi realizada uma coleta de sangue 2 dias após mamarem o colostro, os soros foram separados e armazenados por procedimento igual ao das vacas.

3.7. DESAFIO DOS BEZERROS

Os bezerros provenientes dos lotes A, B, e C (mencionados no item 3.6) que mamaram o colostro, foram submetidos a inoculações de 200ml (10^9 bactérias/ml) de cultura de *Escherichia coli* K79⁺STa⁺ por via oral, a fim de serem desafiados.

Os bezerros provenientes do lote D foram privados do colostro e desafiados imediatamente após o nascimento como descrito acima, sendo mantidos com aleitamento artificial, e realizada a coleta de sangue 18 horas após o nascimento.

De todos os bezerros mencionados foram coletadas amostras de fezes, para posteriormente serem semeadas em meio de MacConkey e 5 destas colônias foram então isoladas e examinadas para a detecção e identificação de *E.coli* enterotoxigênica ETEC (K79⁺F41⁺STa⁺).

3.8. TESTES SOROLÓGICOS

Os soros coletados das vacas vacinadas e dos respectivos bezerros foram testados através de imunodifusão dupla em gel de ágar e do ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.8.1. Imunodifusão dupla

A imunodifusão dupla (ID), foi realizada de acordo com as indicações de Duchterlong 1950. Uma camada de 0,15cm de espessura de agar Noble (DIFCO) a 1%, em salina fisiológica contendo 3mM de azida sódica (Riedel), foi feita sobre uma lâmina de vidro (7,5 x 2,5cm). Os orifícios no gel foram feitos com molde próprio para este fim, sendo a distância entre os orifícios padronizadas, onde foram aplicados 20ul das diferentes diluições dos soros em estudo diluídos de 1:2 a 1:64 e no orifício central os antígenos K79-F41.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 24 horas à temperatura ambiente, lavadas com salina fisiológica, secas e coradas com solução de "Coomassie Brilliant Blue".

3.8.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Foram utilizadas microplacas flexíveis de 96 cavidades com fundo chato da Hemobag.

O teste de ELISA foi realizado pelo método direto de acordo com o procedimento indicado por Voller et alii 1976.

As seguintes condições gerais foram adotadas tanto na titulação em bloco dos imunoreagentes como na aplicação do ELISA direto na quantificação dos anticorpos dos soros teste.

Entre todas as fases da reação as microplacas passaram por 3 lavagens de 2 min. cada uma com o Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,4 acrescido de Tween 20 0,05% (PBS/T). A placa lavada podia ser usada imediatamente ou conservada à -20°C por várias semanas antes do teste.

Com o intuito de bloquear os sítios ainda disponíveis nas placas, foram adicionados 100µl de PBS/T/NaCl contendo 1% de BSA, em cada cavidade das placas, e incubadas a 37°C durante 1h. Esta operação foi repetida em todos os testes, entre as fases das reações antígeno-soro-conjugado. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

3.8.2.1. Titulação em bloco do antígeno, soro e conjugado.

Os antígenos K99-F41 semi-purificados foram diluídos 1/1000 em Tampão Carbonato/Bicarbonato 0,25M pH

9,6. Foram adicionados 100µl desta diluição às cavidades da microplaca para adsorção dos antígenos, sendo a mesma incubada a 4°C durante 18h em câmara úmida.

Os soros controles (positivos e negativos) diluídos em Tampão TEAN pH 7,4 contendo 0,003M de azida sodica, segundo Miwatani, 1986, e testados nas diluições que variaram de 1/10 a 1/10.240, foram distribuídos 100µl de soro de cada diluição na microplaca, que foi então incubada a 37°C por 1h em câmara úmida e bloqueada com PBS/T/NaCl contendo 1% de BSA conforme descrito acima.

O soro de coelho anti-IgG bovina conjugado com peroxidase (SIGMA), foi diluído 1/10.000 em tampão TEAN pH 7,4, e adicionados 100µl em cada cavidade da placa, exceto à coluna 12 (controles do substrato), posteriormente a placa foi incubada à 37°C por 1h.

A solução do substrato contendo Tampão Ácido cítrico/Fosfato 0,1M pH 5,6 (substrato enzimático), foi adicionado no momento do uso 0,04% de orto fenilenodiamina (OPD) e 0,15% de H₂O₂ (30 volumes) e foram distribuídos 100µl deste revelador em todas as cavidades da placa, sendo a mesma mantida em temperatura ambiente até o aparecimento da tonalidade amarela nítida. Neste momento, as reações foram bloqueadas pela adição de 50µl de NaOH 3M. Após a leitura a placa foi imersa em solução de hipoclorito de sódio a 1%.

A reação pode ser lida visualmente, onde os soros controles positivos devem mostrar coloração amarela intensa e os soros controles negativos coloração amarela nitidamente mais fraca que a dos controles da reação constituído pelo substrato enzimático.

As diluições do antígeno (1:1000), do soro (1:1500) e do conjugado (1:10.000), foram consideradas as ideais para o ensaio nas quais era obtida a maior discriminação entre o soro positivo e negativo.

3.8.2.2. Aplicação do ELISA direto na quantificação dos anticorpos anti-K99-F41 dos soros teste.

Todos os soros foram ensaiados em diluição única (1:1500) e os resultados foram expressos em relação aos controles positivo e negativo presentes em cada placa.

Leitura e interpretação foi feita visualmente, como descrito no item anterior.

4. RESULTADOS

O cultivo da amostra de *Escherichia coli* B41, em meio de Minca, foi ensaiada através da prova de microhemaglutinação manose resistente (MHMR) frente as hemácias de cavalo e cobaio, onde observamos um título de 1/512 (UH) com a hemácia de cavalo (K99) e 1/256 com a hemácia de cobaio (F41), considerado satisfatório para a sua utilização na semipurificação dos antígenos K99-F41.

Considerando-se o volume inicial de preparo bruto dos antígenos K99-F41, atividade específica, atividade MHMR, o rendimento do processo de semipurificação utilizado foi de 66% (dados não mostrados).

Através da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, verificamos, (dados não mostrados), que os antígenos K99-F41 após tratamento com DOC solúvel mostraram as 2 bandas protéicas que apresentaram mobilidades relativas próximas dos padrões 10.000 e 30.000 daltons, sugerindo tratar-se dos antígenos K99 e F41, respectivamente. Esta preparação, quando avaliada por imunodifusão dupla apresentou reação apenas com o antissoro anti-K99-F41, não apresentando nenhuma reação cruzada com o antissoro anti-K88 e anti F42, demonstrando a presença dos antígenos K99-F41, e a especificidade da reação.

4.1. TESTES SOROLÓGICOS

4.1.1. Imunodifusão dupla

Todos os soros provenientes das vacas vacinadas (dose de 1500UH) e não vacinadas, ou seja antes da 1ª dose de vacia, logo após a 2ª dose de vacina, e na ocasião do parto, bem como os soros dos bezerros foram examinados através da prova de imunodifusão dupla frente aos antígenos K99-F41 semi-purificados, os soros em questão variando em diluições de 1:2 a 1:64 foram usados nesta prova, os resultados deste experimento são mostrados nas tabelas 1 e 3, figuras 1 e 2. A Fig. 3 mostra esta reação ensaiada com o soro de n° 2012 que apresentou título de 1:4 para os soro de 2ª coleta, 1:64 para o soro de 3ª coleta e 1:16 para o soro do respectivo bezerro.

Tabela 1 - Resultados obtidos através do teste de Imunodifusão dupla, do grupo de vacas vacinadas, com 1500 UH de antígenos K99-F41.

Coleta de Soro				
Nº	(a)	(b)	(c)	(d)
Controle	1a	2a	3a	Bezerro
1092	0 (e)	2	32 (f)	8
1103	0	0	0	0
1111	0	0	0	8
1113	0	0	8	0
1114	0	0	32	16
1119	0		4	8
1134	0	0	4	(g)
1147T	0	0	0	0
1157T	0	0	0	0
1168	0	4	32	16
1174	0	16	32	16
1191	0	8	32	16
1211	0	0	64	32
1224T	0	0	0	0
1265	0	0	0	8
1268	0	4	32	
1281	0	0	0	
1286	0	0	8	
1287T	0	0	0	0
1300	0	0	0	
1302	0	0	8	0
1334	0	2	16	8
1344	0	0	8	0
1351T	0	0	0	0
1353	0	0	4	4
1591	0	0	4	8
1600	0	0	0	0
1605	0	16	16	16
1612T	0	0	0	0
1623		0	0	0
1624	0	0	8	16
1636	0	0	8	0
1638T	0	0	0	0
1659	0	0		
1666	0	0	8	
1693T		0	0	0
1694	0	0	8	
1715T	0	0	0	0

continuação tabela 1

1748		0	8	16
3765	0	0	32	16
1771	0	16	32	16
1773T	0	0	0	0
1777T	0	0	0	0
1789	0	0	0	
1798	0	0	4	16
1803T	0	0	0	0
1809	0	0	16	8
1821	0	16		16
1824	0	0	4	8
1837	0	4	8	
1842	0	4	16	16
1846	0	4	16	32
1852	0	0	32	4
1874	0	0	64	64
1880	0	0		
2012	0	4	64	16
2016	0	0	4	8
2026T	0	0	0	0
2041	0		4	
2060T	0	0	0	0
2078	0	0	0	
2096	0	0	0	16
2122		0	0	0
2150T	0	0	0	0
2186T	0	0	0	0
2261T	0		0	0
2300	0	0	0	8
2308		8	0	8
2341T	0	0	0	
2350T	0	0	0	0
2362	0	0	64	
2428	0	8	16	
2432T	0	0	0	0
2502T	0	0	0	0
2524	0		0	8
2556T	0	0	0	0
2562T	0	0	0	0

a) soro coletado antes da 1ª dose de vacina

b) soro coletado antes da 2ª dose de vacina

c) soro coletado logo após o parto

d) soro coletado de bezerro

e) reação negativa em imunodifusão dupla

f) título ou nº de diluição do soro em que se observou
ainda a formação da linha de precipitação em
imunodifusão dupla

g) não foi remetido o soro

IMUNODIFUSÃO DUPLA

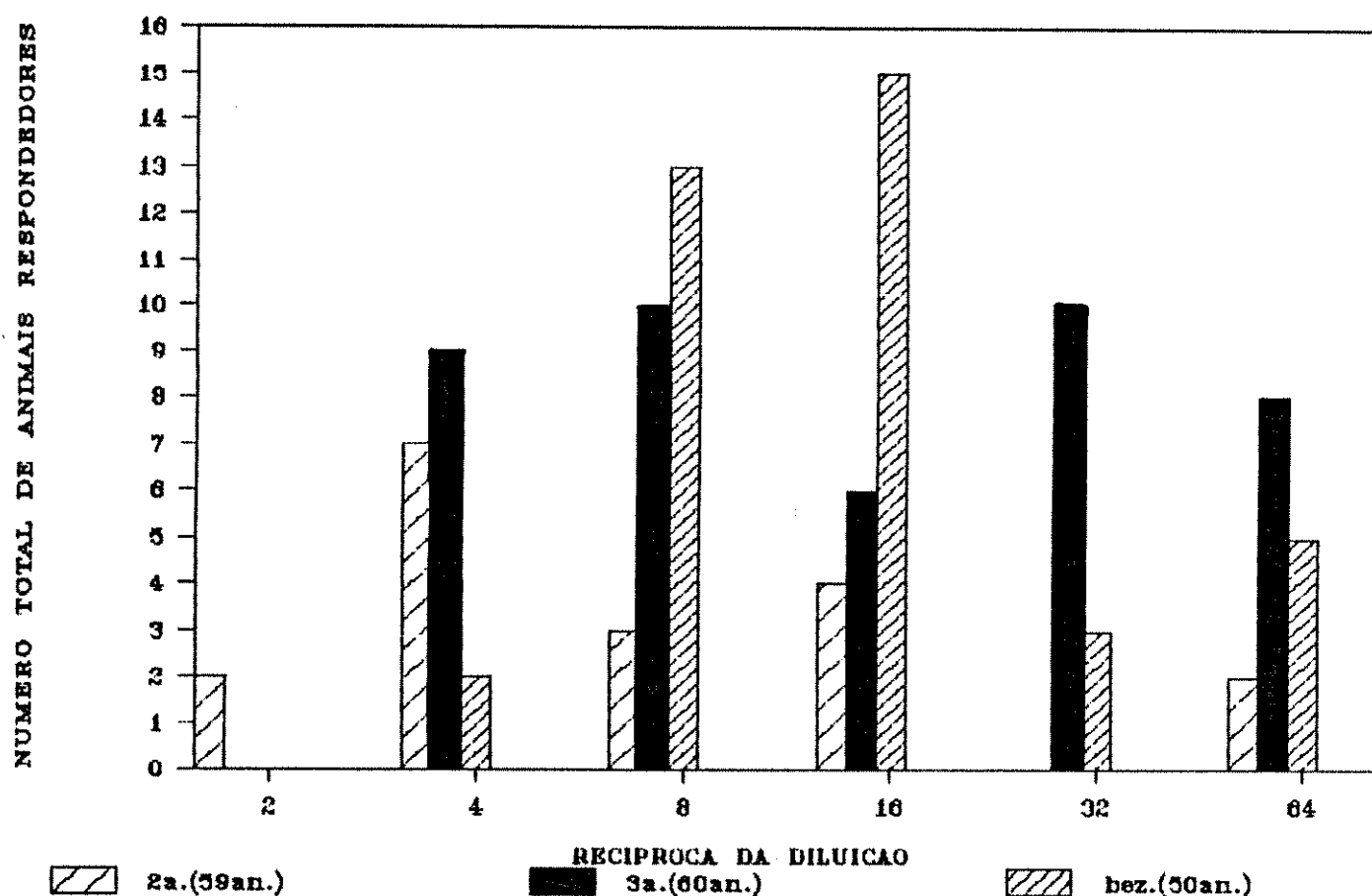


Figura 1- Representação do número de animais respondedores através do ensaio de imunodifusão dupla nas diluições de 1/2 a 1/64.

1ª coleta de sangue (antes da 1ª dose de vacina)

2ª coleta de sangue (após a 1ª dose de vacina)

3ª coleta de sangue (após a 2ª dose de vacina)

coleta de sangue dos bezerros (após mamarem o colostro)

Vacas vacinadas com 1500UH

IMUNODIFUSÃO DUPLA

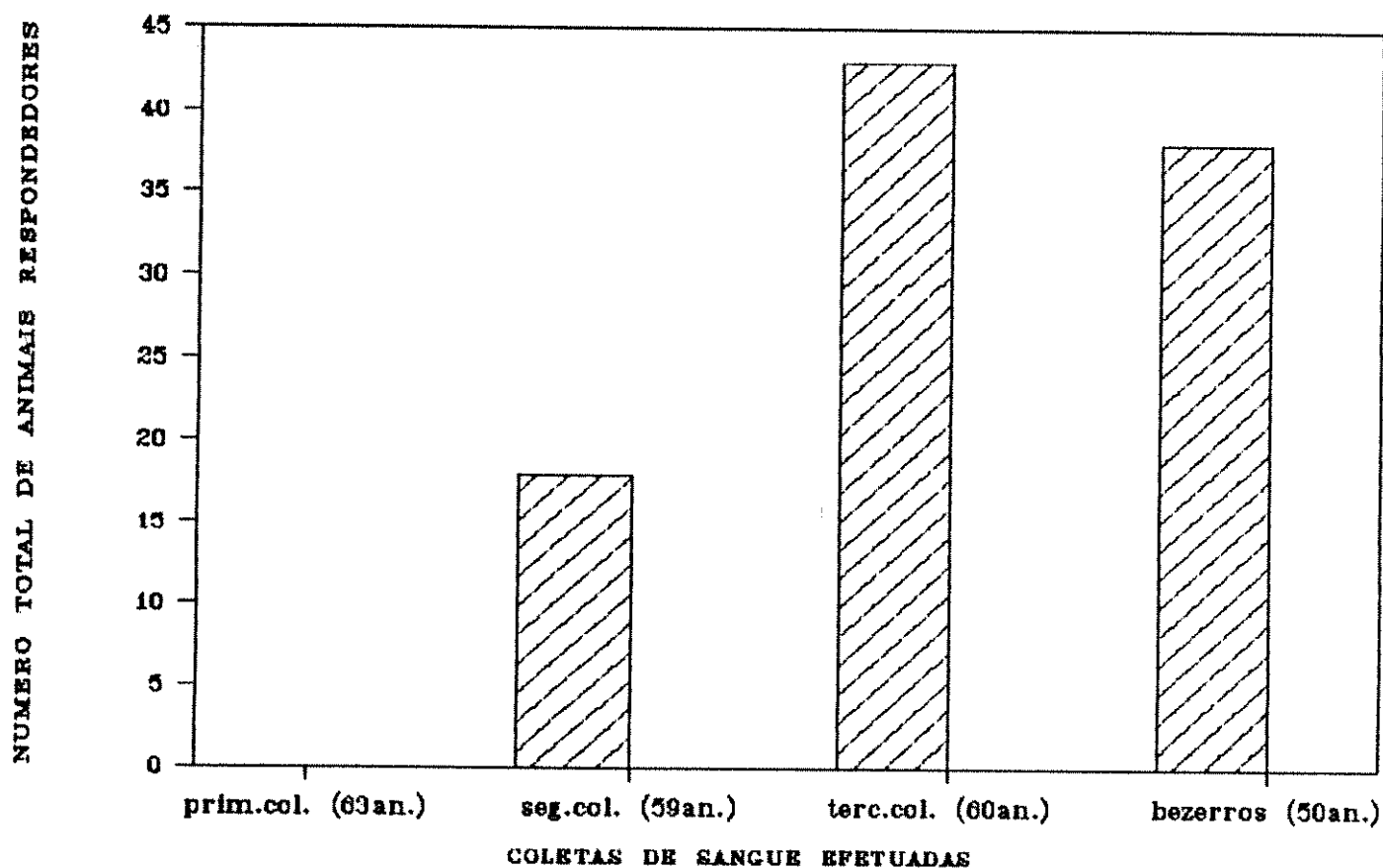


Figura 2 - Representação do resultado obtido no teste de imunodifusão dupla das diferentes coletas de sangue das vacas vacinadas (dose de 1500UH) e seus respectivos bezerros.

1ª coleta (antes da 1ª dose de vacina)

2ª coleta (após 1ª dose de vacina)

3ª coleta (após 2ª dose de vacina)

Bezerros (após mamarem o colostro)

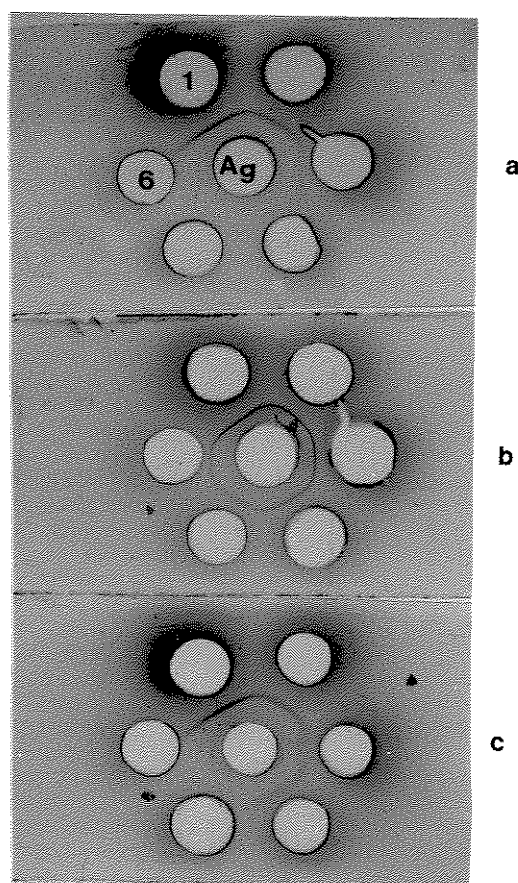


Fig.3 - Prova de imunodifusão dupla realizada com o soro de nº 2012, frente aos antígenos K99-F41 semi-purificados, que apresentaram os títulos:

- a) Antissoro da 2ª coleta de sangue - título 1:4
- b) Antissoro da 3ª coleta de sangue - título 1:64
- c) Antissoro do bezerro - título 1:16

1 a 6 antissoros diluídos de 1:2 a 1:64.
 Ag - Antígenos K99-F41 semi-purificados

4.1.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para o ensaio de ELISA, a reação foi lida visualmente onde consideramos na titulação dos soros controles positivos como ideais, para o padrão positivo, os que apresentaram a cor amarela intensa nítida na diluição de 1:1500 e os soros controles negativos foram considerados como ideais para este padrão, os que apresentaram coloração amarela mais pálida até a diluição de 1:20 e praticamente não diferiram do "branco" constituído pelo substrato enzimático, acima desta diluição.

De todos os soros ensaiados, em diluição única (1:1500), foram considerados positivos os que apresentaram cor amarela intensa nítida, comparados com o soro padrão positivo utilizado em cada placa, e negativo todos os soros que apresentaram cor amarela mais pálida, até a diluição de 1:20, também comparados com o soro padrão negativo utilizado em cada placa. Resultados mostrados nas tabelas 2 e 4. Fig. 4.

Tabela 2 - Resultados obtidos através do ensaio imunoenzimático (ELISA), do grupo de vacas vacinadas, com 1500 UH de antígenos K99-F41.

Coleta de Soro				
Nº	(a)	(b)	(c)	(d)
Controle	1a	2a	3a	Bezerro
1092	—	+	+	+
1103	—	(e)	—	—
1111	—	—	+	+
1113	—	+	+	+
1114	—	+	+	+
1119	—	—	+	+
1134	—	+	+	(g)
1147T	—	—	—	—
1157T	—	—	—	—
1168	—	+	+	+
1174	—	+	+	+
1191	—	+	+	+
1211	—	+	+	+
1224T	—	—	—	—
1265	—	—	+	+
1268	—	+	+	—
1281	—	—	+	—
1286	—	—	+	—
1287T	—	—	—	—
1300	—	—	—	—
1302	—	—	+	+
1334	—	+	+	+
1344	—	+	+	+
1351T	—	—	—	—
1353	—	+	+	+
1591	—	+	+	+
1600	—	+	+	+
1605	—	+	+	+
1612T	—	—	—	—
1623	—	—	+	+
1624	—	+	+	+
1636	—	+	+	+
1638T	—	—	—	—
1659	—	—	—	—
1666	—	—	+	—
1693T	—	—	—	—
1694	—	—	+	—
1715T	—	—	—	—

continuação tabela 2

1748		-	+	+
1765	-	+	+	+
1771	-	+	+	+
1773T	-	-	-	-
1777T	-	-	-	-
1789	-	-	-	-
1798	-	+	+	+
1803T	-	-	-	-
1809	-	+	+	+
1821	-	+		+
1824	-	-	+	+
1837	-	+	+	
1842	-	+	+	+
1846	-	+	+	+
1852	-	+	+	+
1874	-	+	+	+
1880	-	-		
2012	-	+	+	+
2016	-	+	+	+
2026T	-	-	-	-
2041	-		+	
2060T	-	-	-	-
2078	-	+	+	
2096	-	+	+	+
2122		-	-	+
2150T	-	-	-	-
2186T	-	-	-	-
2261T	-		-	-
2300	-	+	+	+
2308		+	+	+
2341T	-	-	-	
2350T	-	-	-	
2362	-	+	+	
2428	-	+	+	
2432T	-	-	-	-
2502T	-	-	-	-
2524	-		-	+
2556T	-	-	-	-
2562T	-	-	-	-

a) soro coletado antes da 1ª dose de vacina

b) soro coletado antes da 2ª dose de vacina

c) soro coletado logo após o parto

d) soro coletado de bezerro

e) reação negativa no ensaio de ELISA considerada quando o soro em teste for menor ou igual a 1:20.

f) reação positiva obtida através do ensaio de ELISA - na diluição de 1:1500 apresentando cor amarela intensa nítida

g) não foi remetido soro

ELISA



Figura 4 - Representação dos resultados de conversão sorológica através do ensaio imunoenzimático (ELISA), soro diluído a 1/1500.

1ª coleta (antes da 1ª dose de vacina)

2ª coleta (após a 1ª dose de vacina)

3ª coleta (após a 2ª dose de vacina)

Bezerros (após mamarem o colostro)

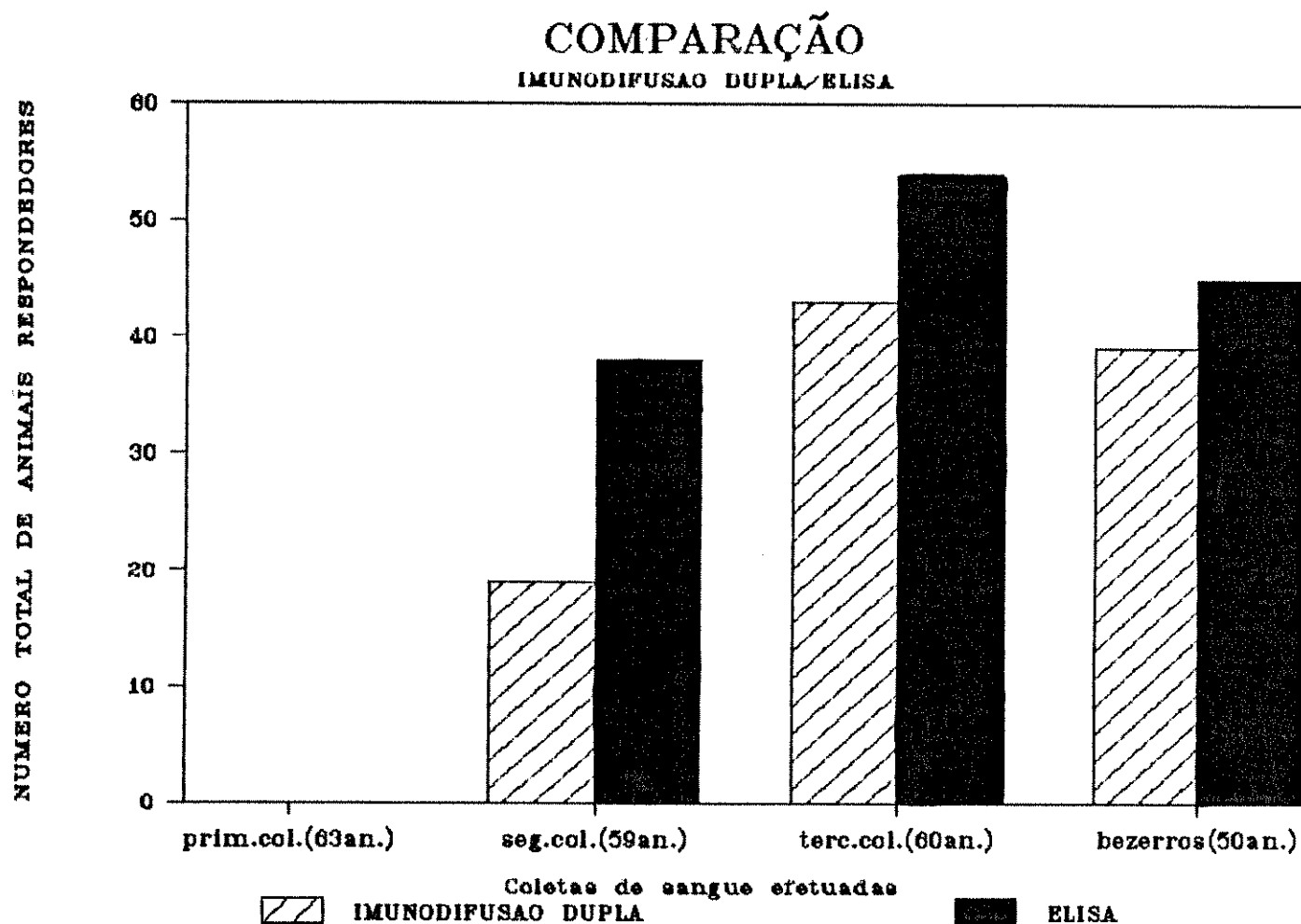


Figura 5 - Comparação entre os resultados obtidos nos testes de imunodifusão dupla e ensaio imunoenzimático (ELISA) das 3 coletas de sangue das vacas vacinadas e de seus respectivos bezerros.

4.2. DOSES DA VACINA

Com relação as doses vacinais em UH (Unidades hemaglutinantes), contidas na vacina verificou-se que a dose que melhor induziu a produção de anticorpos em vacas vacinadas e respectiva transferência destes para os bezerros foi a de 750UH.

A presença de anticorpos no soro foi avaliada através do teste de imunodifusão dupla (Tab. 3) e ensaio imunoenzimático ELISA (Tab. 4), onde se observa em ambos os casos conversão sorológica a partir da 2ª coleta de sangue. A relação dose/resposta observada para as vacinas contendo 330UH, 750UH e 1500UH foram de 21,1%, 83,2% e 15,0%, respectivamente, respectivamente conforme mostrado na Fig.6..

4.3. DESAFIO

Os resultados observados através do ensaio de desafio realizado nos bezerros, estão na tabela 3 e 4, onde podemos observar que dos 9 bezerros nascidos, 7 apresentaram soro positivo frente aos antígenos K99-F41, demonstrando claramente que houve transferência efetiva de

anticorpos anti-K79-F41, através do colostro, independente da dose vacinante, enquanto que os bezerros oriundos das vacas testemunhas apresentaram quadro clínico severo de colibacilose neonatal, ocorrendo obitos.

Tabela 3 - Resultados obtidos através do teste de desafio por imunodifusão dupla, do 2º lote de vacas vacinadas com 3 doses diferentes de vacina seus respectivos bezerros.

Coleta de soro					
Nº	(a)	(b)	(c)	(d)	
Controle	1a	2a	3a	Bez	
2147 (e)	0 (i)	0	0	16 (j)	
A 2277	0	0	0	0	
2279	0	0	4	64	
0488 (f)	0	64	32	16	
B 0577	0	16	64	64	
1118	0	64	64	64	
1117 (g)	0	0	64	64	
C 1393	0	0	64	64	
3106	0	4	0	0	
1162 (h)	0	0	0	M	
D 1337	0	0	0	M	
3009	0	0	0	0	

a) soro coletado antes da 1ª dose de vacina

b) soro coletado antes da 2ª dose de vacina

c) soro coletado logo após o parto

d) soro coletado de bezerro

e) grupo A vacinado com dose de 1500UH de antígenos K99-F41

f) grupo B vacinado com dose de 750UH de antígenos K99-F41

g) grupo C vacinado com dose de 380UH de antígenos K99-F41

h) grupo D testemunha não vacinados

i) reação negativa obtida através de imunodifusão dupla

j) título ou diluição do soro em que se observou ainda a formação da linha de precipitação em imunodifusão dupla

M) óbito

Tabela 4 - Resultados obtidos do teste de desafio através do ensaio imunoenzimático (ELISA) do grupo de 9 vacas vacinadas com 3 doses diferentes e seus respectivos bezerros.

Coleta de soro					
Nº	(a)	(b)	(c)	(d)	
Controle	1a	2a	3a	Bezerro	
2147 (e)	- (i)	-	-		+
A 2277	-	-	-		-
2279	-	-	+		+
0488 (f)	-	+	+		+
B 0577	-	+	+		+
1118	-	+	+		+
1117 (g)	-	-	+		+
C 1393	-	-	+		+
3106	-	-	-		-
1162 (h)	-	-	-		M
D 1337	-	-	-		M
3009	-	-	-		-

a) soro coletado antes da 1ª dose de vacina

b) soro coletado antes da 2ª dose de vacina

c) soro coletado logo após o parto

d) soro coletado de bezerro

e) grupo A vacinado com dose de 1500UH de antígenos K99-F41

f) grupo B vacinado com dose de 750UH de antígenos K99-F41

g) grupo C vacinado com dose de 380UH de antígenos K99-F41

h) grupo D testemunha não vacinados

i) reação negativa no ensaio de ELISA - considerada quando o soro em teste for menor ou igual a 1:20

j) reação positiva observada no ensaio de ELISA - na diluição de 1:1500 apresentando cor amarela intensa nítida.

M) óbito

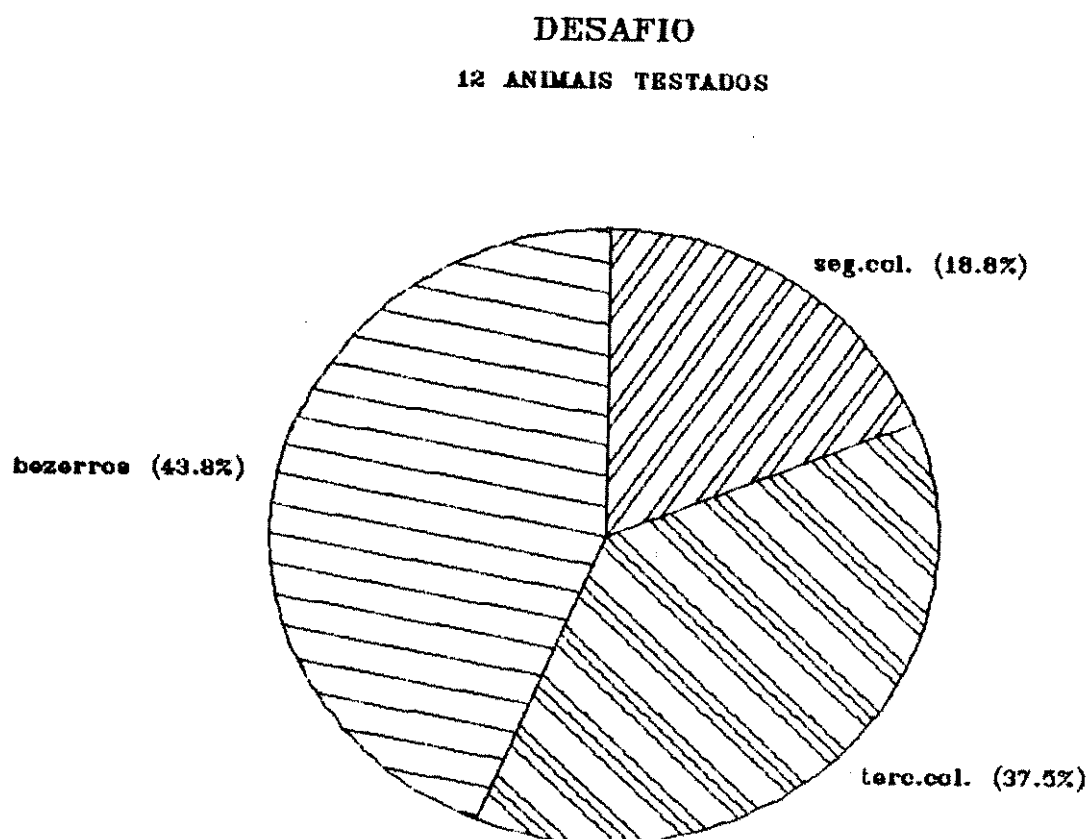


Figura 6 - Representação gráfica da proteção conferida aos bezerros através dos resultados obtidos no teste de desafio.

DESAFIO
RELACAO/DOSE RESPOSTA

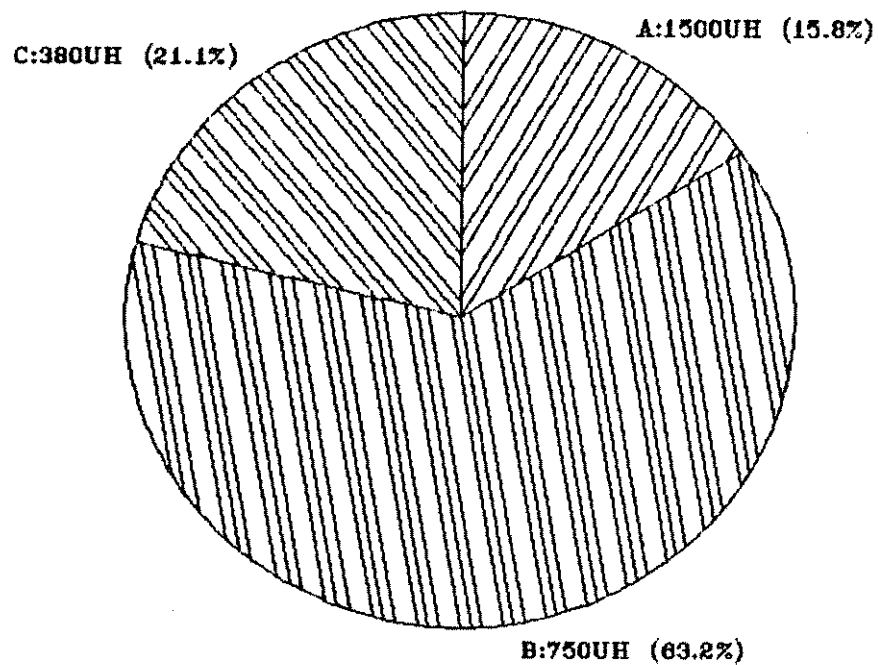


Figura 7 - Representação gráfica da relação dose/resposta obtida através do teste de desafio, pelo uso de 3 doses diferentes de vacinas

Grupo A: 1500UH

Grupo B: 750UH

Grupo C: 380UH

5. DISCUSSÃO

A observação de que a amostra de *E.coli* B41 quando cultivada em meio de Minca favorecia a expressão de uma grande quantidade dos antígenos K99-F41, está de acordo com Quinee 1977, que idealizou o uso deste meio para evitar a formação de cápsula, demonstrando a interferência desta na reação de hemaglutinação pela bactéria produtora de antígeno de aderência.

Stirm et alii 1967 descreveram métodos de extração do antígeno de aderência K88. Estes métodos quando utilizados no presente estudo para a extração dos antígenos de aderência K99-F41 demonstraram que o rendimento do processo de semi-purificação desses antígenos, por nós utilizado foi bastante alto.

Korhonen et alii 1980 descreveram que o tratamento com o desoxicolato de sódio (DOC), insolubiliza os resíduos de lipídeos e de lipoproteínas. A eliminação destes contaminantes pelo tratamento com DOC, como uma etapa da purificação dos antígenos K99-F41, demonstrou sua eficiência, considerando-se o volume inicial de preparado bruto dos antígenos K99-F41, atividade MHMR, com uma porcentagem de recuperação de 66,0%, tornando viável, a produção da vacina experimental, pois partindo-se de 5 litros de meio de cultura da amostra de *E.coli* B41,

obtivemos 300.000 UH que correspondem a 200 doses de vacinas, tomando-se como dose vacinante 1500 UH. Uma vez que o meio de Minca não é dispendioso, o custo da vacina seria bem viável.

A utilização da dose de 1500 UH como demonstrou conter uma quantidade exagerada de antígenos K99-F41, pode ter induzido o animal a um estado de tolerância imunológica e por isso uma resposta fraca (15,8%) em relação as outras doses utilizadas, como podemos observar nas tabelas 3 e 4 e fig.7, mas mesmo assim houve proteção dos bezerros desafiados desse grupo, que não apresentaram sintomas da doença. A dose que melhor induziu a produção de anticorpos em vacas vacinadas e a respectiva transferência destes para os bezerros foi a de 750 UH (63,2%) (tab.3 e 4, fig.7), aumentando desta maneira a viabilidade econômica da vacina. Em outras palavras a quantidade de doses de vacinas, com os mesmos 5 litros de cultura bacteriana para 300000 UH seria agora de 400 doses de vacina. Em relação a dose de 380 UH podemos observar na Fig.7 que a relação dose/resposta foi de 21,1%, que também houve transferência de anticorpos para os bezerros, protegendo-os no teste de desafio, demonstramos dessa maneira que com uma dose menor também é possível prevenir os bezerros da doença, aumentando ainda mais a viabilidade da vacina.

Através do ensaio de imunodifusão dupla (Tab. 1,3 e Fig.4), observamos que a maioria dos animais vacinados, independente do lote, demonstraram a presença de anticorpos frente aos antígenos K99-F41 semi-purificados nos soros obtidos de 2ª e 3ª coleta e bezerros, e os soros coletados antes da 1ª imunização, não apresentaram conversão sorológica.

Pode-se observar também nas tabelas 1 e 2 que os soros obtidos dos grupos de vacas testemunhas e dos respectivos bezerros, apresentaram reações negativas na prova de imunodifusão dupla frente aos antígenos K99-F41.

Observamos que dos 63 bezerros nascidos de vacas vacinadas 39 (60,3%) apresentaram reação sorológica positiva, demonstrando claramente que houve transferência efetiva de anticorpos anti K99-F41, através do colostro, independente da dose de vacina utilizada, dados esses observados em uma prova bastante limitada quanto a sua sensibilidade, que é a prova de imunodifusão dupla.

Mesmo através do ensaio de imunodifusão dupla foi possível revelar a presença de anticorpos em soros de alguns bezerros cujas mães haviam apresentado resultado negativo no mesmo teste (soros de nº 1111, 1265, 2096, 2300, 2524). Esta afirmativa reforça a demonstração de que os anticorpos anti-K99-F41 são transferidos aos bezerros através do colostro e que este ensaio, embora com limitações, permite uma avaliação desta condição.

Quanto ao ensaio de ELISA nós observamos ser uma prova de maior sensibilidade, comparando com os resultados obtidos através de imunodifusão dupla, onde os soros foram testados nas diluições de 1:2 a 1:64, e para o ensaio de ELISA os soros foram diluídos a 1:1500, com esta diluição, foram confirmados os soros que apresentaram reação positiva através de imunodifusão dupla em gel e revelados outros, que nesta prova não eram detectados.

De um total de 259 soros considerando 2ª e 3ª coletas e soro dos bezerros, na prova de imunodifusão dupla foram detectados 101 (39,97%) soros que apresentaram reação positiva e através do ensaio de ELISA, este número aumentou para 135 (52,73%), ou seja 13,74% mais, sendo que a diluição usada neste ensaio foi em média 70 vezes maior do que as diluições usadas na prova de imunodifusão dupla (Fig. 5).

A imunodifusão dupla tem sido a técnica mais usada pela sua relativa facilidade e simplicidade, permitindo a análise de um grande número de amostras, apesar da desvantagem de apresentar baixa sensibilidade e da não quantificação de anticorpos. A utilização do ensaio imunoenzimático no Brasil, ainda não aplicado, para esse tipo de trabalho demonstrou ser eficiente quanto a sua sensibilidade podendo ser usada para testes de rotina na detecção de anticorpos anti-K99-F41, em soros bovinos.

Estudos epidemiológicos indicam que mais de 80% dos casos clínicos causados por ETEC K99⁺F41⁺ ocorre em bezerros jovens com menos de 4 dias de idade e que esses animais são sensíveis a colonização por ETEC somente durante um período imediatamente após o nascimento (Acres & Radostits 1977, de Leeuw & Baanvinger 1980, Moerman & Tiessink 1982, Sherwood & Lawson 1983), sugerem dessa maneira ser possível prevenir a doença através da estimulação da formação de anticorpos protetores no colostro, que poderiam ser transferidos para o intestino delgado dos bezerros durante o período de sensibilidade.

Nós observamos a prevenção da colibacilose em bezerros recém nascidos, através de ensaio de desafio, demonstrando que a imunização de vacas prenhas, com a vacina oleosa contendo os antígenos K99-F41, protege os bezerros que delas mamarem o colostro e confirmada a transferência de anticorpos, uma vez que, os bezerros nascidos de vacas vacinadas e que mamaram o colostro não apresentaram diarreia característica da colibacilose, quando desafiados, enquanto que os bezerros oriundos do grupo de vacas testemunhas, apresentaram quadro clínico severo de colibacilose neonatal, ocorrendo inclusive óbitos.

Podemos observar os resultados da prova do desafio, realizada nos bezerros dos grupos A,B,C e D, nas tabelas 3 e 4 e figuras 6 e 7, onde verificamos que, 77%

dos bezerros nascidos de mães vacinadas, apresentaram reação sorológica positiva frente aos antígenos K99-F41, demonstrando claramente a transferência efetiva de anticorpos anti K99-F41, através do colostro, independente da dose utilizada. Essa transferência foi confirmada através dos bezerros nascidos de vacas testemunhas, que quando desafiados apresentaram quadro clínico severo de colibacilose neonatal, sendo que dos 3 bezerros 2 morreram.

No que diz respeito à dose de vacina utilizada, os animais do grupo B, que foram vacinados com 750 UH de antígenos K99-F41, a partir da 2ª coleta, isto é antes da 2ª dose já apresentavam conversão sorológica, demonstrando dessa maneira que 750 UH são suficientes para proteger os bezerros da colibacilose.

Os experimentos acima mencionados revelaram ainda que a referida vacina é inócua para vacas prenhas, não provocando nenhum efeito colateral (Dra. Maria Aparecida M. Shenk, comunicação pessoal) e mostrando um excelente comportamento como imunógeno na proteção de bezerros contra a colibacilose neonatal. Podendo ser recomendada como um método eficiente, pouco dispendioso e que provavelmente será capaz de controlar grande parte de casos de colibacilose neonatal em bezerros que tantos prejuízos te trazido a pecuária bovina, tanto em relação ao gado de corte, como de leite, em especial esta última

„ Por outro lado a metodologia para produção da vacina é relativamente simples podendo ser facilmente adaptada para a produção em massa e respectiva absorção por indústrias nacionais de produtos veterinários que se dedicam a produção de outros imunógenos.

6. CONCLUSÕES

1. Concluimos que, os métodos de semi-purificação dos antígenos K99-F41, mostrou um bom rendimento para a sua utilização na produção da vacina oleosa contra colibacilose bovina e na aplicação de testes sorológicos;

2. A produção da vacina, com os referidos antígenos, mostrou-se bastante rentável, pouco dispendiosa, sendo deste modo facilmente adotada pela indústria nacional;

3. A vacina mostrou-se inócua para vacas prenhas, pois não provocou nenhum efeito colateral;

4. A dose de vacina que contém 750 UH demonstrou ser mais eficiente e rentável;

5. Pudemos observar a eficiência da vacina, através da transferência dos anticorpos aos bezerros, pelo colostro, comprovada pelo teste de desafio;

6. A avaliação através do ensaio imunoenzimático (ELISA) pela alta sensibilidade, permite a sua utilização para detecção de anticorpos anti-K99-F41, em soros bovinos.

7. RESUMO

No presente estudo, os antígenos K99-F41, de *Escherichia coli* de bovinos, foram semi-purificados através de extração por aquecimento, precipitação com sulfato de amônia, tratamento com desoxicolato de sódio para uso na produção de vacina oleosa contra a colibacilose bovina. Foram preparadas vacinas contendo dose antigênica de 1500 UH (Unidades hemaglutinantes), 750 UH e 380 UH, sendo que a vacina contendo 750 UH foi a que melhor induziu a produção de anticorpos e respectiva transferência destes para os bezerros. A eficiência da vacina foi avaliada através do teste de imunodifusão dupla e ensaio imunoenzimático (ELISA), demonstrou conversão sorológica na 2ª, 3ª coleta e bezerros. De um total de 259 soros de bovinos testados, pelos dois métodos, 101 apresentaram resultado positivo na imunodifusão dupla e 135 pelo ELISA. A transferência de anticorpos, através do colostro para os bezerros, foi confirmada através do teste de desafio, onde bezerros nascidos de vacas não vacinadas apresentaram sintomas clínicos característicos da doença, ocorrendo inclusive óbitos e bezerros de mães vacinadas nada sofreram. A referida vacina é inócua para vacas prenhas, não provocando nenhum efeito colateral e mostrou ser um excelente imunógeno, pois pelo teste de desafio foi

demonstrada sua eficiência. A padronização do ELISA para a detecção dos antígenos K99-F41 demonstrou ser 70 vezes mais sensível, que a prova de imunodifusão dupla, podendo ser de grande utilidade na aplicação para testes de rotina na detecção de anticorpos anti-K99-F41, em soros bovinos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACRES, S. D. enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Newborn Calves: A Review. J. Dairy Sci. 68:229. 1985
- ACRES, S. D.; FORMAN, A. J. & KAPITANY R. A. Antigen-extinction profile in pregnant cows, using a K99-containing whole-cell bacterin to induce passive protection against enterotoxigenic colibacillosis of calves. Am. J. Vet. Res, 43:569. 1982.
- ACRES, S. D.; SAUNDERS, J. R. & RADOSTITS, O. M. Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: The prevalence of enterotoxigenic *E. coli*, reo-like (rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds. Can. Vet. J. 18:113. 1977.
- ALDERETE, J. F. & ROBERTSON, D. C. Purufication and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 19:1021. 1978.
- BELLAMY, J. E. C. & ACRES, S. D. Enterotoxigenic colibacillosis in colostrum-fed calves. Pathologic changes. Am. J. Vet. Res. 40:1391. 1979.

BELLAMY, J. E. C. & ACRES S.D. A comparison of histopathological changes in calves associated with K79⁻ and K79⁺ strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Can. J. Comp. Med, 47:143. 1983.

BELLAMY, J. E. C. & NIELSEN, N. O. Immune-mediated emigration of neutrophils into the lumen of the small intestine. Infect. Immune. 9:615. 1974.

BRINTON, C. C. Jr. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. Trans. N.Y. Acad. Sci. 27:1003. 1965.

BURGESS, M. N.; BYWATER, R. J.; COWLEY C. M.; MULLAN, N. A. & NEWSOME P. M. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. Infect. Immun. 21:526. 1978

CHAN, R.; ACRES, S. D. & COSTERTON, J. W. Use of especific antibody to demonstrate glycocalix, K79 pili, and the spatiaall relationship of K79+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in the ileum of colostrum-fed calves. Infect Immun. 37:1170. 1982.

- CONNER, G. H.; RICHARDSON, M. & CARTER, G. R. Prenatal immunization and protection of the newborn: ovine and bovine fetuses vaccinated with *Escherichia coli* antigen by the oral route and exposed to challenge inoculum at birth. *Am. J. Vet. Res* 34:737. 1973.
- CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. Hemagglutination activity and colorization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect. Immun.* 36:109. 1980.
- de GRAAF, F. K., KLEEM, P. & GAASTRA, W. Purification, characterization and partial covalent structure of the adhesive antigen K99 of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 33:877. 1981.
- de GRAAF, F. K. & ROORDA, I. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strains B41M. *Infect. Immun.* 36:751. 1982.
- de LEEUW, P. W.; ELLENS, D. J.; STRAVER, P. J.; van BALKEN, J. A. M.; MDERMAN A. & BAANVINGER T. Rotavirus infections in calves in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 29:195. 1980.

- DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. G. & CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. J. Pathol. Bacteriol. 92:107-137. 1966.
- DUGUID, J. P.; SMITH, W.; DEMPSTER, G. & EDMUNDS, P.N. Nonflagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. J. Pathol. Bacteriol. 70:335. 1955.
- EVANS, D. G. and EVANS, D. J. & PIERCE, N. F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immune. 7:873. 1973.
- FARIS, A.; LINDAHL, M. & WADSTROM, T. GM₂-like glycoconjugate as possible erythrocyte receptor for the CFA/I and K99 haemagglutinins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS. Microbiol. Lett. 7:265. 1980.
- FIELD, M.; GRAF, L. H.; LAIRD, W. J. & SMITH, P. L. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:2800. 1978.

- GUINEE, P. A. M.; & JANSEN W. H. Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine, and bovine origin; a comparative study. Zentralbl. Bakteriол. [A] 243:245. 1979.
- GUINEE, P. A. M.; VELDKAMP, J. & JANSEN W. H. Improved Minca medium for the detection of K79 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 15:676. 1977.
- GYLES, C. L. Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *Escherichia coli* strains enteropathogenic for pigs. Ann. New York Acad. Sci. 176:314. 1971.
- HADAD, J. J. & GYLES, C. L. Scanning and transmission electron microscopic study of the small intestine of colostrum-fed calves infected with selected strains of *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res. 43:41. 1982.a.
- HADAD, J. J. & GYLES, C. L. The role of K antigens of enteropathogenic *Escherichia coli* in colonization of the small intestine of calves. Can. J. Comp. Med. 46:21. 1982.b.

- HOLMES, R. K.; TWIDDY, E. M. & PICKETT, C. L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 53:464. 1986.
- HOLMGREN, J.; FREDMAN, P.; LINDBLAD, M.; SVENNERHOLM, A. M. & SVENNERHOLM, L. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. Infect. Immun. 38:424. 1982.
- HOUWINK, A. L., & van ITERSON, W. Electron microscopical observations on bacterial cytology. II. A study on flagellation. Biochim. Biophys. Acta. 5:10. 1950.
- ISAACSON, R. E. K99 surface antigen of *Escherichia coli*: purification and partial characterization. Infect. Immun. 15:272. 1977.
- ISAACSON, R. E. Factors affecting expression of the *Escherichia coli* K99 pilus. Infect. Immun. 28:190. 1980.
- JONES, G. W. & RUTTER, J. M. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. Infect. Immun. 6:918. 1972.

JONES, G. W. & RUTTER, J. M. The association of K88 antigen with haemagglutination activity in porcine strains of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 84:135-144. 1974.

JONES, G. W. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In: REISSIG, J. L. (ed), Microbial Interactions, receptors and recognition, series B, vol.3, p.139-176. Chapman and Hall, London. 1977.

KORHONEN, T. K.; NURMIAHO, E. L.; RANTA, H. & SVANBORG-EDEN, C. New method for isolation of immunologically pure pili from *Escherichia coli*. Infect. Immun. 27:569. 1980.

KORNITZER, I. & R. TAMARIN. Incidence and characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from cases of acute diarrhea in young calves in Israel. Refu. Vet. 36:87. 1979.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680 1970.

LEITE, D. G. Isolamento, purificação e caracterização de um novo fator de colonização (F42) de *Escherichia coli* enterotoxigênica de origem suína. Tese de Mestrado. UNICAMP. 1986.

LEVINE, M. M.; RENNELS, M. B.; DAYA, V.; HUGHES, T. P. Hemagglutination and colonization factor in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea. J. Infect. Dis. 141:733. 1980.

LOGAN, E. F.; PEARSON, G. R. & McNULTY M. S. Studies on the immunity of the calf to colibacillosis VII. The experimental reproduction of enteric colibacillosis in colostrum-fed calves. Vet. Rec. 1101:443. 1977.

LOGAN, E. F.; STENHOUSE A.; ORMROD D. J. & W. J. PENHALE. The role of colostral immunoglobulins in intestinal immunity to enteric colobacillosis in the calf. Res. Vet. Sci. 17:290. 1974.

MACKOWIAK, P. A. The normal microboil flora. New England Journal of Medicine. 307:83. 1982.

MEET, H.; KLOETZLEN, L. & VOGBECK, K. Fimbria-specific antibodies detach *Escherichia coli* from human cells. Infect. Immun. 40:862. 1983.

MOERMAN, A., de LEEUW P. W.; van ZIJDERVELD F. G.; BAANVINGER T. & TIESSINK, J. W. A. Prevalence and significance of viral enteritis in Dutch dairy calves. Page 228 in Proc. XII World Congr. Dis. Cattle. The Netherlands. World Assoc. Buiatrics, Utrecht, The Netherlands. 1982.

MOON, H. W. Pili as protective antigens in vaccines for the control of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. Page 390 in Proc 2nd Int. Symp Neonatal Diarrhea. S.D. Acres, ed Univ. Saskatchewan, Can. 1978.

MOON, H. W. Protection against enteric colibacillosis in pigs suckling orally in vaccinated dams: evident for pili as protective antigens. Am. J. Vet. Res. 42:173-177. 1981.

MOON, H. W. Protective antigens of enterotoxigenic *E. coli*: potential in vaccine development. Page 313 in Proc. XII World Congr. Dis. of Cattle, The Netherlands. World Assoc. Buiatrics, Utrecht, The Netherlands. 1982.

MOON, H. W.; WHIPP G. C. & SKARTVEDT, S. M. Etiologic diagnosis of diarrheal diseases of calves: Frequency and methods of detecting enterotoxin and K99 antigen production by *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res. 37:1025 1976.

MOORIN, M.; LARIVIERE, S.; LALLIER, R. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. Can. J. Comp. Med. 40:220. 1976

MORRIS, J. A.; STEVENS, A. E. & SOJKA, W. J. Isoelectric point of cell-free K99 antigen exhibiting haemagglutinating properties. Infect. Immun. 19:1097-1978.

MORRIS, J. A.; STEVENS, A. E. & SOJKA, W. J. Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from *Escherichia coli* B41. J. Gen. Microbiol. 99:353. 1977.

MORRIS, J. A.; THORNS, C.; SCOTT, A. C.; SOJKA, W. J. & WELLS, G. A. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41), produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. Infect. Immun. 36:1146. 1982.

- MORRIS, J. A.; THORNS, C. J. & SOJKA, W. J. Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain *Escherichia coli* 841. J. Gen. Microbiol. 118:107. 1980.
- MORRIS, J. A.; THORNS, C.; WELLS G. A. H.; SCOTT A. C. & W. J. SOJKA. The production of F41 fimbriae by piglet strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack K88, K99 and 937P fimbriae. J. Gen. Microbiol. 129:2753. 1983.
- MORRIS, J. A.; WRAY, C. & SOJKA, W. J. Passive protection of lambs against enteropathogenic *Escherichia coli*: role of antibodies in serum and colostrum of dams vaccinated with K99 antigen. J. Med. Microbiol. 13:265. 1980.
- MYERS, L. L. Enteric colibacillosis in calves: Immunogenicity and antigenicity of *Escherichia coli* antigens. Am. J. Vet. Res. 39:761. 1978.
- NAGY, B.; MOON, H. W. & ISAACSON, R. E. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. Infect. Immun. 13:1214. 1976.

NAGY, B., MOON, H. W. & ISAACSON, R. E. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*: selection of piliated forms in vivo, adhesion of piliated forms to epithelial cells in vitro, and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *Escherichia coli* Infect. Immun. 16:344. 1977.

ORSKOV, I. & ORSKOV, F. Serology of *Escherichia coli* fimbriae. Prog. Allergy 33:80

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; JANN, B. & JANN, K. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriol. Rev. 41:667. 1977.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SMITH H. W. & SOJKA W. J. The establishment of K97, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B 83:31

OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis, Progs. Allerg, 5:78. 1958.

POHL, P.; LINTERMANS, P.; KAECKENBEECK, A.; de MOL, P.; van MUYLEM, K & SCHOTTE, M. Existence the differents types d'*Escherichia coli* pathogenes pour l'intestin du veu. Ann. Med. Vet. 127:37. 1983.

PORTE, P.; KENWORTHY, R. & ALLEN, W. D. Effect of oral immunization with *Escherichia coli* antigens of postweaning in the young pig. Vet. Rec. 95:97. 1974.

PORTER, P. Adoptive immunization of the neonate by breast factors. Page 197 in Immunology of breast milk. P. L. Ogra and D. Dayton, ed. Raven Press, New York, NY. 1979.

REITER, B.; MARSHALL, V. M. & PHILIPS, S. M. The antibiotic activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system in the calf abomasum. Res. Vet. Sci. 28:116.1980

REITER, B. Review of the progress of the dairy science: antimicrobial system in milk. J. Dairy Res. 45:131 1978.

- RUNNELS, P. L.; MOON, W.; & SCHNEIDER, R. A. Development of resistance with host age to adhesion of K99⁺ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 28: 298. 1980.
- RUTTER, J. M. *Escherichia coli* infections in piglets, pathogenesis, virulence and vaccination. *Vet. Rec.* 96: 171 1975.
- SAEED, A. M.; SRIRANGANATHAN, N.; COSAND, W. & BURGER, D. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin from bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40:701, 1983.
- SACK, R. B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 29:333. 1975.
- SHERWOOD, D.; SNODGRASS, D. R. & LAWSON, G. H. K. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves in Scotland and northern England. *Vet. Rec.* 113:200. 1983.

SIVASWAMY, G. & GYLES, C. L. The prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the feces of calves with diarrhea. Can. J. Comp. Med. 40:241. 1976.

SMITH, H. W. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. J. Pathol. Bacteriol. 90:425. 1965.

SMITH, H. W. & GYLES, C. L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol. 3:387. 1970

SMITH, H. W. & HALLS, S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves lambs and rabbits. J. Pathol. Bacteriol. 93:499. 1967.

SMITH, H. W. & HALLS, S. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. J. Pathol. Bacteriol. 93:531. 1976.

SMITH, H. W. & HUGGINS, M. B. Experimental infection in calves, piglets and lambs with mixtures of invasive and enteropathogenic strains of *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. 12:507. 1977.

SMITH, H. W. & HUGGINS, M. B. The influence of plasmid-determined and other characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs. J. Med. Microbiol. 11:471. 1978.

SMITH, H. W. & LINGGODD, M. A. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: The transmissible nature of the enterotoxin and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. J. Med. Microbiol. 5:243. 1972.

STIRM, G.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. & MANCA, B. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. II-Isolation and chemical analysis. J. Bacteriol. 93:731. 1967.

GODERLIND, O.; OLSSON, E.; SMITH, H. W. & MOLLBY, R. Effect of parenteral vaccination of dams on intestinal *Escherichia coli* in piglets with diarrhea. Infect. Immun. 36:900-906. 1982.

SOJKA, W. J. Enteric diseases in new born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. Vet. Bull. 41:509. 1971.

SOJKA, W. J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux of Animal Health. Weybridge, England. 1965.

TAKEDA, Y.; TAKEDA, T.; YANO, T.; YAMAMOTO, K. & MIWATANI, T. Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 25:978. 1979.

TSUJI, T.; OGAWA, A.; MIYATA, T.; HONDA, T. & MIWATANI, T. Common antigenic determinant in the receptor binding sites of *Escherichia coli* enterotoxin and cholera toxin. FEMS Microbiology Letters 37:345. 1986

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In: Rose, N. R. and Friedman, H., ed Manual of clinical immunology. Washington, American Society for Microbiology Cap.69, p. 506. 1976.

WILLINGER, H. & WEBER, A. *Escherichia coli* infections in domestic animals. Proc. Symp. XII Inst. Congr. Microbiol. Munich. 1978.

YANO, T.; LEITE, D. S.; CAMARGO, I. J. B. & PESTANA DE CASTRO, A. F. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. Microbiol. Immunol. 30:475. 1986

YANO, T. Um provável antígeno de aderência do tipo fímbria em amostras de *Escherichia coli* verocitotoxigênicas (VTEC) de origem bovina. Tese (Livre-Docente) Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas - S.P. 1987.

9. APÊNDICE

I. PREPARO DO MEIO DE CULTURA

1. Meio de Minca

A) solução de sais

MgSO ₄ -7H ₂ O.....	1,0	g
MnCl ₂ -4H ₂ O.....	0,1	g
FeCl ₂ -6H ₂ O.....	0,0135	g
CaCl ₂ -2H ₂ O.....	0,04	g
H ₂ O destilada q.s.p.....	100,0	ml

B) composição do meio

KH ₂ PO ₄	1,36	g
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O.....	10,1	g
Casamino Ácido.....	1,0	g
H ₂ O destilada q.s.p.....	1000,0	ml
Solução A (adicionar assépticamente).....	1,0	ml

II. PREPARO DE SOLUÇÕES USADAS NA SEMI-PURIFICAÇÃO DOS
ANTÍGENOS K99-F41 E NA PROVA DE MICROHEMAGLUTINAÇÃO
MANOSE RESISTENTE (MHMR).

1. TAMPÃO FOSFATO 1M - pH 7,4

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	268,07	g
NaH_2PO_4	137,99	g
H_2O destilada q.s.p.....	1000,0	ml

2. SOLUÇÃO DE SALINA 3M

NaCl	175,32	g
H_2O destilada q.s.p.....	1000,0	ml

3. TAMPÃO FOSFATO 0,05M - 1M DE NaCl - pH 7,2

Salina 3M (2).....	50,0	ml
Tampão fosfato 0,05M.....	7,5	ml
H_2O destilada q.s.p.....	150,0	ml

4. SALINA TAMPONADA COM FOSFATO (PBS) pH 7,4

Tampão fosfato 1M (1).....	50,0	ml
Salina 3M (2).....	50,0	ml
H_2O destilada q.s.p.....	1000,0	ml

5. SALINA TAMPONADA COM FOSFATO - D-MANOSE 0,5% (PBS-M)

D-Manose.....	0,5	g
Solução 4 q.s.p.....	100,0	ml

6. SOLUÇÃO DE ALSEVER

Glicose.....	2,05	g
Citrato de sódio.....	0,00	g
Cloreto de sódio.....	0,42	g
H ₂ O destilada q.s.p.....	100,0	ml

III. PREPARO DE SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA SDS-PAGE

1. SOLUÇÃO A: ACRILAMIDA/BIS-ACRILAMIDA

Acrilamida.....	50,0	g
N-N-Bis-Metileno acrilamida.....	1,3	g
H ₂ O destilada q.s.p.....	100,0	ml

2. SOLUÇÃO B: TAMPÃO PARA GEL INFERIOR (1,5M Tris/HCl pH 8,8)

Tris hidroximetil aminometano.....36,3 g
H₂O destilada q.s.p.....200,0 ml
HCl 12 N suficiente para acertar o pH

3. SOLUÇÃO C: TAMPÃO PARA GEL SUPERIOR (0,5M Tris/HCl pH 6,8)

Tris hidroximetil aminometano.....3,0 g
H₂O destilada q.s.p.....50,0 ml
HCl 12N suficiente para acertar o pH

4. 10% SDS

SDS.....50 g
H₂O destilada q.s.p.....500 ml

5. SOLUÇÃO D: PERSULFATO DE AMÔNIO A 2%

Persulfato de amônia.....0,5 g
H₂O destilada q.s.p.....5,0 ml

6. SOLUÇÃO E: TAMPÃO PARA OS RESERVATÓRIOS -(4 X CONCENTRADO)

pH 8,3

Tris hidroxi metil aminometano.....	12,0	g
Glicina.....	57,6	g
SDS(4).....	10,0	ml
H ₂ O destilada q.s.p.....	1000,0	ml

7. MISTURA DISSOCIANTE (2X)

Tris/HCl 0,5M, pH 6,8 (solução C).....	2,5	ml
2-mercaptoetanol.....	1,0	ml
SDS a 10% em água destilada.....	6,0	ml
Azul de bromofenol a 1%.....	0,2	ml
H ₂ O destilada q.s.p.....	10,0	ml

IV. PREPARO DE SOLUÇÕES UTILIZADAS NO ELISA.

1. TAMPÃO FOSFATO SALINA (PBS) pH 7,4

NaCl.....	8,0	g
KCl.....	0,2	g
Na ₂ HPO ₄ - 12 H ₂ O.....	2,09	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
H ₂ O Destilada q.s.p.....	1000,0	ml

Conservar a 4° C.

2. PBS/T

TWEEN 20 0,5 ml

PBS(1) q.s.p. 1000,0 ml

Conservar a 4° C.

3. PBS/T/BSA/NaCl

NaCl 2,0 g

TWEEN 80 2,0 g

BSA 1,0 g

PBS(1) q.s.p. 100,0 ml

Conservar a -20° C.

4. TAMPÃO CARBONATO-BICARBONATO pH 9,6

Na₂CO₃ 40,0 ml

NaHCO₃ 85,0 ml

H₂O destilada q.s.p. 375,0 ml

Conservar a 4° C.