

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CONTROLE DA DIARRÉIA SUÍNA NO PERÍODO DE ALEITAMENTO ATRAVÉS
DO FORNECIMENTO DE GEMAS DE OVOS DE GALINHAS
HIPERIMUNIZADAS CONTRA *Escherichia coli* SUÍNA**

LILIANE RUDNIK

**PORTO ALEGRE
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CONTROLE DA DIARRÉIA SUÍNA NO PERÍODO DE ALEITAMENTO ATRAVÉS
DO FORNECIMENTO DE GEMAS DE OVOS DE GALINHAS
HIPERIMUNIZADAS CONTRA *Escherichia coli* SUÍNA**

LILIANE RUDNIK

(Zootecnista – FIES)

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de Mestre em
Zootecnia na Área de Concentração – Produção
Animal

Porto Alegre(RS), Brasil
Março, 2003.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Agronomia, da UFRGS, pela oportunidade de realizar o curso.

À professora Andréa Machado Leal Ribeiro, pela orientação, apoio e amizade, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Cláudio Wageck Canal, pela co-orientação, sugestões e amizade.

Ao professor David Barcellos, pela colaboração no período pré-experimental.

Ao Carlos Henrique Peixoto, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Ensino Zootécnico – LEZO, Lilian, Lizandra, Lisiane, José Eduardo, Daniel, Carlos, Christine, André, Simone, Marson e João Dionísio, pela ótima convivência durante todo mestrado.

À todos os bolsistas, em especial Carolina Farias e Marisa Macagnan (CDPA), que me auxiliaram nas análises laboratoriais.

Aos professores da Universidade Federal do Paraná, Sebastião Franco e Luís M. Fedaldo pela ajuda e apoio.

À minha grande amiga Ana Paula Duarte.

Aos colegas de longa data, Rosi, Paulo e Flávio, pela grande amizade que permanece desde a Faculdade.

À Doux Frangosul, pelo fornecimento dos animais e instalações, que tornaram este trabalho viável.

À minha família.

À Deus.

CONTROLE DA DIARRÉIA SUÍNA NO PERÍODO DE ALEITAMENTO ATRAVÉS DO FORNECIMENTO DE GEMAS DE OVOS DE GALINHAS HIPERIMUNIZADAS CONTRA *Escherichia coli* SUÍNA¹

Autora: Liliane Rudnik

Orientadora: Andréa Machado Leal Ribeiro

Co-Orientador: Cláudio Wageck Canal

RESUMO

Foi estudado o efeito das gemas de ovos de aves hiperimunizadas contra *Escherichia coli* patogênica para suínos sobre a imunidade passiva (IP) de leitões recém-nascidos em uma unidade produtora de leitões (UPL). Foram avaliados densidade ótica do ELISA (DO), peso corporal (PC) e ocorrência de diarréia diária (OcD) em 137 leitões recém-nascidos oriundos de 25 fêmeas primíparas não vacinadas contra *E. coli*. De cada fêmea, foram separados 6 leitões recém-nascidos de ambos os sexos, excluindo-se os mais leves e os mais pesados, divididos em 3 tratamentos e 2 repetições. A análise estatística para DO e PC foi realizada através de ANOVA, a comparação de médias entre tratamentos pelo Lsmeans e o teste do qui-quadrado para a OcD. As gemas estavam armazenadas à -5°C, *in natura* e, minutos antes do fornecimento, foram descongeladas e diluídas em 15 mL de uma solução tampão (PBS). Os tratamentos foram fornecidos via oral, tendo sido os seguintes: T1: 2mL de PBS (controle) em 2 doses, a primeira ao nascer e a segunda 2 horas após o nascimento; T2: 2mL de gemas de ovos com título de 100.000 de anticorpos (IgY) contra *E. coli* em 2 doses, ao nascer e 2 horas após o nascimento; T3: idem ao T2, além de 2mL de gema de 3 em 3 dias até os leitões completarem 12 dias de idade. Foram realizadas duas coletas de sangue em 1 leitão/tratamento/porca: a primeira às 24 horas e a segunda aos 14 dias de idade. O título de IgY contra *E. coli* dos soros foi determinado por ELISA. A DO do ELISA dos leitões de T2 e T3 foi significativamente maior às 24 horas e aos 14 dias em relação ao controle ($P \leq 0,0001$). T3, T2 e T1 permaneceram 87, 79 e 72,5% do tempo estudado sem diarréia ($P \leq X^2 0,0001$). Os animais de T3 foram significativamente mais pesados do que os do T1 ($P \leq 0,08$), mas não diferiram de T2. Os resultados deste estudo sugerem que o uso de gemas de aves hiperimunizadas contra *E. coli* age efetivamente na prevenção da diarréia dos leitões e o seu uso contínuo é mais vantajoso do que o fornecimento somente ao nascer.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Área de Concentração Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, março de 2003. (81f.).

NEWBORN PIGLETS DIARRHEA CONTROL THROUGH THE SUPPLY OF HIPPERIMMUNIZED HEN YOLKS AGAINST SWINE *Escherichia coli*¹

Author: Liliane Rudnik

Advisor: Andréa Machado Leal Ribeiro

Co-advisor: Cláudio Wageck Canal

ABSTRACT

It was studied the effect of yolks from hipperimmunized birds against pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) for swine on the passive immunity (PI) of newborn piglets in a producer unit of piglets (PUP). It was evaluated ELISA optic density (OD), body weight (BW) and the occurrence of daily diarrhea (OcD) in 137 newborn piglets from 25 primiparous sows that were not vaccinated against *E. coli*. From each sow, 6 piglets from both sexes were separated, excluding the lighter and the heavier ones, divided in 3 treatments and 2 replications. The statistical analyses for OD and BW were done by ANOVA, the comparison of averages among treatments by Lsmeans and the chi-square was used for OcD. The yolks were stored in -5°C , *in natura*, and some minutes before usage they were defrosted and diluted in 15mL of a buffer solution (PBS). The treatments, supplied orally, were the following: T1: 2mL of PBS (control) in 2 doses, the first was given in the birth and the second 2 hours after the first dose; T2: 2mL of yolks with titer of 100.000 antibodies (IgY) in 2 doses, the first was given when they were born and the second 2 hours after birth; T3: equal to T2, besides 2mL of yolks every 3 days until piglets were 12 days old. Two blood levels were taken in 1 piglet/treatment/sow: the first 24 hours after birth and the second, 14 days after birth. The IgY serum titer was analyzed by ELISA. The OD for T2 and T3 was significantly higher in the first 24 hours and 14 days after birth compared to the control ($P \leq 0,0001$). T3, T2 and T1 remained 87, 79 and 72,5% of the studied period without diarrhea ($P \leq X^2 0,0001$). Due to the lower OcD percentage, T3 piglets were significantly heavier than T1 ($P \leq 0,08$), but did not differ from T2. The results of this study pointed to that the use of yolks from hipperimmunized birds against *E. coli* acts effectively in the prevention of the diarrhea and that the continuous usage is more effective than the supply only in the birth.

¹Master of Science dissertation in Animal Science – Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, March 2003. (81f.).

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	01
1.1 Conceitos básicos em imunologia	06
1.2 As imunoglobulinas (Igs).....	09
1.3 Comparações entre a IgY das aves e a IgG dos mamíferos	12
1.4 Imunidade passiva	15
1.5 Desenvolvimento do sistema imune no leitão	18
1.6 Imunidade da mucosa intestinal	19
1.7 Imunização passiva através do fornecimento de gemas de ovos (IgY) – uso preventivo e terapêutico.....	22
1.8 <i>Escherichia coli</i> como patógeno para suíno	27
1.9 Diarréia neonatal causada pela <i>Escherichia coli</i>	28
2. CAPÍTULO II	
2.1INTRODUÇÃO (específica).....	31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
2.4 CONCLUSÕES	48
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
4. APÊNDICES	57

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Médias e desvio padrão dos leitões no início (PI), aos 7 (P7) e aos 14 dias (P14), nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	40
TABELA 2. Valores médios e desvio padrão para a DO do ELISA no 1º e 14º dia, nos diferentes tratamentos (T1, T2 e T3)	42
TABELA 3. Freqüência observada e esperada () e percentagem da freqüência dos leitões com e sem diarreia durante os 14 dias do período experimental, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarreia*tratamento).....	44
TABELA 4. Freqüência observada e esperada () e percentagem da freqüência dos leitões que receberam antimicrobiano (colistina) durante os 14 dias do período experimental, classificados em função dos tratamentos.....	48

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Página
FIGURA 1. Diferenças estruturais entre IgY e a IgG de mamíferos	13
CAPÍTULO II	
FIGURA 2. Gráfico com os valores percentuais de dias sem ocorrência de diarreia no período experimental de 14 dias	45

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DO	Densidade ótica
PI	Peso inicial
P7	Peso aos 7 dias
P14	Peso aos 14 dias
OcD	Ocorrência de diarreia diária
E. coli	Escherichia coli
ETEC	Enterotoxigênica
EPEC	Enteropatogênica
EHEC	Enterohemorrágica
EIEC	Enteroenvasiva
nm	Nanômetro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
kg	Kilograma
g	Gramas
°C	Graus centígrados
rpm	Rotações por minuto
P	Probabilidade
CV	Coeficiente de variação
mg	Miligrama
PH	Potencial de hidrogênio
UFC	Unidades formadoras de colônia
Ag (s).....	Antígeno (s)
Ig (s)	Imunoglobulina (s)
NC	Não coletado
LSmeans	Least square means

PBS	Solução de NaCl 0,15M e Na ₂ PO ₄ 0,01M
RI	Resposta imune
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

1. CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O sistema intensivo de criação pecuária é uma realidade nos mais diversos países do mundo, desde aqueles desenvolvidos até os em desenvolvimento. Esse sistema pressupõe a existência de um grande número de animais em um espaço relativamente restrito, o qual deve ser racionalmente utilizado. Neste tipo de sistema, leva-se os animais a produzirem de acordo com o seu máximo potencial genético, através de um eficiente manejo reprodutivo e nutricional, entre outros.

A suinocultura está presente em 46% das 5,8 milhões das propriedades existentes no País, sendo predominante nas pequenas propriedades. Em 2001, foram exportados em todo o mundo 3,518 milhões de toneladas de carne suína, liderado pela União Européia, Canadá, Estados Unidos e Brasil, que saltou da 12^a posição no ranking dos exportadores para a 4^a posição. O Brasil exportou 265 mil toneladas, o que representou 7,5% do mercado mundial, um recorde até hoje para o país. O principal parceiro foi a Rússia com 57,3% dos volumes embarcados, seguem pela ordem Hong Kong (17,9%), Argentina (14,6%), Uruguai (3,2%) e

outros países, como África do Sul, Cingapura, Geórgia, Lituânia, Paraguai e Romênia os 7,0% restantes (ABCS, 2002).

Dentre alguns problemas, destaca-se o tradicional *baixo consumo de carne suína* por habitante, que no Brasil é de apenas 10,5 kg/*per capita*/ano, um índice muito abaixo do índice da China, Estados Unidos e Europa que são de 30, 31 e 44 kg/*per capita*/ano, respectivamente (Roppa, 2003). Entre os empecilhos para um aumento ainda maior nas exportações pode-se destacar restrições de ordem sanitária e os subsídios às exportações praticados por alguns países.

As maiores perdas na produção suinícola são encontradas do nascimento ao desmame. Nas criações confinadas e/ou intensivas de suínos, a eficiência da criação na fase de aleitamento pode ser avaliada pela ocorrência de diarreia, pela taxa de mortalidade e pelo ganho de peso dos leitões. As diarreias se apresentam sob forma de fezes pastosas, às vezes líquidas e, geralmente, persistem por 4 a 8 dias, mesmo com o uso de antimicrobianos convencionais (Mores *et al.*, 1991). A importância econômica dessas diarreias se deve não só pela morte dos leitões, mas principalmente pelas consequências negativas sobre o desenvolvimento, com o surgimento de refugos e pelos excessivos gastos com medicamentos para seu controle. As causas dessa mortalidade são numerosas interações entre o leitão, meio ambiente e a baixa imunidade ao nascimento, resultando em uma maior suscetibilidade a patógenos, sendo esta uma variável que leva à baixa produção (Gaskins e Kelley, 1995). A taxa de mortalidade média de leitões em aleitamento nas criações confinadas da Região Sul do Brasil, é estimada entre 15 e 20%. As medidas de controle das diarreias, baseadas no uso

de antimicrobianos, proporcionam resultados irregulares e temporariamente satisfatórios (Mores *et al.*, 1991).

As imunoglobulinas presentes na gema de ovos de galinhas (IgY) imunizadas com patógenos infecciosos têm demonstrado eficiência na prevenção de infecções. Sugita-Konishi *et al.* (1996) já mencionavam a possibilidade de isolar a IgY de gemas de ovos de aves imunizadas para 26 tipos de bactérias. As IgY agem efetivamente na terapia e profilaxia de leitões recém-nascidos infectados com a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (Zúñiga *et al.*, 1997), podendo ser usados como fonte de anticorpos de custo baixo para a imunização passiva contra doenças infecciosas (Marquardt *et al.*, 1999).

A *Escherichia coli* (ETEC) é o agente causador de diarreias nos períodos neonatal e imediatamente posterior ao desmame, aderindo ao epitélio intestinal, colonizando-o e causando um severo distúrbio intestinal nos leitões. A *E. coli* ETEC causa uma perda econômica considerável na suinocultura. Os suínos infectados apresentam sinais clínicos que podem levá-los a morte, em função de uma severa toxicidade que se segue à colonização pela bactéria no intestino delgado e a produção e liberação de quantidades abundantes de toxinas, que são capazes de interferir no fluxo de líquidos e eletrólitos entre o citoplasma celular e a luz intestinal (Zúñiga *et al.*, 1997).

O setor de produção animal faz o uso massivo de vários antimicrobianos em doses subclínicas, constituindo-se no líder mundial de consumo desses produtos. Existe uma preocupação crescente sobre o fato de que a alimentação com antimicrobianos em dietas de animais possa contribuir para a formação de

um estoque de bactérias entéricas resistentes à drogas, que são capazes de transferir a resistência para bactérias patogênicas ao homem, causando um risco à saúde pública. Além disso, nas regiões onde predominam as pequenas propriedades rurais, há um conflito entre a necessidade do aumento da escala de produção para atender as exigências da globalização da economia e a produção de alimentos agroecológicos que atendam a segurança e a qualidade dos alimentos e preservem o ambiente (Bellaver, 2000).

Este trabalho é a segunda etapa de um projeto que tem por objetivo utilizar gemas de ovos de aves hiperimunizadas contra *E. coli* suína para serem fornecidas a leitões recém-nascidos (fornecimento da gema *in natura* via oral). Na primeira etapa, foi realizada a imunização de poedeiras leves, da linhagem H&N nick chick, com 48 semanas de idade, tendo as aves sido vacinadas contra a *E. coli* na 51^a e 53^a semana de idade, e os ovos coletados a partir da 2^a vacinação (Kindlein, 2002).

Escherichia coli foi o patógeno escolhido como modelo de pesquisa. Como já foi comprovado por trabalhos anteriores que os anticorpos do soro das aves são eficientemente transferidos para a gema do ovo, tais ovos ricos em imunoglobulinas podem ser utilizados como prevenção e terapia contra as diarreias dos suínos, tanto naqueles cujo principal patógeno envolvido é a *E. coli* quanto naqueles causadas pelos demais microorganismos. Desta forma, deve ser ressaltada a importância desta técnica como modelo para a produção de ovos ricos em imunoglobulinas específicas contra outros patógenos, quais sejam: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* A tipo

1, *Streptococcus pyogenes* A tipo 3, *Streptococcus pyogenes* A tipo 5, *Streptococcus pyogenes* A tipo 8, *Streptococcus pyogenes* A tipo 12, *Streptococcus pyogenes* A tipo 14, *Streptococcus pyogenes* A tipo 18, *Streptococcus pyogenes* A tipo 22, *Aerobacter aerogens*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Propionibacter acnes*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus agalactiae* (Sugita-Konishi *et al.*, 1996).

O objetivo do trabalho foi avaliar o uso de gemas de ovos com anticorpos específicos (IgY), produzidos através da imunização de galinhas contra *Escherichia coli* suína, como forma de imunização passiva de leitões recém-nascidos em condições de granja comercial, avaliando a densidade ótica do ELISA para detectar IgY no soro destes leitões, verificar distintos padrões de fornecimento das gemas e seu efeito na ocorrência de diarreia e ganho de peso durante um período de aleitamento de 14 dias.

1.1 Conceitos básicos em imunologia

O sistema imune é composto por um conjunto de células hematopoiéticas e por moléculas que se encontram na superfície destas células, ou que são secretadas transmitindo sinais entre as mesmas. O sistema apresenta uma atividade interna, constante, que é aumentada pelo contato com macromoléculas apresentadas em um 'contexto de infecção' (Abbas, 2000).

A resposta imune (RI) pode ser convencionalmente classificada em natural e adaptativa, com o objetivo principal de discriminar os elementos envolvidos na mesma. Ambas ocorrem de forma simultânea, mas as células envolvidas e a comunicação bioquímica entre elas é diferente. Fagócitos, células natural killer e citocinas derivadas de macrófagos relacionam-se à resposta imune natural. Já a RI adaptativa possui, como elementos principais, os linfócitos T e B e as citocinas produzidas por eles, todos pertencentes ao sistema hematopoiético. Na RI adaptativa, um segundo encontro com o agente que desencadeou a resposta, induz a uma reação mais rápida e mais forte, o que é chamado de memória imunológica (Abbas, 2000).

A RI também pode ser dividida em fase indutora e fase efetora. A fase indutora é composta por uma etapa cognitiva, na qual o antígeno (Ag), que é um agente estranho ao organismo, é apresentado ao sistema imune, e por uma etapa de ativação, durante a qual o Ag provoca uma série de reações de ativação, proliferação e diferenciação celular. Na fase efetora, o sistema imune gera processos humorais e celulares que normalmente levam à eliminação do Ag (Abbas, 2000).

O sistema imune adaptativo dos vertebrados é dividido em dois segmentos funcionais; imunidade humoral e imunidade celular. A resposta imune humoral caracteriza-se pela presença de substâncias solúveis, principalmente os anticorpos, os quais são produzidos por células B, enquanto que os linfócitos T exercem um papel central no desenvolvimento da resposta imune celular (Abbas, 2000).

Os órgãos linfóides primários são os principais sítios de desenvolvimento dos linfócitos no organismo. Neles os linfócitos se diferenciam a partir de células tronco-lyfóides, proliferam-se e amadurecem em células funcionais. Nos mamíferos, as células T amadurecem no timo e as células B, no fígado durante o período fetal e na medula óssea. É nos órgãos linfóides primários que os linfócitos adquirem seu repertório de receptores antígeno-específicos, após os linfócitos migram para os órgãos linfóides secundários (periféricos). Estes tecidos secundários podem ser classificados de acordo com as regiões dos organismos que elas protegem, como baço, os linfonôdos e os tecidos linfóides associados às mucosas, incluindo amígdalas e as placas de Peyer no íleo. As respostas imunes de natureza celular e humoral ocorrem ao nível dos tecidos linfóides secundários, onde são geradas células efetoras e de memória (Roitt *et al.*, 1999).

Os linfócitos T podem ser subdivididos em 3 populações: T helper, T citotóxico e T supressores. Os linfócitos T helper têm uma função fundamental de regulação da RI, interagindo com os linfócitos B e T citotóxicos, para controlar o tipo e a intensidade da reação imune (Abbas, 2000). As células T podem ainda ser

subdivididas em 2 subpopulações não sobrepostas que participam da RI celular: linfócitos T helper (CD4+), que tem a função de induzir a resposta imune e linfócitos T citotóxicos (CD8+). Uma vez que a T CD4+ reconhece os antígenos específicos em associação à molécula de classe II do MHC (Major Histocompatibility Complex) e as células T CD8+ reconhecem os antígenos em associação às moléculas MHC de classe I, é a presença de CD4 e CD8 que limita ou restringe os tipos celulares com os quais os linfócitos T podem interagir (Roitt *et al.*, 1999). A função do MHC classe I e classe II é de apresentar antígenos estranhos aos linfócitos T-citotóxicos e são capazes de influenciar a natureza da resposta imune (Roth, 1999). Devido a algumas diferenças microanatômicas funcionais do tecido linforeticular, as subpopulações de células linfóides nos suínos, possuem diferenças em relação as outras espécies (Jonjic *et al.*, 1987). Baseados na expressão de antígenos CD4 e CD8, os linfócitos T nos suínos são divididos em 4 subpopulações: CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4+CD8+ e CD4-CD8-. A dupla positiva de linfócitos T CD4/CD8 são raramente encontradas em humanos e roedores. Nos suínos a dupla positiva e negativa CD4/CD8 compreende cerca de 40 a 60% dos linfócitos periféricos nos suínos, isso faz com que o repertório de linfócitos T nos suínos seja o mais heterogêneo de todos os mamíferos (Yang e Parkhouse, 1996 citados por Blecha, 1998). Já foram identificados 19 moléculas CD na superfície dos leucócitos suínos (Roth *et al.*, 1999). O significado funcional destas diferenças nos suínos ainda não é bem compreendido, mas pode haver uma importante implicação relacionado com o atraso no desenvolvimento da imunidade ativa (Gaskins e Kelley, 1995).

Os Ags são convencionalmente definidos como macromoléculas, com conformação diferente daquele das moléculas do organismo, e capazes de induzir uma RI. Esta definição tem sido questionada, dando ênfase ao contexto 'infeccioso ou não', no qual uma molécula é apresentada ao organismo sendo sua conformação de superfície, como determinante da ocorrência ou não de resposta, pois o sistema imune deve ser visto como um sistema autônomo, cuja existência e funcionamento independem da presença do antígeno. Os Ags podem ser classificados conforme peso, tamanho, forma ou o local de produção. Antígenos endógenos são aqueles produzidos dentro de células do hospedeiro, como os vírus ou qualquer outro parasita intracelular. Já os Ags exógenos, como as bactérias e os fungos, são produzidos fora destas células. Os antígenos convencionais são timo-dependentes, ou seja, dependem da participação de linfócitos T helper para induzir a produção de anticorpos. Por outro lado, antígenos timo-independentes (geralmente polímeros grandes com múltiplas subunidades repetidas) têm capacidade de ativar linfócitos B na ausência de T helper (Abbas, 2000).

1.2 As imunoglobulinas (Igs)

O efeito protetor da imunidade humoral é mediado por uma família de glicoproteínas: os anticorpos ou imunoglobulinas (Igs). Essas substâncias têm a capacidade de se ligar de forma específica aos antígenos na tentativa de inativá-los, tanto por ação direta como por intermédio de outros componentes do sistema imune. Eles são encontrados principalmente no soro, mas também em secreções

exócrinas e são produzidos pelos plasmócitos derivados de linfócitos B estimulados antígenicamente (Goldhardt *et al.*, 1998).

As imunoglobulinas, são proteínas tetraméricas, compostas por 2 cadeias polipeptídicas pesadas e 2 cadeias leves. As cadeias leves são unidas às pesadas, e estas entre si, por ligações bissulfídricas. Em uma molécula, as 2 cadeias leves são iguais, assim como as duas pesadas. E extremidade amino-terminal possui uma seqüência de aminoácidos única, exclusiva para cada Ig (região variável), enquanto a porção carboxi-terminal apresenta a seqüência mais constante (região constante). As Igs podem ser dividida em 5 classes ou isotipos, conforme a seqüência de aminoácidos na região constante (IgM, IgD, IgG, IgE e IgA). Cada linfócito B só pode produzir um tipo de Ig e cada Ig só pode reconhecer um epitopo ou determinante antigênico, o qual é a parte passível de ser percebida pelo sistema imune (Abbas, 2000).

A IgG é a classe de imunoglobulina predominante no soro e colostro suíno, perfazendo cerca de 60% do total. As duas principais classes de IgG são IgG1 e IgG2, a IgG1 é predominante no soro e colostro, enquanto que a IgG3 e IgG4 são encontradas em menores concentrações (Roth, 1999). A IgM está presente no soro e colostro aproximadamente de 5 a 10% do total de imunoglobulinas (Roth, 1999).

A IgA mais importante é a IgAs (IgA secretora) sua maior concentração está presente nas secreções exócrinas (saliva, lágrima, colostro, leite, esperma e secreção vaginal). A IgE participa de fenômenos alérgicos e reações anafiláticas, encontradas no cordão umbilical, mucosas e colostro (Goldhardt *et al.*, 1998). Os

suínos diferem de ratos e humanos, pois não possuem a IgD, que também é ausente nos bovinos, ovinos, coelhos e aves (Blecha, 1998). Nas aves, a imunoglobulina correlata à IgG dos mamíferos, é a IgY, que também é o tipo de imunoglobulina isolada da gema. Outras classes de imunoglobulinas estão presentes, mas em quantidades desprezíveis (Schade *et al.*, 1994). A importância da IgY já tinha sido descrita há mais de 100 anos atrás, onde anticorpos de aves eram transferidos do soro para a gema do ovo conferindo uma imunidade passiva aos embriões e neonatos (Klemperer, 1893, citados por Tini *et al.*, 2001). No entanto a IgY possui diferenças estruturais que a torna uma molécula mais instável e menos flexível que a IgG (Krief *et al.*, 2002). A IgY é uma molécula de baixo peso molecular. Muitas das espécies que possuem a IgY são ovíparas tendo sido encontradas no soro de pássaros, répteis e anfíbios, ao passo que a IgG encontra-se somente nos mamíferos (Warr *et al.*, 1995).

As aves de postura transferem todos os isotipos para o ovo, ou seja, IgY, IgM e IgA. Estas proteínas podem ligar-se a antígenos específicos como bactérias, vírus e toxinas, neutralizando o efeito do antígeno (Sunwoo *et al.*, 2000). Existem duas possíveis rotas de transferência, a principal é que o anticorpo do plasma sanguíneo circulante é secretado para dentro do folículo em amadurecimento (e posteriormente para a gema) e a segunda é que o anticorpo é incorporado à clara do ovo no oviduto, junto com o albúmem ali secretado (Losch *et al.*, 1986).

Estruturalmente a IgY contida na gema é idêntica à encontrada no soro. Há entretanto controvérsias sobre as concentrações de IgY encontradas no soro e

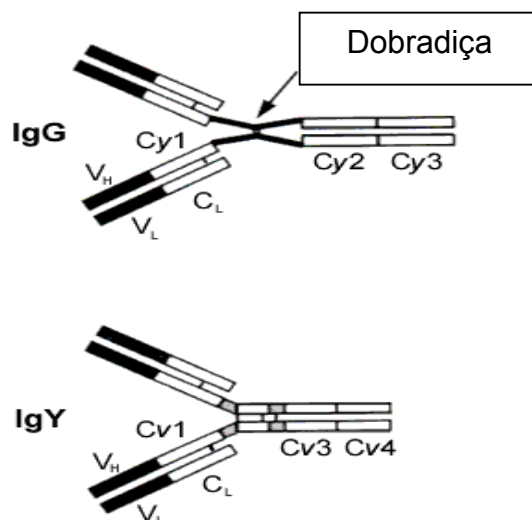
na gema. Larsson *et al.* (1993), verificaram que a concentração de IgY na gema é superior à concentração desta imunoglobulina no soro das aves. Segundo Losch *et al.* (1986), apenas a IgY é secretada para dentro da gema, que contém de 3 a 25 mg de IgY/mL.

1.3 Comparações entre a IgY das aves e a IgG dos mamíferos

Primeiramente a IgY foi observada como homóloga à IgG devido ao seu baixo peso molecular, pois a IgY já era bem conhecida mas não haviam evidências das diferenças entre as cadeias pesadas da IgY e IgG. A falta de conhecimento da larga distribuição da IgY nos animais não-mamíferos contribuiu para que a IgY fosse denominada igual à IgG. Em 1969, os pesquisadores Leslie e Glen propuseram uma imunoglobulina predominante no soro das aves e a denominaram de IgY. Como a IgM é a única imunoglobulina distribuída em todos os vertebrados, acreditava-se ser o ancestral de todas as classes de imunoglobulinas. Técnicas de clonagem molecular têm recentemente provado uma clara evidência que não somente a IgY é a evolução ancestral da IgG, mas também da IgE. Por 3 motivos: a) funções dos anticorpos, b) estrutura dos polipeptídeos da cadeia pesada, c) estrutura e expressão dos genes da cadeia pesada (Warr *et al.*, 1995).

A cadeia pesada (y) da IgG tem peso molecular de 50.000 Da e consiste de 4 domínios: domínio variável (VH) e 3 domínios constantes (Cy1, Cy2, Cy3). Em contraste, a cadeia pesada da IgY (v) tem peso molecular de 65.000 Da, não

possui a região de dobradiça, e possui 4 domínios constantes (Cv1 – Cv4) em adição ao domínio variável (FIGURA 1).



VH e VL = região variável; Cy1, 2 e 3 e Cv1, 3 e 4 = região constante da cadeia pesada.

FIGURA 1. Diferenças estruturais entre IgY e IgG de mamíferos.

Estas diferenças estruturais não afetam a eficiência da IgY em ligar-se ao antígeno, porém torna-a mais suscetível que a IgG no que se refere a pH e proteólise. Schmidt *et al.* (1989) reportaram uma perda de 5% de atividade da IgY após 1 hora de incubação em pH 4,0. Em termos físicoquímicos a IgY difere da IgG de mamíferos em peso molecular, ponto isoelétrico, suscetibilidade à proteólise e ativação do sistema complemento em mamíferos (Li-Chan, 2000).

Quando um anticorpo reage com o antígeno um complexo imune é formado. O complexo antígeno anticorpo ativa o sistema complemento. Ativando os componentes desse sistema, ocorre uma resposta inflamatória (Larsson *et al.*,

1993). As imunoglobulinas interagem com Fc e receptores complementos no trato gastrintestinal. Já as IgY não ativam o sistema complemento dos mamíferos e não mostram interação com receptores Fc, que poderia mediar uma resposta inflamatória no trato gastrintestinal (Carlander *et al.*, 2000).

A IgY tem sido efetiva na imunidade passiva em bezerros recém-nascidos desafiados pelo rotavírus, onde foi observada, redução da diarreia, aumento de ganho de peso e diminuição de excreção do vírus nas fezes (Kukori *et al.*, 1994; Kukori *et al.*, 1997). Resultados semelhantes foram encontrados por Bartz *et al.* (1980) em ratos desafiados pelo mesmo vírus. Peralta *et al.*, (1994) relataram que a IgY inibe a aderência da *Salmonella enteritidis* no intestino delgado em ratos, podendo ser usada no controle de salmonelose em outras espécies animais.

A aplicação da IgY não está sendo pesquisada somente na área animal, mas também em muitas áreas médicas, tais como: aplicação clínica da IgY na inibição da rejeição em xenotransplantados, prevenção da placa dental e cáries pelo *Streptococcus mutans* em humanos (Hatta *et al.*, 1997), alternativa ao uso de antibióticos como forma terapêutica e profilática em leitões (Carlander *et al.*, 2000), e devido a simplicidade de técnicas e de criação de aves seria possível também sua aplicação em crianças com diarreia em países do terceiro mundo (UNICEF 1988, citados por Wiedemann *et al.*, 1991).

1.4 Imunidade passiva

A imunização passiva produz uma resistência temporária, transferindo anticorpos de um animal resistente para um suscetível. Estes anticorpos transferidos passivamente fornecem proteção imediata, mas como são gradualmente catabolisados, esta proteção se desfaz e o receptor finalmente torna-se novamente susceptível à reinfecção. A imunização passiva exige que os anticorpos sejam produzidos por um animal doador por meio de imunização ativa e que estes anticorpos sejam administrados aos animais suscetíveis, para conferir proteção imediata (Tizard, 1985). O colostro e o leite materno são exemplos de imunização passiva, pois promovem a maturação e o desenvolvimento do epitélio intestinal, onde os linfócitos do leite desempenham um papel importante na modulação neonatal na resposta imune (Kelley e Coutts, 2000).

O leitão nasce praticamente sem nenhuma proteção contra microorganismos patogênicos existentes no seu novo ambiente, com os quais nunca esteve em contato. Os fetos têm baixa capacidade de produzir anticorpos. Eles tornam-se imunocompetentes somente a partir dos 70 dias de gestação, e não produzem anticorpos pelo fato de não entrarem em contato freqüente com agentes infecciosos durante a vida intra-uterina (Mount e Ingran, 1971 citados por Mores *et al.*, 1998). Porém algumas células do sistema imune e respostas imunológicas podem ser observadas no feto suíno já em fases iniciais de gestação. Segundo Tlakašlova-Hogenova *et al.* (1994), aos 28 dias de gestação, podem ser detectadas células linfóides na região do timo, fígado e sangue periférico. Com o decorrer do período gestacional, outras evidências de resposta

imune já foram observadas, incluindo produção de anticorpos antígenos-específicos, já aos 55 dias de gestação, diante da imunização no útero. Os linfócitos expressam características de célula B e T e estão presentes na sexta semana de gestação. Entretanto, devido a placentação epiteliocorial, o feto suíno é protegido contra uma estimulação antigênica do meio externo. A placentação epiteliocorial não permite a passagem dos anticorpos maternos (Imunoglobulina G) para o feto, sendo assim, de grande importância a proteção através da imunidade passiva. O sistema imune do leitão recém-nascido é também anatomicamente e fisiologicamente imaturo, sendo sua sobrevivência dependente da imunidade passiva através da transferência maternal das imunoglobulinas contidas no colostro. O leitão recém-nascido é dependente do balanço entre imunidade passiva e ativa durante as primeiras semanas de vida (Holland, 1990).

Altas concentrações de imunoglobulinas G, M e A estão presentes no colostro após o parto. A principal imunoglobulina é a IgG, que compreende 75% total das Igs encontrada no colostro. A concentração de IgG, IgA e IgM diminui drasticamente nas primeira 24 horas; esta rápida redução de Ig no colostro enfatiza a importância do neonato ingerir quantidades suficientes de colostro ricos em Igs nas primeiras horas de vida, quando eles podem eficientemente absorvê-las (Blecha, 1998). No 3^o dia de lactação a IgA torna-se a principal imunoglobulina presente no leite da porca, constituindo cerca de 50% do total de Ig secretada no leite até o final da lactação. A predominância da IgA no leite é reflexo da glândula mamária que torna-se o principal local de síntese e secreção de anticorpos no leite (Bourne, 1978 citado por Blecha 1998).

A IgA é mais resistente à degradação intestinal. Altas concentrações desta imunoglobulina no intestino neutraliza vírus, prejudica a aderência de bactérias pela opsonização ou promove a lise da bactéria (Blecha, 1998). Entretanto a meia vida da Ig maternal no leitão é de poucos dias ou semanas: IgA dura de 2 a 3 dias; IgM de 2,5 a 3 dias; IgG de 6,5 a 22,5 dias. O repertório inicial de anticorpos adquiridos pelo leitão é restrito pela quantidade de antígenos que a porca teve contato, conseqüentemente, porcas mais velhas conferem uma maior proteção em quantidade e qualidade de imunoglobulinas que as primíparas (Blecha, 1998). A proteção do leite materno é devido a IgAs. Entretanto o leite contém outros componentes com atividade antimicrobiana, tais como carboidratos, glicolipídios, glicoproteínas, mucina e oligossacarídeos. A IgA e a mucina previnem a aderência das fímbrias da *E. coli* devido à presença de resíduos de ácido siálico (Kelley e Coutts, 2000).

A máxima absorção de imunoglobulinas ocorre 4 a 12 horas após o nascimento e declina rapidamente até o fechamento das vilosidades intestinais com 48 horas de vida. Esse processo previne que outras macromoléculas também sejam absorvidas, como por exemplo, alguns patógenos (Westrom *et al.*, 1985). As imunoglobulinas absorvidas, entram na circulação (soro) e são detectadas 3 horas após o nascimento, e 24 horas após a absorção, a quantidade de imunoglobulinas é similar à da porca (Holland, 1990). Svendsen *et al.* (1990) estimam que o consumo inadequado do colostro nas primeiras 24 horas após o nascimento, poderia atrasar o fechamento das vilosidades intestinais, aumentando a possibilidade de patógenos entrarem na circulação. Sendo assim, há um período

curto e crítico após o nascimento onde o consumo do colostro é essencial para a sobrevivência do leitão.

O colostro também contém grandes quantidades de leucócitos, incluindo neutrófilos, macrófagos e linfócitos, tendo sido observada com estes a absorção pelo trato gastrintestinal para o sistema circulatório, conferindo ao leitão uma imunidade celular (Roth, 1999).

1.5 Desenvolvimento do sistema imune no leitão

Durante o período de gestação, o feto suíno é protegido contra uma grande variedade de antígenos do meio ambiente, embora ao nascer essa proteção seja perdida. O neonato é considerado imunodeficiente quando comparado ao adulto (McCauley e Hartmann, 1984). Há vários fatores que contribuem para a imunodeficiência neonatal, uma delas é a baixa quantidade de linfócitos B no sangue. O número de linfócitos B ao nascer ($320 \pm 40 \times 10^3$ células ml^{-1}) é menor que os níveis encontrados nos animais adultos ($640 \pm 90 \times 10^3$ células ml^{-1}) e permanece até os 10 dias após o nascimento e gradualmente aumenta a níveis de um suíno adulto em um período de 5 semanas (McCauley e Hartamann, 1984). O neonato apresenta uma baixa expressão de MHC II (Major Histocompatibility Complex) na superfície das APCs (Antigen-Presenting Cells) (Morein *et al.*, 2002). Um menor número de APC também limita a resposta imune (Kelly e Coutts, 2000).

Segundo McCauley e Hartmann (1984), a alta concentração de cortisol no sangue do leitão ($193 \pm 11 \mu\text{g}/\text{litro}^{-1}$), valor 12 vezes maior que no suíno adulto

($15,5 \pm 1,2 \mu\text{g/litro}^{-1}$) contribui com a imunodeficiência neonatal, pois os glicocorticóides suprimem a função imune (Hoskinson *et al.*, 1990), interferindo na dinâmica dos leucócitos (McCauley e Hartmann, 1984). As concentrações de cortisol no plasma em leitões diminui 50% do seu valor as 6 semanas de idade (Hoskinson *et al.*, 1990). A alta concentração de cortisol está relacionada com o início do parto e com o estresse do nascimento.

O número de leucócitos e neutrófilos são menores ao nascer $4470 \pm 3000 \times 10^3$ e $2380 \pm 310 \times 10^3$ células ml^{-1} , respectivamente. Após o nascimento a proporção de linfócitos cai de $47,4 \pm 3,3\%$ para $35,2 \pm 1,7$ e permanece neste nível até aos 5 dias pós-parto. Essa proporção aumenta para $65,6 \pm 2,5\%$ aos 20 dias pós-parto. Aos 10 dias a quantidade de leucócitos passa de 2040 ± 120 para $5940 \pm 550 \times 10^3$ células ml^{-1} . Dias após o nascimento o número de neutrófilos aumenta ($5370 \pm 580 \times 10^3$ células ml^{-1}) e esse nível foi mantido até 10 dias pós-parto. O baço do neonato ainda não está completamente desenvolvido, como de um baço de um animal adulto (Morein *et al.*, 2002).

As células B de mamíferos desenvolvem-se principalmente no fígado fetal e, a partir do nascimento, é na medula óssea que este processo continua ao longo da vida.

1.6 Imunidade da mucosa intestinal

O epitélio intestinal possui uma extensa área superficial para a absorção e digestão dos nutrientes, e simultaneamente apresenta uma barreira para um

vasto número de antígenos que continuamente passa através do trato digestivo. O intestino envolve um complexo sistema imune para monitorar o antígeno e combater o patógeno (Gaskins e Kelley, 1995). O desenvolvimento intestinal no suíno, como no humano, inicia durante o desenvolvimento fetal.

Abaixo do tecido da mucosa intestinal há um grande número de células do sistema imune, em termos de células linfóides. A mucosa intestinal é o maior órgão imunológico do organismo, e a secreção de IgAs na superfície da mucosa excede a produção de IgG circulante. O tecido linfóide associado com a superfície da mucosa representa uma massa celular que excede o total de células linfóides encontrados na medula óssea, timo, baço e linfonôdos (Kraehenbuhl e Neutra, 1992). A melhor barreira imunológica descrita no intestino é a secreção da IgA (Roth, 1999).

O trato digestório, respiratório e gênito urinário são localizações freqüentes dos agregados linfóides não encapsulados. O conjunto desses agregados é chamado MALT (agregados linfocitários associados a mucosas). O tecido epitelial que recobre essas estruturas, como as placas de Peyer do intestino, pode permitir a absorção de antígenos, para que os mesmos possam chegar até o tecido linfóide. As placas de Peyer são agregados linfóides que se estendem através da mucosa e submucosa do intestino delgado. São nas placas de Peyer que ocorre a primeira diferenciação das células B que produzem os anticorpos do tipo IgA (secretora) (Kagnof, 1993). Na lâmina própria existe uma predominância de macrófagos, que são distribuídos nos vilos e na região da cripta e ao nascimento esse número é baixo. Logo após ao nascer, ocorre um aumento

de macrófagos que se acumulam na cripta da lâmina própria, e alcançam um valor de um animal adulto às 5 semanas de idade (Gaskins e Kelley, 1995). As células epiteliais da superfície da mucosa, particularmente os enterócitos no intestino delgado, expressam MHC classe II, podendo atuar com APC, os enterócitos *in vitro* são capazes de processar os antígenos para as células T (Kraehenbuhl e Neutra, 1992).

Antígenos sobre a superfície da mucosa são separados das células do tecido linfóide. O transporte do antígeno é realizado por células especializadas, as células M, que se localizam no MALT no intestino, que são transportados e neutralizados pela IgAs (Kraehenbuhl e Neutra, 1992).

Embora os linfócitos B e T estejam presentes na lâmina própria ao nascer no leitão, o número de células dobra durante as primeiras 4 semanas após o nascimento. O número de subtipos de linfócitos T CD4+ aumenta durante as primeiras semanas pós-parto, enquanto que o número de CD8+ é baixa ao nascer e aumenta somente na 5 a 7ª semana (Rothkotter *et al.*, 1991).

A atividade imune na mucosa intestinal do suíno não é desenvolvida até 4 a 7 semanas de idade. É nesse período de vida que o leitão está mais suscetível a exposição de bactérias entéricas (Gaskins e Kelley, 1995). Muitos dos componentes do sistema imune do leitão estão presentes ao nascer, mas funcionalmente não desenvolvidos e algumas semanas de vida são necessárias para que o sistema imune torne-se completamente desenvolvido (Rooke e Bland, 2002).

1.7 Imunização passiva através do fornecimento de gemas de ovos (IgY) – uso preventivo e terapêutico.

O trato gastrintestinal oferece uma extensa área de superfície sobre a qual ocorre um contato direto entre o animal e uma grande variedade de nutrientes, microorganismos e toxinas exógenas. O intestino deve permitir a troca de nutrientes entre o lúmen e a circulação sistêmica, prevenindo ao mesmo tempo a penetração de agentes patogênicos. Se a microbiota natural do intestino for eliminada ou sua composição drasticamente alterada (por tratamento com antibiótico, por exemplo), resultam distúrbios dietéticos e pode ocorrer multiplicação de patógenos potenciais (Tizard, 1985). Desta forma, estratégias de imunização da mucosa intestinal são de grande interesse na medicina humana e animal (Sarrazin *et al.*, 1997).

Com a conscientização dos problemas associados ao uso excessivo de antimicrobianos para *E. coli*, alternativas para a prevenção da diarreia estão sendo requeridas. Várias substâncias como anticorpos, probióticos e carboidratos têm sido estudada a fim de proteger os leitões contra o efeito patogênico da ETEC (Jin., *et al*, 1998). A administração oral de anticorpos derivados do soro e colostro tem sido bem sucedida, porém com um custo elevado para obter a exigência suficiente de anticorpos (Yokoyama *et al.*, 1992).

A produção convencional de anticorpos requer normalmente o uso de laboratório animal e uma grande quantidade de animais, como coelhos, ratos e suínos ou animais maiores como cavalos, ovelhas e cabras que são capazes de produzir maiores quantidades de anticorpos. Porém envolvem 2 passos, ambos

causando estresse nos animais envolvidos: a) imunização do animal (Schade *et al.*, 1994); e b) coleta de sangue, a qual requer tempo e um alto custo, onde é um pré-requisito para a preparação dos anticorpos (Larsson *et al.*, 1993).

O uso de gemas de ovos como fontes de anticorpos possui várias vantagens: não é um método invasivo, a quantidade necessária de antígenos para uma eficiente imunização das aves é menor que para outros animais (Gassmann *et al.*, 1990), pode ser estocada a 4°C por mais de 1 ano, possui um baixo custo para uma produção de “fonte verde” de anticorpos policlonais (Krief *et al.*, 2002). Em 1 semana uma poedeira imunizada produz o equivalente de anticorpos no sangue de 180 a 200 mL, já um coelho imunizado produz o equivalente no sangue de 20 mL/semana (Larsson *et al.*, 1993).

Gemas de ovos obtidos de aves imunizadas são uma interessante fonte de anticorpos, tendo ação terapêutica e profilática sobre os leitões (Zúñiga *et al.*, 1997). Este princípio não é novo, e muitos autores têm usado anticorpos de gemas de ovos de galinha na prevenção ou controle de infecção por rotavírus em ratos e gatos (Yokoyama *et al.*, 1992). Yokoyama *et al.* (1993) destacaram que o valor prático da imunização passiva de mamíferos, utilizando a IgY, reside na capacidade de ligação específica da IgY aos antígenos que penetram no organismo de um indivíduo não-imunizado ou imunodeficiente.

A IgY da gema de ovo de galinha pode ser absorvida e transferida tão eficientemente quanto anticorpos colostrais pelo sangue de leitões recém-nascidos. Esta imunoglobulina tem uma meia-vida de 1,85 dias no soro destes

recém-nascidos. Similarmente aos anticorpos colostrais, a absorção de IgY cessa por volta de 36 horas de vida (Yokoyama *et al.*, 1993).

Sugita-Konishi *et al.* (1996) investigaram as funções imunológicas da IgY isolada da gema de ovo de galinhas imunizadas com várias bactérias infecciosas (26 linhagens de bactérias patogênicas tratadas com formalina). A IgY inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, a produção de enterotoxina A do *Staphylococcus aureus* e a adesão da *Salmonella enteritidis* a células intestinais humanas em cultura. Concluíram que a IgY de galinhas imunizadas com múltiplas bactérias podem ser úteis na prevenção de doenças bacterianas.

Anticorpos específicos contra linhagens de *E. coli* enterotóxica, depositadas na gema de ovos de galinhas imunizadas, foram expostos, *in vitro*, à influência de vários fenômenos digestivos, como redução de pH e digestão proteolítica. Schmidt *et al.* (1989) verificaram a atividade dos anticorpos remanescentes através de teste ELISA. Os autores observaram que já no estômago ocorre uma considerável perda na atividade dos anticorpos (baixo pH e clivagem péptica). Uma perda adicional ocorre devido ao efeito proteolítico das proteases pancreáticas tripsina e quimiotripsina. No entanto verificaram que anticorpos em soluções ricas em proteína (como suspensões de ovo ou gema) foram mais resistentes do que aqueles purificados.

De acordo com investigações de Losch *et al.* (1986) sobre a resistência da IgY ao ácido gástrico, é possível esperar que uma parte dos anticorpos de gema sejam capazes de atingir intactos o intestino delgado, pelo menos em animais jovens ou recém-nascidos.

Jin *et al.* (1998) estudaram *in vitro* a ação da gema de ovos liofilizados com título de 90000 na inibição da adesão das fímbrias K88ab, K88ac (UFC 10^9 ml⁻¹) em amostras de intestino delgado de leitões de 14 dias. Ocorreu uma competição pela adesão entre as IgY e a K88 pelo receptor. Demonstrando que a IgY inibe a adesão da K88 na mucosa intestinal em 84,6 a 97% quando as gemas foram diluídas em PBS a 1:10 em um tempo mínimo de 15 minutos. A efetividade da IgY para a inibição da ETEC é influenciada por 2 fatores; dosagem de anticorpos e concentração de ETEC.

O mesmo foi encontrado por Zúñiga *et al.* (1997), que desafiaram leitões desmamados de 23 a 30 dias com *E. coli* F18ab e F18ac e verificaram que o consumo de 5,5 g de ovo liofilizado adicionado à ração foi suficiente para diminuir a quantidade de bactérias presente nas fezes. Resultados semelhantes foram obtidos por Imberechts *et al.* (1997), que verificaram *in vitro* que anticorpos F18ab inibem a adesão da bactéria na parede intestinal, pela neutralização parcial ou completa do potencial de colonização, sendo a excreção da bactéria reduzida.

A IgY tem pouca capacidade de deslocar a *E. coli* quando ela já está ligada ao receptor, isto indica que a IgY tem baixa afinidade pelo receptor da mucosa intestinal, sendo sua melhor ação na forma profilática (Jin *et al.*, 1998). Entretanto o efeito terapêutico da IgY em diarreias tem sido reportado com leitões recém-nascidos (Yokoyama *et al.*, 1992, Wiedemann *et al.*, 1991). Yokoyama *et al.* (1992), avaliando o efeito terapêutico da IgY desafiaram leitões 4 horas após o nascimento com 5 mL de 10^{12} UFC com fímbrias K88, K99 e 987P e os privaram do colostro e somente após a ocorrência da diarreia forneceu 3 vezes ao dia 4mL

de gemas purificadas e liofilizadas com três titulações diferentes: 156, 625 e 2500 de anticorpos específicos. Os autores verificaram que nos grupos que receberam os anticorpos nos títulos de 625 e 2500 a diarreia cessou em 2 a 3 dias após o tratamento, sendo os melhores resultados para os títulos de 2500 ($P < 0.01$). A quantidade de fímbrias de ETEC encontrada em amostras de suabes retais, foram menores nos leitões que receberam 4 mL de gemas com título de 2500 ($P < 0.01$). Já Wiedemann *et al.* (1991), avaliando o efeito terapêutico em leitões de 2 a 14 dias em granjas com alta incidência de diarreia, forneceram 4 g de gemas liofilizadas de aves que foram imunizadas contra *E. coli* K88ac e gemas de aves que não foram imunizadas e diluídas em 5 mL de água administrada oralmente por 3 a 5 dias, e observaram que 43% dos leitões foram curados após o primeiro dia, 41% no segundo dia e 6% no terceiro dia, sendo que o grupo controle, permaneceu com diarreia, alguns leitões morreram, e outros foram tratados com antimicrobianos. Marquardt *et al.* (1999) demonstraram que em leitões desafiados pela K88 ocorreu uma perda de peso de 106 a 182 g enquanto nos não desafiados ocorreu um ganho de peso de 191 g, essa perda de peso foi atribuída à diarreia. Os mesmos autores em 2000, desafiando leitões por duas vezes com 21 dias, usando uma dosagem de 10^{12} UFC de *E. coli* K88, e tratados com 50 mg de gemas (IgY) por três vezes ao dia, por dois dias consecutivos, antes do 1º desafio, observaram que os animais controle obtiveram uma perda de peso de 36 g. Já os animais que receberam o tratamento com gemas, o ganho de peso foi de 90,6 g, em um período de três dias. O mesmo foi encontrado por Imberechts *et al.* (1997) desafiando 2 grupos de leitões desmamados. Ao primeiro grupo foi

fornecido 30 g de gemas liofilizadas oriundas de aves imunizadas contra F18ac misturadas na ração, e para o segundo grupo, 3 ovos comerciais/dia/animal (controle), 16 horas depois foram desafiados com 10^9 UFC (F18ab) e observados durante um período de 22 dias. O grupo controle permaneceu por mais dias com diarreia e com um ganho médio do grupo de peso na primeira semana de 0,52 kg, já a média de ganho de peso para os leitões que receberam a gema hiperimune foi de 0,70 kg.

Segundo O'Farrelly *et al.* (1992), as gemas de ovos podem ser facilmente incorporadas em dietas animais e não há praticamente riscos de efeitos secundários tóxicos da IgY (Carlander *et al.*, 2000).

1.8 *Escherichia coli* como patógeno para suínos

Em 1885, o pediatra alemão Theodore Escherich, descreveu pela primeira vez uma bactéria que foi encontrada nas fezes de indivíduos saudáveis, que inicialmente foi denominada de *Bacterium coli commune* (Escherich, 1885 citado por Broeck *et al.* 2000). Hoje em dia esse microorganismo é conhecido como *Escherichia coli*; uma bactéria Gram-negativa, flagelada, de comprimento variável e com um diâmetro com cerca de $1\mu\text{m}$ da família das Enterobacteriaceae (Bertschinger e Faibrother, 1999). A *E. coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves (Broeck *et al.* 2000).

A *E. coli* é classificada de acordo com o fator virulência e sua patogenicidade, tendo sido classificada como enteropatogênica (EPEC),

enteroenvasiva (EIEC) enterohemorrágica (EHEC) e enteroagregativa. A *E. coli* que causa diarreia em leitões, é a enterotoxigênica (ETEC) (Martineau *et al.*, 1995).

Existem várias maneiras de subdividir as *E. coli*. Por enquanto, os sorotipos mostraram uma melhor associação com certas características de virulência. Os sorotipos incluem a determinação de antígenos somáticos ('O'), capsulares ('K'), flagelares ('H') e fimbriais ('F'). Atualmente, são descritos no mínimo 173 antígenos somáticos, 80 antígenos capsulares e 56 antígenos flagelares (Bertschinger e Faibrother, 1999).

A adesão da bactéria no intestino delgado é mediado por estruturas filamentosas na superfície, chamadas de fímbrias, que conseqüentemente constituem o principal fator de virulência da *E. coli*. Baseado na sua propriedade de hemaglutinação, as fímbrias são classificadas como sensível à manose (SM) e resistente à manose (RM). As fímbrias SM são também chamadas de fímbrias tipo I. As fímbrias tipo I são CFA/I, CFA/II, K88, K99 e 987P que recentemente foram denominadas de F1, F2, F3, F4, F5 e F6 respectivamente (Broeck *et al.* 2000). Existem várias variantes antigênicas da fímbria F4 (K88) os três principais subtipos são F4ab, F4ac, e F4ad (Metcalfe *et al.*, 1991).

1.9 Diarreia neonatal causada pela *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma enterobactéria envolvida em uma grande variedade de infecções em muitas espécies animais, atuando como agente primário ou secundário. A bactéria pode exercer seu efeito patogênico no intestino delgado

dos animais, sendo que dois mecanismos de virulência são fundamentais: a aderência (mediada por fímbrias) e a capacidade de produzir toxinas (Barcellos *et al.*, 1998).

A diarreia neonatal associada com a *E. coli* é observada em leitões de 0 a 4 dias, causada por cepas que produzem um ou mais tipos de enterotoxinas, tendo sido designada *E. coli* (ETEC). A ETEC adere na mucosa do intestino delgado por um ou mais tipos de fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), ou F41. A *E. coli* produz um ou mais tipos de enterotoxinas. As toxinas envolvidas com as diarreias são termolábeis (LT, LTI e LTII) e termoestáveis (STa e STb) (Helie *et al.*, 1991).

Provas biológicas e imunológicas têm sido amplamente utilizadas para caracterizar fenotipicamente as amostras de *E. coli* quanto à produção de enterotoxinas e citotoxinas, podendo ser identificadas genotipicamente por meio da detecção dos genes codificadores da produção das toxinas através de técnicas de hibridação de DNA e da reação em cadeia pela polimerase. A enterotoxina STb é mais freqüente entre amostras de *E. coli* isoladas em leitões lactentes, seguida das enterotoxinas STa, LT e suas associações (Baccaro *et al.*, 1999).

As enterotoxinas ligam-se a um receptor específico localizado na membrana dos enterócitos. Ocorre uma mudança na absorção de água e eletrólitos, ocasionando secreções de determinados íons e água resultando em um efluxo para lúmen intestinal e uma diarreia aquosa (Buddle e Bolton, 1993).

A LT após a ligação ao receptor, ativa o adenilato ciclase, que estimula a produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Altos níveis de AMPC na

célula resultam em um aumento de secreção de Cl, Na, HCO₃ e H₂O para dentro do lúmen (Buddle e Bolton, 1993).

Já a toxina STa após ligar-se a um receptor epitelial intestinal ativa o guanilato ciclase, que estimula a produção de GMPc (guanosina monofosfato cíclica). Altos níveis de GMPc na célula inibe o sistema co-transportador de Na/Cl reduzindo a absorção de água e eletrólitos no intestino delgado. Leitões com menos de 2 semanas de idade são mais sensíveis à STa, que leitões mais velhos, devido a diferenças nas concentrações de receptores específicos que variam com a idade (Bertschinger e Fairbrother, 1999). O modo de ação da STb ainda é desconhecido, mas é diferente do modo de ação da STa e LT. A STb causa hipersecreção de HCO₃⁻ e induz a atrofia das vilosidades intestinais (Martineau *et al.*, 1995).

O glicoconjugado que recobre as células epiteliais do intestino delgado possui receptores específicos para a fímbria K88, sendo esses receptores glicoproteínas (Jin *et al.*, 1998). Os resultados do trabalho realizado por Conway *et al.* (1990), indicam a possibilidade de que leitões recém-nascidos sejam mais sensíveis às fímbrias K88 que leitões mais velhos, devido à maior quantidade de receptores específicos para na K88 na mucosa intestinal, contribuindo para um estado de infecção e uma adesão inicial da fímbria ETEC no íleo. Em contraste, leitões com 35 dias de idade possui menor quantidade de receptores específicos para K88 na mucosa ileal, prevenindo que a bactéria ligue-se aos enterócitos.

2. CAPÍTULO II

2.1 INTRODUÇÃO (específica)

A diarreia causada pela *Escherichia coli* ETEC representa uma perda econômica considerável na suinocultura, resultando em perdas, significativas aos produtores. Um contexto infeccioso em um sistema de produção animal é um problema econômico caro, pois estes animais crescem mais lentamente e são menos eficientes em converter alimento para ganhar peso, além de aumentar as chances de mortalidade dos leitões.

O sistema imune adaptativo dos vertebrados é dividido em dois segmentos funcionais (imunidade humoral e imunidade celular). A resposta imune humoral é caracterizada pela participação de, principalmente, anticorpos das classes IgG, IgM e IgA, que são secretados por linfócitos B, enquanto que, na resposta imune celular, são os linfócitos T que exercem um papel central na efetivação da resposta imune celular (Abbas, 2000). Nas aves, a imunoglobulina correlata à IgG dos mamíferos, é a IgY. Esta proteína pode ligar-se a antígenos específicos, como bactérias, vírus e toxinas, neutralizando o efeito do antígeno (Sunwoo *et al.*, 2000). O uso de gemas de ovos de galinhas principalmente como fonte de produção de anticorpos representa uma redução no uso de outros

animais para este fim (coelhos, roedores etc.), evitando assim a coleta de sangue. A ECVAM (The European Centre for the Validation of Alternatives) é formado por um comitê científico que promove workshops a fim de encontrar alternativas ao uso de animais de laboratórios para a produção de anticorpos e também controla a qualidade de produção dos mesmos, recomenda o uso de anticorpos contidos nas gemas ao invés de anticorpos de mamíferos por questões ligadas as de bem-estar animal (Schade *et al.*, 1994).

Devido à placentação epiteliocorial, o leitão nasce praticamente sem nenhuma proteção contra microorganismos patogênicos existentes no seu novo ambiente, com os quais nunca teve em contato. Sendo assim, os leitões nascidos devem adquirir imunoglobulinas maternas do colostro e leite até que o sistema imune torne-se completamente desenvolvido. A concentração de IgG no plasma do leitão logo após ao nascimento é correlata com a sua sobrevivência (Rooke e Bland, 2002). A IgY da gema do ovo de galinha pode ser absorvida e transferida tão eficientemente quanto os anticorpos colostrais pelo sangue de leitões recém-nascidos (Yokoyama *et al.*, 1993)

A *E.coli* (ETEC) é o agente causador de diarréias nos períodos neonatal e imediatamente posterior ao desmame. Os suínos infectados apresentam sinais clínicos que pode levá-los à morte, devido à produção e liberação de grandes quantidades de toxinas, que são capazes de interferir no fluxo de líquidos e eletrólitos entre o citoplasma celular e a luz intestinal (Zúñiga *et al.*, 1997). As *E. coli* são classificadas de acordo com os seus fatores de virulência e sua patogenicidade, tendo sido classificada como enteropatogênica (EPEC),

enteroenvasiva (EIEC) enterohemorrágica (EHEC). A *E. coli* que causa diarreia em leitões é a enterotoxigênica (ETEC) (Martineau *et al.*, 1995).

O aumento no número de bactérias resistentes aos antimicrobianos enfatiza a necessidade de serem encontradas outras alternativas para o seu controle. A imunoterapia oral com anticorpos específicos é um tratamento estratégico que tem sido proposto em estudos laboratoriais (Carlander *et al.*, 2000). As imunoglobulinas presentes na gema de ovos de galinhas (IgY) imunizadas com patógenos infecciosos têm demonstrado eficiência na prevenção de infecções (Sugita-Konishi *et al.*, 1996), pois agem efetivamente na terapia e profilaxia de leitões recém-nascidos infectados com a *E. coli* ETEC (Zúñiga *et al.*, 1997), podendo ser usados como fonte de anticorpos de custo baixo para a imunização passiva contra doenças infecciosas (Marquardt *et al.*, 1999).

Devido à ação profilática e terapêutica da IgY contida na gema do ovo da galinha, os objetivos do presente trabalho foram quantificar as imunoglobulinas Y no soro dos leitões recém-nascidos após a ingestão de gemas de ovos, verificar distintos padrões de fornecimento das gemas e seu efeito na ocorrência de diarreia e desempenho.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma unidade produtora de leitões (UPL) de uma granja comercial localizada na Região da Serra Gaúcha, com um plantel total de 2400 matrizes suínas em regime de confinamento, durante o período de 26 de março a 21 de abril de 2002. A determinação do título de imunoglobulinas nas gemas e densidade ótica de um ELISA para *E. coli* nos soros dos leitões foram realizadas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O experimento foi executado em 2 galpões de maternidade na mesma propriedade. As fêmeas foram alojadas em celas parideiras individuais de 3 a 5 dias antes do parto. Cada cela parideira possuía um comedouro, um bebedouro tipo chupeta e um escamoteador para aquecer os leitões. Foram selecionadas 25 fêmeas (Dalland) primíparas não vacinadas contra a *Escherichia coli*. De cada fêmea seriam utilizados 6 leitões recém-nascidos, de ambos os sexos, totalizando 150 unidades experimentais. Desse número, 137 leitões foram utilizados para o experimento, por motivos de mortalidade inicial. Os 137 leitões foram utilizados para peso inicial e DO e desse total 74 leitões para P7, P14 e OcD. Sessenta e três leitões foram descartados para P7, P14 e ocorrência de diarreia devido à medicação para diarreia fornecida pelos funcionários nos primeiros dias do período experimental.

As gemas dos ovos hiperimunizados foram obtidas do trabalho de Kindlein (2002) da maneira resumida a seguir. A imunização das aves foi feita via

intramuscular, no músculo peitoral. Foram usados 0,5 mL de uma bacterina comercial contra *Escherichia coli* suína, contendo cerca de 10^9 células bacterianas/mL. A bacterina administrada às aves foi produzida a partir de 6 sorotipos de *E. coli* relacionados à colibacilose suína (K12:K88ab, O157;K88ac, O8:K87:K88ad, 987P, O101:K30:F41, K99) (Eterovac-S, Laboratório IRFA, Porto Alegre - RS). Hidróxido de alumínio foi o adjuvante incluído na vacina. A segunda imunização, com o mesmo antígeno, foi feita 2 semanas após a primeira, na 53^a semana de idade das aves, período em que os ovos foram coletados para o experimento (Kindlein, 2002).

Após a coleta dos ovos, a clara foi separada da gema que foi armazenada em alíquotas de 30g a -5°C , *in natura*. As alíquotas de gema foram descongeladas e diluídas em 15mL de PBS (NaCl 0,15M e Na_2PO_4 0,01M) minutos antes do fornecimento aos leitões recém-nascidos. O título de anticorpos (IgY) na gema contra a bacterina foi de 100.000, determinado através de um ELISA indireto.

Os tratamentos foram fornecidos via oral e estão descritos a seguir.

Tratamento 1 (T1): 2 mL de PBS (tratamento controle) em 2 doses, a primeira ao nascer e a segunda dose 2 horas após o nascimento;

Tratamento 2 (T2): 2 mL de gema de ovo em 2 doses, ao nascer e 2 horas após o nascimento;

Tratamento 3 (T3): 2 mL de gema de ovo em 2 doses, ao nascer e 2 horas após o nascimento, e 2 mL de gema de 3 em 3 dias até os leitões completarem 12 dias de idade.

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso (DBC), em que cada bloco foi uma porca, dividido em 3 tratamentos e 2 repetições. O blocamento foi realizado para controlar as variações individuais de cada porca.

Ao nascer, os leitões recém-nascidos foram limpos e secos. Os líquidos fetais, bem como os restos de membranas que os envolviam, foram removidos com maravalha, massageando o dorso e a região pulmonar para ativar a circulação e a respiração. Após, o umbigo do leitão foi cortado e desinfetado com álcool iodado. Terminado esse processo, cada leitão foi pesado individualmente, tendo sido escolhido para o ensaio aqueles de peso similar. A seguir, foram identificados através da moça e, aleatoriamente, receberam o respectivo tratamento através de uma seringa de 5 mL. Após a 1ª dose de gema, o leitão foi colocado junto à porca para ingerir o colostro materno.

No momento da coleta de sangue, os leitões foram escolhidos aleatoriamente, uma repetição de cada tratamento, tendo sido analisadas três repetições por porca. Foram realizadas duas coletas de sangue em 1 leitão/tratamento/porca. A primeira coleta foi realizada 24 horas após a administração da segunda dose da gema e a segunda coleta aos 14 dias de idade. Após cada coleta, as amostras de sangue foram deixadas nas seringas por uma hora em temperatura ambiente, a fim de facilitar a coagulação. O soro resultante foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos, tendo sido os soros armazenados em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, identificados e conservados a -5°C para posterior análise. Os animais foram pesados individualmente ao nascer, no 7º e 14º dia de idade do leitão. Para a variável peso médio, foram utilizadas as médias

dos pesos corporais dos leitões de cada tratamento. No caso em que havia um número diferente de leitões por tratamento a cada pesagem, a variável ganho de peso foi calculada levando em consideração somente o peso dos leitões sobreviventes.

A ocorrência de diarreia foi observada individualmente por leitão, diariamente, pelo período da manhã, tendo sido utilizada uma classificação simples: com ou sem diarreia. Foi considerada diarreia a presença de fezes aquosas a pastosas e de coloração branco amarelada no ânus do animal. A medicação que foi adotada consistiu de um antimicrobiano, a colistina, caso o leitão apresentasse persistência na diarreia por 2 dias consecutivos, afim de evitar maiores perdas econômicas para a granja.

O título de anticorpos nos soros e nas gemas foi determinado através de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A densidade ótica (absorbância) do teste foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 490nm. Seguiu-se o seguinte protocolo: foram adicionadas às placas de ELISA (Maxisorp, Nunc, Kkamstrub, Dinamarca) 100 μ L da diluição da suspensão inativada de *Escherichia coli* em tampão de sensibilização (0,1 M Na-carbonato pH 9,6) que foram incubadas em câmara úmida a 4°C por 16 horas. As placas foram lavadas três vezes com 150 μ L por poço de tampão de lavagem (PBS pH 7,2; 0,05% Tween 20; 5% de leite em pó desnatado Mólico, Nestlé). O bloqueio foi realizado com tampão de lavagem por uma hora à temperatura ambiente. Após uma hora, foi desprezado o tampão e foram adicionados 100 μ L das amostras de gema ou soro

a serem testadas que foram diluídos 10 vezes, iniciando na diluição 1:10 até 1:10.000 em tampão de lavagem por uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com 150 μ L de tampão de lavagem. Foram adicionados 100 μ L de solução do conjugado (anti-IgY de galinha conjugada a peroxidase – Kirkegaard Perry Labs. Inc) diluído 1:500 em tampão de lavagem mais 100 μ L de soro normal suíno por uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com 150 μ L por poço de tampão de lavagem sem leite em pó (PBS pH 7,2; 0,05% Tween 20). A reação foi revelada por trinta minutos com 100 μ L por poço de uma solução com 3,4 mg de OPD (s-fenilenodiamino) e 20 μ L de H₂O₂ em 10 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0 (preparado recentemente) e bloqueada com 50 μ L por poço de uma solução de H₂SO₄ 12,5%.

A análise estatística da DO do ELISA e peso dos leitões foi realizada através de ANOVA, comparação de médias entre tratamentos pelo Lsmeans e teste do qui-quadrado para a ocorrência de diarreia, ambos utilizando o pacote estatístico SAS.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e os desvios padrões do peso corporal dos leitões no início, 7º e 14º dia do experimento em função do tratamento recebido, estão apresentados na TABELA 1. As análises de variância estão apresentadas nos APÊNDICES 4 a 6. Os dados originais estão nos APÊNDICES 1 e 2.

Tanto os leitões do T1 (controle), do T2 (gema ao nascer) quanto os leitões do T3 (gema de 3 em 3 dias) não mostraram diferenças significativas no peso inicial ($P \leq 0,31$) e no peso do 7º dia ($P \leq 0,69$).

Considerar na análise estatística as porcas como blocos para o controle das variações de peso inicial, P7 e P14, possibilitou o controle das variações do peso dos leitões, de forma que foram observadas diferenças entre blocos nas 3 pesagens ($P \leq 0,0001$). No que diz respeito ao peso dos leitões, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos, tanto no 1º dia ($P \leq 0,31$), quanto no 7º dia ($P \leq 0,69$). No 1º dia, este resultado era esperado, já que foram escolhidos leitões com peso similar de uma mesma porca (bloco). No 7º dia, o efeito dos tratamentos poderia ter sido observado, o que não ocorreu.

Aos 14 dias, os leitões do T3 que obtiveram peso médio de 3,81kg diferiram significativamente dos leitões de T1, com peso médio de 3,39 kg ($P \leq 0,08$). Já os leitões do T2, com peso médio de 3,64 kg, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao tratamento controle e ao T3 ($P \leq 0,32$). O peso corporal pode estar diretamente relacionado com a menor percentagem de dias sem diarreia dos leitões do T3.

Marquardt *et al.* (1999) demonstraram que em leitões desafiados pela *E. coli* K88, ocorreu uma perda de peso de 106 a 182 g enquanto que nos não desafiados ocorreu um ganho de peso de 191 g, tendo sido essa perda de peso atribuída à diarreia.

Os mesmos autores em 2000, desafiaram leitões de 21 dias por duas vezes, com 10^{12} UFC da K88, e tratados com 50 mg de gemas purificadas e liofilizadas (IgY) por três vezes no dia, por dois dias consecutivos antes do 1º desafio. Observaram que os animais controle obtiveram uma perda de peso de 36 g. Já os animais que receberam o tratamento com gemas tiveram um ganho de peso de 90,6g, em um período de três dias. O mesmo foi encontrado por Imberechts *et al.* (1997) que ao desafiar leitões desmamados e fornecendo uma alta dose (30g) de gemas liofilizadas com anticorpos anti-F18ac misturadas na ração e observados por um período de 22 dias, verificaram que o grupo controle permaneceu por mais dias com diarréia e houve um ganho médio do grupo tratado de 0,52 kg na primeira semana. Já a média de ganho de peso dos leitões que receberam a gema hiperimune foi de 0,70 kg. No caso do presente experimento, usou-se gemas com título de 100.000 de IgY e doses de 2 gramas por leitão diluídas em solução tampão (PBS).

TABELA 1. Médias e desvio padrão dos leitões no início (PI), aos 7 (P7) e aos 14 dias (P14), nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

Tratamento	Nº de leitões	PI	P7	P14
T1	24	1,39 ± 0,022	2,22 ± 0,064	3,39 ± 0,132 b
T2	26	1,34 ± 0,022	2,24 ± 0,057	3,64 ± 0,118 ab
T3	24	1,38 ± 0,023	2,30 ± 0,062	3,81 ± 0,127 a
Total	74			
CV		10,99	12,85	16,49
P		0,31	0,69	0,08

Médias nas colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($P \leq 0,08$).

PI = Peso inicial; P7 = Peso aos 7 dias de idade; P14 = Peso aos 14 dias de idade; T1 = Tratamento controle; T2 = Doses de gemas somente ao nascer; T3 = Doses de gemas ao nascer e de 3 em 3 dias até os 12 dias de idade do leitão; CV = Coeficiente de variação; P = Probabilidade.

Apesar do aumento do peso corporal dos animais do T3 ter sido maior em relação ao controle e ao tratamento que recebeu somente doses de gemas ao nascer, o peso observado foi inferior ao relatado pela literatura. No experimento de Worobec *et al.* (1999), os pesos corporais médios de leitões desmamados aos 14 dias de idade foram de 4,39 Kg, e o desempenho previsto para a progênie de fêmeas da genética Camborough²² é de 4,3 kg aos 14 dias, se houver boas condições de manejo. Talvez devido às condições observadas na granja comercial onde o experimento foi realizado, de falta de manejo adequado, outros patógenos presentes, deficiência de higiene e de número de funcionários insuficientes, sejam a causa pela qual os leitões do T3 e T2 não tenham expressado todo o potencial genético para o ganho de peso.

Conforme os resultados das análises dos soros através de ELISA (TABELA 2) observa-se que existiu diferença estatística significativa da densidade ótica (DO) do ELISA nos soros dos leitões 24 horas após a administração das gemas, nos tratamentos 2 e 3 em relação ao tratamento 1 (controle) ($P \leq 0,0001$). As análises de variância estão apresentadas nos APÊNDICES 7 e 8. Os dados originais estão no APÊNDICE 3.

Aos 14 dias de idade, ainda foi verificada uma DO maior no T2, que não diferiu significativamente de T3, apesar deste tratamento ter mostrado superioridade numérica e os leitões estarem recebendo quantidades contínuas de gema ($P \leq 0,01$). Este resultado é coerente com outros estudos que demonstraram que a máxima absorção de imunoglobulinas ocorria nas primeiras 4 a 12 horas

após o primeiro aleitamento (Westrom *et al.*, 1985), quando são absorvidas no epitélio do jejuno (Holland, 1990). Entre 24 a 48 horas após o nascimento, as paredes intestinais já estão fechadas para a absorção de macromoléculas e o fornecimento contínuo das gemas funcionaria na imunidade local sem absorção para os vasos linfáticos. Isto explica porque os leitões do T3, apesar de estarem recebendo doses contínuas de gemas, não diferiram estatisticamente dos valores de DO do T2. No entanto, observou-se que, mesmo havendo menor absorção, o nível de imunoglobulina presente no sangue permaneceu mais alto do que aqueles animais que não receberam gema ($P \leq 0,01$).

Após a ingestão da IgY, sua concentração gradualmente diminui em um período de 14 dias (Yokoyama *et al.*, 1993), o que também pode ser observado nos dados da TABELA 2.

TABELA 2. Valores médios e desvio padrão para a DO do ELISA no 1º e 14º dia, nos diferentes tratamentos (T1, T2 e T3).

Tratamento	DO (1 dia)	DO (14 dias)
T1	0,1630 ± 0,061b	0,2680 ± 0,005b
T2	1,2112 ± 0,063a	0,2838 ± 0,005a
T3	1,1894 ± 0,062a	0,2919 ± 0,005a
CV	37,04	8,51
P	≤0,0001	≤0,01

Médias nas colunas seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($P \leq 0,01$).

DO = Densidade ótica; T1 = Tratamento controle; T2 = Doses de gemas somente ao nascer; T3 = Doses de gemas ao nascer e de 3 em 3 dias até os 12 dias de idade do leitão; CV = Coeficiente de variação; P = Probabilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Yokoyama *et al.* (1993), que verificaram que em leitões que receberam gemas de ovos após 10 horas do nascimento, as IgY já podiam ser identificadas no soro 2 horas após a administração oral, tendo o pico de concentração sido alcançado 24 horas após sua administração e gradualmente diminui em um período de 21 dias. Quando a gema foi administrada 34 horas após o nascimento, as IgY não foram detectadas 2 horas após no soro, indicando que o trato gastrintestinal já não estava permeável para as macromoléculas. Após o pico de IgY, sua concentração no soro vai diminuindo gradualmente até o período de 21 dias, pois sua meia vida é de 1,85 dias. Este tempo é menor do que a meia-vida da IgG do colostro que é de 12 a 14 dias (Curtis *et al.*, 1973) e segundo Kelley e Coutts (2000), essa meia-vida varia de 6,5 a 22,5 dias. A diminuição da concentração de IgY no sangue ocorre em função do catabolismo. Além das diferenças estruturais entre a IgY e IgG, a IgY é menos rígida e mais instável em pH baixo, e a passagem da molécula pelo estômago poderia afetar a estabilidade conformacional mais rapidamente que a IgG dos mamíferos (Schmidt *et al.*, 1989). Isso poderia explicar a rápida diminuição da IgY da circulação sangüínea do leitão aos 14 dias. No entanto, as IgY são absorvidas tão eficientemente quanto os anticorpos contidos no colostro (Yokoyama *et al.*, 1993).

No que diz respeito à diarréia dos leitões, foram observadas diferenças significativas em função do tratamento fornecido ($P \leq 0,0001$). A frequência observada e esperada dos casos da diarréia durante o período experimental de 14

dias e o equivalente percentual da freqüência observada estão apresentados na TABELA 3. As análises de freqüência que originaram esta tabela estão no APÊNDICE 10. Os dados originais estão no APÊNDICE 9. Na FIGURA 2, observa-se que os leitões de T1 e T2 ficaram 72,5% e 79% do tempo estudado sem diarréia, respectivamente. No entanto, os leitões de T3 passaram mais dias sem diarréia do que os leitões de T1 (87% do período) ($P \leq X^2 0,0001$). A maior percentagem de leitões sem diarréia foi encontrada no tratamento que recebeu doses contínuas de gemas (T3), indicando que as imunoglobulinas não só agiram imunizando passivamente os animais, como também através da imunidade local (FIGURA 2).

TABELA 3. Freqüência observada e esperada () e percentagem da freqüência dos leitões com e sem diarréia durante os 14 dias do período experimental, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarréia*tratamento).

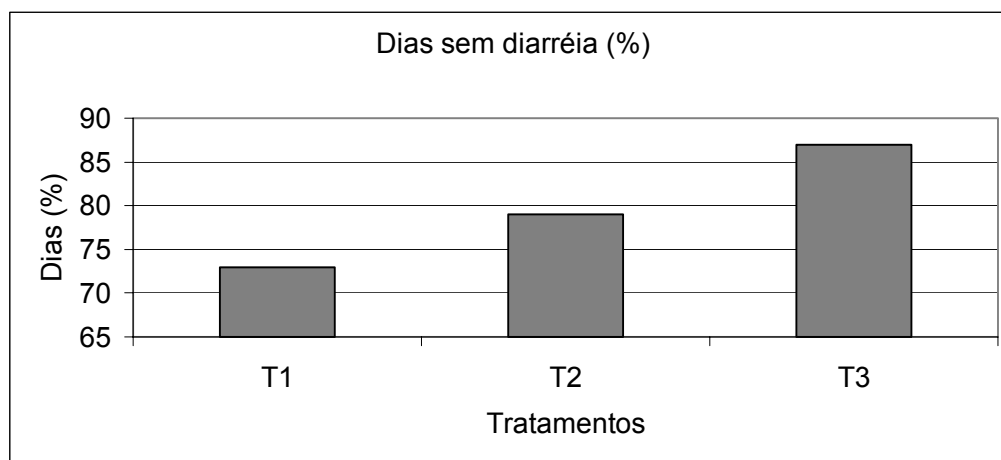
Tratamento	Observação diária de Diarréia				Total
	Sem	%	Com	%	
T1	232 (254,5)	72,5	88 (65,5)	27,5	320
T2	288 (289,5)	79	76 (74,5)	21	364
T3	280 (256,1)	87	42 (66)	13	322
P	$\leq 0,0001$				

T1 = Tratamento controle; T2 = Doses de gemas somente ao nascer; T3 = Doses de gemas ao nascer e de 3 em 3 dias até os 12 dias de idade do leitão; P = Probabilidade.

O T1 está associado a 22 leitões e 14 dias, totalizando **308**, sendo que 2 leitões morreram no 5º dia e 1 leitão no 2º dia, totalizando **12** observações = **320** observações em um período de 14 dias.

O T2 está associado a 26 leitões e 14 dias totalizando 364 observações.

O T3 está associado a 23 leitões e 14 dias totalizando 322 observações.



Comparação entre os tratamentos T1, T2, T3 ($P \leq 0,0001$)

T1 = Tratamento controle; T2 = Doses de gemas somente ao nascer; T3 = Doses de gemas ao nascer e de 3 em 3 dias até os 12 dias de idade do leitão.

FIGURA 2. Gráfico com os valores percentuais de dias sem ocorrência de diarreia no período experimental de 14 dias.

Devido à diferença estatística ($P \leq 0,0001$) apresentada na TABELA 3 e FIGURA 2, realizaram-se comparações entre os tratamentos controle e T2, controle e T3 e T2 e T3. Na comparação entre controle e T2, os leitões que receberam duas doses de 2mL de gemas ao nascer, permaneceram significativamente com menos dias sem diarreia ($P \leq 0,04$). As análises de frequência estão nos APÊNDICE 11 e 12. A imunidade passiva obtida pelos leitões do T2 vem a confirmar os estudos de Jin *et al.* (1998), que mostraram o efeito profilático *in vitro* da gema de ovos liofilizados com título de 9000 na inibição da adesão das fímbrias K88ab, K88ac (10^9 UFC mL⁻¹) em amostras de intestino delgado de leitões de 14 dias, tendo ocorrido uma competição pela adesão entre

as IgY e a K88 pelo receptor na mucosa intestinal, demonstrando que a IgY inibiu a adesão da K88 na mucosa intestinal. O mesmo foi encontrado por Zúñiga *et al.* (1997), que desafiaram leitões desmamados de 23 a 30 dias, porém com fímbrias F18ab e F18ac, e verificaram que o consumo de 5,5 g de ovo liofilizado adicionado à ração foi suficiente para diminuir a quantidade de bactérias presentes nas fezes. Resultados semelhantes foram obtidos por Imberechts *et al.* (1997), que verificaram *in vitro* que anticorpos F18ab inibem a adesão da bactéria na parede intestinal.

Ao comparar o tratamento controle com o T3, os leitões que receberam duas doses de 2mL de gemas ao nascer mais o fornecimento contínuo de gemas, permaneceram por mais dias sem diarreia ($P \leq 0,0001$). As análises de frequência estão nos APÊNDICES 13 e 14. Os resultados comprovam a efetividade do efeito profilático, mas também sugerem um efeito terapêutico da gema, proposto por Yokoyama *et al.* (1992) e Wiedemann *et al.* (1991).

Com relação à comparação entre o tratamento T2 com o T3, o tratamento com doses contínuas proporcionou significativamente mais dias sem diarreia aos leitões ($P \leq 0,006$). T3 permaneceu apenas 13% dos dias com diarreia. T2 permaneceu 21% dos dias com diarreia, praticamente o dobro. As análises de frequência estão nos APÊNDICES 15 e 16.

Resultados de Yokoyama *et al.* (1992) validam, além do efeito profilático, também o efeito terapêutico da IgY. Estes autores desafiaram leitões 4 horas após o nascimento com 10^{12} UFC de *E. coli* com fímbrias K88, K99 e 987P

e somente após a ocorrência da diarreia, forneceram 3 vezes ao dia 4mL de gemas purificadas e liofilizadas. Os autores verificaram que nos grupos que receberam gemas com anticorpos (IgY) específicos para as fímbrias K88, K99 e 987P nos títulos de 625 e 2500, a diarreia cessou de 2 a 3 dias após o tratamento, obtendo os melhores resultados com o maior título ($P \leq 0,01$). Estes resultados contradizem Jin *et al.* (1998) que relataram que, *in vitro*, a IgY não seria capaz de substituir a *E. coli* quando ela já está ligada ao receptor. Porém os resultados foram obtidos de leitões privados de colostro, fora das condições de uma granja comercial, diferente da situação do presente experimento. Já Wiedemann *et al.* (1991), avaliando o efeito terapêutico em leitões de 2 a 14 dias em granjas com alta incidência de diarreia, forneceram 4 g de gemas liofilizadas contra K88ac com título de 9840, administrada oralmente por 3 a 5 dias, e observaram que 43% dos leitões foram curados após o primeiro dia, 41% no segundo dia e 6% no terceiro dia. O grupo controle permaneceu com diarreia alguns leitões morreram, e outros foram tratados com antimicrobianos.

Pode-se pensar que a imunidade passiva obtida pelos leitões do T2 não foi tão efetiva quanto a dos leitões de T3, pela insuficiente dose de IgY em relação ao desafio do meio ambiente. De acordo com Jin *et al.* (1998), a inibição da ETEC é influenciada por 2 fatores: a) dose de anticorpos e concentração de ETEC.

Ao analisar os tratamentos em que foi necessário medicar devido à persistência da diarreia por mais de 2 dias, foram observadas diferenças estatísticas em função dos tratamentos ($P \leq 0,015$) (TABELA 4). As análises de

freqüência estão no APÊNDICE 17. Os dados que originaram esta tabela estão no APÊNDICE 9. Quatro por cento dos leitões do tratamento controle e do T2 receberam antimicrobianos. Ao contrário dos leitões do T3, dos quais, apenas 0,6% tiveram que receber um antimicrobiano durante o período experimental. Ainda que o T2 tivesse tido o mesmo percentual de leitões medicados que os leitões controle, eles permaneceram por menos dias sem diarreia em relação ao controle ($P \leq 0,04$). A medicação também foi adotada por Wiedemann *et al.* (1991), a fim de evitar maiores perdas econômicas na granja comercial na qual realizou o experimento.

TABELA 4. Freqüência observada e esperada () e percentagem da freqüência dos leitões que receberam antimicrobiano (colistina) durante os 14 dias do período experimental, classificados em função dos tratamentos.

Tratamento	Sem Medicação		Com Medicação		Total
	Leitões x dias	%	Leitões x dias	%	
Controle	308 (312,07)	96	13 (8,92)	4	321
T2	351 (353,88)	96	13 (10,12)	4	364
T3	320 (313,05)	99,4	2 (8,95)	0,6	322
P	$\leq 0,015$				

T1 = Tratamento controle; T2 = Doses de gemas somente ao nascer; T3 = Doses de gemas ao nascer e de 3 em 3 dias até os 12 dias de idade do leitão; P = Probabilidade.

2.4 CONCLUSÕES

As IgY fornecidas oralmente, foram absorvidas eficientemente nas primeiras horas após o nascimento de leitões, já que a DO do ELISA dos soros dos leitões que receberam gemas hiperimunes ao nascer foi superior ao do

controle. Após este período, o fornecimento de gemas exerceu um efeito terapêutico a nível intestinal, mas não houve mais absorção.

A administração de gemas somente ao nascer e o fornecimento ao nascer e de 3 em 3 dias foram eficientes na prevenção da diarreia, sendo que as duas formas em conjunto, explicitadas no tratamento 3, mostraram mais eficácia, possivelmente pela imunidade, no trato gastrintestinal.

Além disso, os leitões que receberam doses contínuas de gemas apresentaram um peso corporal maior em relação ao controle. O peso corporal pode estar correlacionado com a menor percentagem de dias sem diarreia e maior DO no ELISA dos leitões do T3. Os resultados sugerem que o fornecimento contínuo é mais vantajoso do que o fornecimento de somente duas doses ao nascimento.

Conforme os resultados de DO e da percentagem de dias sem diarreia dos leitões recém-nascidos foi possível concluir que a imunidade passiva e local através do fornecimento de gemas de ovos agem efetivamente na prevenção da diarreia, podendo ser uma opção para diminuir o uso massivo de antimicrobianos em leitões recém-nascidos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Cellular and Molecular immunology**, 4th ed. W.B. Saunders Co., 2000.

ABCS – Associação Brasileira de Criadores de Suínos – **Relatório de Registro e Provas Zootécnicas 2001**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Estrela, 2002.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; BRONZONI, P.V.M.; CAMPOS, D.F.S.; FERREIRA, A.J.P.; CALDERARO.; F.F. Detecção de genes de enterotoxinas e verotoxinas através da PCR em amostras de *E. coli* isoladas de leitões lactentes. In: **IX Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, Belo Horizonte, p.199-200, 1999.

BARCELLOS, D.E.S.N.; SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I.A. Utilização de vacinas. In: **Suinocultura Intensiva**. Embrapa, p.239-253, 1998.

BARTZ, C.R.; CONKLIN, R.H.; TUNSTALL, C.B.; STEELE, J.H. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. **The Journal Infectious Diseases**, Texas, v.142, n.3, p.439-441, 1980.

BELLAVER, C. O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar. In: **Encontros Técnicos Abraves - SC**, Memórias, Santa Catarina, p.56-76, 2000.

BLECHA, F. Immunological aspects: comparison with other species. **The Lactating Sow**, CAB International, Manhattan, Cap.2, p.23 – 44, 1998.

BERTSCHINGER, H.U.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* infections. In: Straw, B.E., D’Allaire, S., Megeling, W.L., Taylor, D.J. **Diseases of Swine**, 8 ed. Iowa State University, 1999.

BROECK, W.V.; COX, E.; OUDEGA, B.; GODDEERIS, B.M. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. **Veterinary Microbiology**, Belgium, v.71, p.223-244, 2000.

BUDDLE, J.R.; BOLTON, J.R. The pathophysiology of diarrhea in pig. **Swine Health and Production**, v.1, p.22-27, 1993.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P.; LARSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunologic Research**, Uppsala, v.21, n.1, p.1-6, 2000.

CONWAY, P.L.; WELIN, A.; COHEN, P.S. Presence of k88-specific receptors in porcine ileal mucus is age independent. **Infection and Immunity**, Rhode Island, v. 58, n.10, p.3178-3182, 1990.

CURTIS, J.; BOURNE, F.J. Half-lives of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the serum of new-born pigs. **Immunology**, England, v.24, p.147-155, 1973.

GASKINS, H.R.; KELLEY, K.W. Immunology and neonatal mortality. In: **The Neonatal Pig development and survival**, CAB International, Illinois, cap.6, p.39-55, 1995.

GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T.; HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**, Zurich, v.4, p.2528-2532, 1990.

GOLDHARDT, R., ECKERT, G.U., REMIÃO, J.O. **Anticorpos**. In: Scroferneker, M.L., Pohlmann, P.R. *Imunologia básica e aplicada*. Porto Alegre: ed Universidade/UFRGS, cap.5, p.63-80, 1998.

HATTA, H.; TSUDA, K.; OZEKI, M.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; OTAKE, S.; HIRASAWA, M.; KATZ, J.; CHILDERS.; MICHALEK. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, YokKaichi, v.31, p.268-274, 1997.

HELIE, P.; MORIN, M.; JACQUES, M.; FAIRBROTHER, J.M. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K⁺E65⁺ strain. **Infection and Immunity**, Québec, v.59:3, p.814-821, 1991.

HOLLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.345-375, 1990.

HOSKINSON, C.D.; CHEW, B.P.; WONG, T.S. Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in the piglet. **Journal Animal Science**, Washington State University, v.68, p.2471-2478, 1990.

IMBERECHTS, H.; DEPREZ, P.; DRIESSCHE, E.V.; POHL, P. Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. **Veterinary Microbiology**, Brussels, v.54, p.329-341, 1997.

JIN, L.Z.; BAIDOO, S.K.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A. In vitro inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Winnipeg, v.21, n.4, p.313-321, 1998.

JONJIC, N.; JONJIC, S.; SAALMULLER, A.; RUKAVINA, D.; KOSZINOWSKI, U.H. Distribution of T-lymphocyte subsets in porcine lymphoid tissues. **Immunology**, Tunbingen, v.60, p.395-401, 1987.

KAGNOFF, M.F. Immunology of the intestinal tract. **Gastroenterology**, California, v.105, p.1275-1280, 1993.

KELLEY, D., COUTTS, A.G.P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science**. Bucksborn, v.66, p.161-167, 2000.

KINDLEIN, G. A influência da alimentação com diferentes níveis de vitamina E sobre a produção de imunoglobulina Y (IgY) no soro de poedeiras leves. Porto Alegre, 2002. **Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2002.

KRAEHENBUHL, J.P., NEUTRA, M. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. **Physiological Reviews**. Boston, v.72, n.4, p.853-879, 1992.

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

KUKORI, M.; OHTA, M.; IKEMORI, T.; PERALTA, R.C.; YOKOYAMA, H.; KODAMA, Y. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. **Archives of Virology**, Gifu, v.138, p.143-148, 1994.

KUKORI, M.; OHTA, M.; IKEMORI, Y.; ICATLO, F.C.; KOBAYASHI, C.; YOKOYAMA, H.; KODAMA, Y. Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves. **Archives of Virology**, Gifu, v.142, p.843-851, 1997.

LARSSON, A.; BALOW, R.; LINDAHL, T.L.; FORSBERG, P. Chickens antibodies: talking advantage of evolution – a review. **Poultry Science**, Uppsala, v.72, p.1807-1812, 1993.

LESLIE, G.A., CLEM, L.W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. **Journal Experimental Medicine**, v.130, p.1337-1352, 1969.

LI-CHAN, E.C.Y. Applications of immunoglobulins in immunoaffinity chromatography. **Egg Nutrition and Biochemistry**. CAB International, British Columbia, p.323-339, 2000.

LOSCH, U.; SCHRANNER, I.; WANKE, R.; JURGENS, L. The chicken egg, an antibody source. **Journal of Veterinary Medicine B**, Munich, v.33, p.609-619, 1986.

MARQUARDT, R.R.; JIN, L.Z.; KIN, J.; FANG, L.; FROHLICH, A.A.; BAIDOO, S.K. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Winnipeg, v.23, n.4, p.283-288, 1999.

MARQUARDT, R.R. Control of intestinal diseases in pigs by feeding specific chicken egg antibodies. In: **Egg Nutrition and Biotechnology**, Winnipeg, CAB International, p.289-299, 2000.

MARTINEAU, G.P.; VAILLANCOURT, J.P.; BROES, A. Principal neonatal diseases. In: **The Neonatal Pig development and survival**, Québec, CAB International, p.239-268, 1995.

McCAULEY, I., HARTMANN, P.E. Changes in piglet leucocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. **Research in Veterinary Science**, Australia, v.37, p.234-241, 1984.

METCALFE, J.W.; KROGFELT, K.A.; KRIVAN, H.C.; COHEN, P.S.; LAUX, D.C. Characterization and identification of a porcine small intestine mucus receptor for the k88ab fimbrial adhesin. **Infection and Immunity**, Rhode Island, v.59, n.1, p.91-96, 1991.

MOREIN, B., ABUSUGRA, I., BLOMQVIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Sweden, v.87, p.207-213, 2002.

MORES, N., SOBESTIANSKY, J., CIACCI, J.R.; AMARAL, A.L.; BARIONI, W. Fatores de risco na maternidade associados a diarreia, mortalidade e baixo desempenho dos leitões. **Embrapa/CNPISA – Comunicado Técnico**, Concórdia, CT 178, p.1-4, 1991.

MORES, N.; SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; MORENO, A.M. Manejo do leitão desde o nascimento até o abate. In: **Suinocultura Intensiva**. Embrapa, Concórdia, p.137-162, 1998.

O'FARRELLY, C.; BRANTON, D; WANKE, C.A. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. **Infection Immunity**, Massachusetts, v.60, n.7, p.2593-2597, 1992.

PERALTA, R.C. YOKOYAMA, H.; IKEMORI, Y.; KUKORI, M.; KODAMA, Y. Passive immunization against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of *Salmonella enteritidis*. **Journal Medicine Microbiology**, Gifu, v.41, p.29-35, 1994.

ROOKE, J.A., BLAND, I.M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. **Livestock Production Science**, Bucksburn, v.78, p.13-23, 2002.

ROPPA, L. A globalização e as perspectivas da produção de suínos no continente sul-americano. **ACSURS – Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul**, disponível no site: <http://www.acsurs.com.br>. Acesso dia: 10/01/2003.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Immunology**, 5th ed. Manole, Londres, 1999.

ROTH, J.A. The Immune System. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. **Diseases of Swine**, 8 ed. Iowa State University, 1999.

ROTHKOTTER, H.J.; ULBRICH, H.; PABST, R. The postnatal development of Gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. **Pediatric Research**, Hannover, v.29, n.3, p.237-242, 1991.

SARRAZIN, E.; BERTSCHINGER, H.U. Role of fimbria F18 actively acquired immunity against porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, Zurich v.54, p.133-144, 1997.

SCHADE, R.; STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; REGENMORTEL, M.; RIJKE, E.; SPIELMANN.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (Egg Yolk) antibodies: IgY. **The report and recommendations of ECVAM Workshop 21**, Italia, ATLA 24, p.925-934, 1994.

SCHMIDT, P.; WIEDEMANN, V.; KUHLMANN, R.; WANKE, R.; LINCKH, E.; LOSCH, U. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. II. In vivo studies on gastric and enteric digestion of egg yolk antibodies specific against pathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal Veterinary Medicine B**, Munchen, v.36, p.619-628, 1989.

SUGITA-KONISHI, Y.S.; SHIBATA, K.; YUN, S.S.; HARA-KUDO, Y.; YAMAGUCHI, K.; KUMAGAI, S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infections bacteria. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.60, n.5, p.886-888, 1996.

SUNWOO, H.H.; LI, X.; LEE, E.N.; KIM, Y.K.; SIM, J.S. Preparation of antigen-specific IgY for food application. In: **Egg Nutrition an Biotechnology**. CAB International, Alberta, p.311-321, 2000.

SVENDSEN, L.S.; WESTROM, B.R.; SVENDSEN, J.; OLSSON, A.; KARLSSON, B.W. Intestinal macromolecular transmission in underprivileged and unaffected newborn pigs: implication for survival of underprivileged pig. **Research in Veterinary Science**, Lund, v.48, p.184-189, 1990.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; MANDEL, L.; TREBICHAVSKY, I.; KOVÀOÚ, R.B.; STERZL, J. Development of immune responses in early pig ontogeny. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Czech Republic , v.43, p.135-142, 1994.

TINI, M., JEWELL, U.R.; GAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Bruxelles, v.131, p.569-574, 2001.

TIZARD, I. **Introdução à imunologia veterinária**. Ed. Roca, São Paulo, 2^a ed., 1985.

WARR, G.W., MAGOR, K.E., HIGGINS, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, Charleston, v.16, n.8, p.392-398, 1995.

WESTROM, B.R.; OHLSSON, B.G.; SVENDSEN, J.; TAGESSON, C.; KARLSSON, B.W. Intestinal transmission of macomolecules (BSA and FITC-dextran) in the neonatal pig: enhancing effect of colostrum, proteins and proteinase inhibitors. **Biology of the Neonate**, Lund, v.47, p.349-366, 1985.

WIEDEMANN, V.; LINCKH, E.; KUHLMANN, R.; SCHMIDT, P.; LOSCH, U. Chicken for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. In vivo studies on protective effects against *Escherichia coli* diarrhea in pigs. **Journal Veterinary Medicine B**, Munchen, v.38, p.283-291, 1991.

WOROBEC, E.K.; DUNCAN, I.J.H.; WIDOWSKI, T.M. The effects of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behaviour. **Applied Animal Behavior Science**, Canada, v.62, p.173-182, 1999.

YOKOYAMA, H.; PERALTA, R.C.; DIAZ, R.; SENDO, S.; IKEMORI, Y.; KODAMA, Y. Passive protective of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. **Infection and Immunity**, Gifu, v.60:3, p.998-1007, 1992.

YOKOYAMA, H.; PERALTA, R.C.; DIAZ, R.; SENDO, S.; IKEMORI, Y.; KODAMA, Y. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. **American Journal Veterinary Research**, Gifu, v.54, n.6, p.867-872, 1993.

ZÚÑIGA, A.; YOKOYAMA, H.; ALBICKER-RIPPINGER, P.; EGGENBERGER, E.; BERTSCHINGER, H. U. Reduced intestinal colonisation with F18-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* in weaned pig fed chicken egg antibody against the fimbriae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Zurich, v.18, n.3, p.153-161, 1997.

4. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Peso corporal dos leitões no início do experimento.

Porca	Tratamento	Leitão	Galpão	Peso inicial
516	1	1	1	1,200
516	1	4	1	1,100
517	1	9	1	1,200
517	1	12	1	1,320
523	1	14	1	1,300
523	1	17	1	1,240
524	1	19	1	1,330
524	1	22	1	1,160
526	1	27	1	1,380
526	1	30	1	1,320
533	1	32	1	1,400
533	1	35	1	1,640
529	1	37	1	1,520
529	1	40	1	1,700
525	1	45	1	1,140
535	1	55	1	1,360
535	1	58	1	1,460
538	1	63	1	1,500
538	1	66	1	1,620
539	1	68	1	1,200
539	1	71	1	1,600
540	1	73	1	1,420
540	1	76	1	1,460
550	1	81	1	1,220
550	1	84	1	1,400
547	1	86	1	1,500
551	1	88	2	1,600
551	1	91	2	1,600
546	1	96	1	1,400

546	1	99	1	1,260
549	1	101	2	1,200
549	1	104	2	1,200
552	1	107	2	1,200
552	1	110	2	1,660
557	1	115	2	1,450
557	1	118	2	1,160
398	1	120	2	1,700
398	1	123	2	1,780
548	1	125	2	1,480
548	1	128	2	1,480
575	1	133	2	1,200
575	1	136	2	1,740
559	1	138	2	1,560
565	1	142	2	0,840
565	1	145	2	1,080
435	1	150	2	1,500
Porca	Tratamento	Leitão	Galpão	Peso
516	2	2	1	1,300
516	2	5	1	1,420
517	2	7	1	1,340
517	2	10	1	1,060
523	2	15	1	1,160
523	2	18	1	1,100
524	2	23	1	1,500
526	2	25	1	1,220
526	2	28	1	1,240
533	2	33	1	1,300
533	2	36	1	1,180
529	2	38	1	1,440
529	2	41	1	1,360
525	2	43	1	1,180
535	2	56	1	1,240
535	2	59	1	1,600
538	2	61	1	1,300
538	2	64	1	1,400
539	2	69	1	1,480
539	2	72	1	1,280
540	2	74	1	1,140
540	2	77	1	1,080
550	2	79	1	1,420
550	2	82	1	1,500
547	2	87	1	1,380
551	2	89	2	1,300

551	2	92	2	1,200
546	2	94	1	1,460
546	2	97	1	1,520
549	2	102	2	1,380
549	2	105	2	1,200
552	2	108	2	1,680
552	2	111	2	1,520
557	2	113	2	1,460
557	2	116	2	1,320
398	2	121	2	1,740
398	2	124	2	1,700
548	2	126	2	1,420
548	2	129	2	1,480
575	2	131	2	1,500
575	2	134	2	1,260
559	2	139	2	1,320
565	2	143	2	1,000
565	2	146	2	0,740
435	2	148	2	1,540
435	2	151	2	1,740
Porca	Tratamento	Leitão	Galpão	Peso
516	3	3	1	1,100
516	3	6	1	1,440
517	3	8	1	1,120
517	3	11	1	1,540
523	3	13	1	1,320
523	3	16	1	1,160
524	3	21	1	1,160
524	3	24	1	1,500
526	3	26	1	1,600
526	3	29	1	1,480
533	3	31	1	1,300
533	3	34	1	1,400
529	3	39	1	1,640
529	3	42	1	1,740
525	3	44	1	1,200
535	3	57	1	1,200
535	3	60	1	1,720
538	3	62	1	1,560
538	3	65	1	1,600
539	3	67	1	1,460
539	3	70	1	1,200
550	3	80	1	1,280
550	3	83	1	1,260

547	3	85	1	1,120
551	3	90	2	1,280
551	3	93	2	1,200
546	3	95	1	1,420
546	3	98	1	1,600
549	3	100	2	1,300
549	3	103	2	1,620
552	3	109	2	1,580
552	3	112	2	1,280
557	3	114	2	1,360
557	3	117	2	1,160
398	3	119	2	1,580
398	3	122	2	1,560
548	3	127	2	1,600
548	3	130	2	1,420
575	3	132	2	1,400
575	3	135	2	1,600
559	3	137	2	1,420
559	3	140	2	1,460
565	3	147	2	0,740
435	3	149	2	1,720
435	3	152	2	1,860

APÊNDICE 2. Peso corporal dos leitões aos 7 e 14 dias.

Porca	Tratamento	Leitão	Galpão	P 7	P14
538	1	63	1	2,420	3,100
538	1	66	1	2,480	3,700
539	1	68	1	2,040	3,140
539	1	71	1	3,060	3,960
540	1	73	1	3,000	3,900
540	1	76	1	2,600	3,640
550	1	81	1	1,700	2,300
550	1	84	1	NC	NC
547	1	86	1	NC	NC
551	1	88	2	2,500	2,500
551	1	91	2	2,500	4,100
546	1	96	1	2,060	3,800
546	1	99	1	2,540	4,600
549	1	101	2	2,000	2,280
549	1	104	2	1,700	2,740
552	1	107	2	1,940	2,860

552	1	110	2	2,460	4,200
548	1	125	2	NC	NC
548	1	128	2	2,380	4,600
575	1	133	2	1,640	2,500
575	1	136	2	1,980	2,480
559	1	138	2	2,500	3,780
565	1	142	2	1,700	2,620
565	1	145	2	1,700	2,560
435	1	150	2	2,420	4,300
Porca	Tratamento	Leitão	Galpão	P 7	P 14
538	2	61	1	2,200	3,080
538	2	64	1	2,460	2,120
539	2	69	1	2,380	4,140
539	2	72	1	2,200	3,400
540	2	74	1	2,260	3,040
540	2	77	1	2,220	3,680
550	2	79	1	2,020	3,200
550	2	82	1	1,880	3,060
547	2	87	1	2,060	4,100
551	2	89	2	2,100	3,980
551	2	92	2	1,700	3,540
546	2	94	1	2,360	4,100
546	2	97	1	2,480	3,840
549	2	102	2	2,100	3,660
549	2	105	2	2,100	3,100
552	2	108	2	2,940	6,000
552	2	111	2	2,800	4,700
548	2	126	2	2,420	4,100
548	2	129	2	2,140	3,780
575	2	131	2	2,060	3,280
575	2	134	2	2,220	3,400
559	2	139	2	2,440	3,620
565	2	143	2	2,080	2,520
565	2	146	2	1,700	2,520
435	2	148	2	2,700	4,420
435	2	151	2	2,500	4,180
Porca	Tratamento	Leitão	Galpão	P 7	P 14
538	3	62	1	2,500	3,520
538	3	65	1	2,720	3,740
539	3	67	1	2,380	4,400
539	3	70	1	1,800	2,840
550	3	80	1	1,760	2,880
550	3	83	1	1,900	3,940
547	3	85	1	1,600	3,060

551	3	90	2	2,180	3,600
551	3	93	2	1,860	3,220
546	3	95	1	2,080	3,400
546	3	98	1	2,320	3,680
549	3	100	2	2,240	3,760
549	3	103	2	2,400	4,300
552	3	109	2	3,100	5,800
552	3	112	2	2,220	3,980
548	3	127	2	3,100	5,100
548	3	130	2	2,440	4,720
575	3	132	2	2,100	2,380
575	3	135	2	2,000	3,240
559	3	137	2	2,960	4,500
565	3	147	2	1,700	2,640
435	3	149	2	2,800	4,840
435	3	152	2	2,740	4,980

APÊNDICE 3. Densidade ótica dos soros com 24 horas e 14 dias após à 2º dose de gema.

Porca	Tratamento	Leitão	DO 24h	DO14
516	1	4	0,1433	0,2571
517	1	12	0,1210	0,2382
523	1	17	0,1126	0,2635
524	1	22	0,1584	0,2581
526	1	30	0,1204	0,2560
533	1	32	0,0734	0,2670
529	1	37	0,1316	0,2855
525	1	45	0,1217	NC
535	1	55	0,2616	0,2735
538	1	63	0,1228	0,2735
539	1	68	0,1016	0,2535
540	1	76	0,1145	NC
550	1	81	0,1248	0,2502
550	1	84	0,1323	NC
547	1	86	0,1310	NC
551	1	88	0,1212	0,2688
546	1	96	0,2306	0,2914
549	1	104	0,2066	0,2965
552	1	110	0,1435	0,2492
557	1	115	0,1991	0,2822
398	1	123	0,2469	0,2552

548	1	125	0,2750	NC
575	1	133	0,2649	0,2843
559	1	138	0,2185	0,3040
565	1	142	0,2201	0,2695
565	1	145	0,2830	0,2909
435	1	150	0,2910	0,2850
Porca	Tratamento	Leitão	DO 24h	DO 14
516	2	2	0,6654	0,2608
517	2	7	1,1766	0,2810
523	2	15	1,0059	0,2405
524	2	23	1,2007	0,3105
526	2	28	0,6259	0,2688
533	2	33	0,7061	0,2856
529	2	38	1,6150	0,3224
525	2	43	1,2930	NC
535	2	59	1,1020	0,3213
538	2	64	1,8123	0,2675
539	2	72	0,6323	0,2755
550	2	82	0,6425	0,2565
547	2	87	1,4292	0,2830
551	2	92	1,5428	0,3048
546	2	97	1,1259	0,3454
549	2	102	1,5668	0,2993
552	2	111	1,8053	0,3430
557	2	113	1,3607	0,2466
398	2	121	0,4141	0,2455
548	2	126	1,2293	0,2502
575	2	131	1,2616	0,2474
559	2	139	1,3509	0,2608
565	2	146	1,7663	0,3050
435	2	148	1,2271	0,3066
540	2	74	1,7233	NC
Porca	Tratamento	Leitão	DO 24h	DO 14
516	3	3	1,0663	NC
516	3	6	1,6651	0,3271
517	3	11	1,0165	0,2829
523	3	16	1,1902	0,2792
524	3	24	1,3024	0,2886
526	3	29	0,8264	NC
529	3	39	1,2930	0,2749
525	3	44	1,2657	NC
538	3	62	1,2971	0,3472
538	3	65	1,6037	0,3191
539	3	70	1,0837	0,2671

540	3	75	1,4852	NC
550	3	80	1,7543	0,2574
547	3	85	1,9472	0,2743
551	3	93	1,8606	0,3122
546	3	98	1,1951	0,2975
549	3	100	1,3548	0,2994
552	3	109	1,6305	0,3385
557	3	114	0,7147	NC
398	3	119	0,1932	NC
548	3	127	0,2049	0,2546
575	3	132	1,4100	0,2630
575	3	135	1,2920	0,2761
559	3	137	0,9069	0,3556
435	3	149	0,9865	0,3066
565	3	147	1,6026	0,2900
533	3	31	0,3075	0,2511

APÊNDICE 4. Análise da variância do peso corporal dos leitões ao início do experimento.

Causas da variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	2	0,054	0,027	1,18	0,3107
Porca	24	3,270	0,136	5,91	<0,0001
Erro	110	2,536	0,023		
Total	136	5,86			
CV	10,99				

APÊNDICE 5. Análise da variância do peso corporal dos leitões sétimo dia do experimento.

Causas da variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	2	0,062	0,031	0,37	0,691
Porca	13	5,592	0,430	5,08	<0,0001
Erro	55	4,661	0,084		
Total	70	10,315			
CV	12,85				

APÊNDICE 6. Análise da variância do peso corporal dos leitões no décimo quarto dia do experimento.

Causas da variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	2	1,877	0,938	2,64	0,08
Porca	13	25,301	1,946	5,47	<0,0001
Erro	55	19,562	0,355		
Total	70	46,743			
CV	16,49				

APÊNDICE 7. Análise da variância da densidade ótica 24 horas após a segunda dose da gema.

Causas da variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	2	18,738	9,369	93,79	<0,0001
Porca	24	4,544	0,189	1,90	0,027
Erro	52	5,194	0,099		
Total	48	28,722			
CV	37,04				

APÊNDICE 8. Análise da variância da densidade ótica 14 dias após a segunda dose da gema.

Causas da variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	2	0,005	0,002	5,09	0,01
Porca	22	0,023	0,001	1,86	0,04
Erro	41	0,052	0,0005		
Total	65	0,052			
CV	8,51				

APÊNDICE 9. Observação diária de leitões com e sem diarreia e fornecimento de medicação durante os 14 dias do período experimental.

Porca	T	G	Leitão	Dia	OcD	Med	Leitão	Dia	OcD	Med
538	1	1	63	1	1	0	63	2	1	0
538	1	1	66	1	1	0	66	2	1	0
539	1	1	68	1	0	0	68	2	1	0
539	1	1	71	1	0	0	71	2	0	0
540	1	1	73	1	1	0	73	2	0	0
540	1	1	76	1	1	0	76	2	0	0
550	1	1	81	1	0	0	81	2	0	0

550	1	1	84	1	1	0	84	2	1	0
547	1	1	86	1	1	0	86	2	1	0
551	1	2	88	1	1	0	88	2	0	0
551	1	2	91	1	1	0	91	2	0	0
546	1	1	96	1	0	0	96	2	0	0
546	1	1	99	1	0	0	99	2	0	0
549	1	2	101	1	1	0	101	2	0	0
549	1	2	104	1	0	0	104	2	0	0
552	1	2	107	1	1	0	107	2	1	0
552	1	2	110	1	0	0	110	2	0	0
548	1	2	125	1	0	0	125	2	0	0
548	1	2	128	1	0	0	128	2	0	0
575	1	2	133	1	1	0	133	2	0	0
575	1	2	136	1	0	0	136	2	0	0
559	1	2	138	1	0	0	138	2	0	0
565	1	2	142	1	0	0	142	2	0	0
565	1	2	145	1	0	0	145	2	0	0
435	1	2	150	1	0	0	150	2	0	0
538	2	1	61	1	0	0	61	2	0	0
538	2	1	64	1	1	0	64	2	1	0
539	2	1	69	1	0	0	69	2	1	0
539	2	1	72	1	0	0	72	2	0	0
540	2	1	74	1	1	0	74	2	0	0
540	2	1	77	1	0	0	77	2	0	0
550	2	1	79	1	0	0	79	2	0	0
550	2	1	82	1	0	0	82	2	0	0
547	2	1	87	1	1	0	87	2	0	0
551	2	2	89	1	0	0	89	2	0	0
551	2	2	92	1	0	0	92	2	0	0
546	2	1	94	1	0	0	94	2	1	0
546	2	1	97	1	0	0	97	2	0	0
549	2	2	102	1	0	0	102	2	0	0
549	2	2	105	1	0	0	105	2	0	0
552	2	2	108	1	1	0	108	2	1	0
552	2	2	111	1	1	0	111	2	1	0
548	2	2	126	1	0	0	126	2	0	0
548	2	2	129	1	0	0	129	2	0	0
575	2	2	131	1	0	0	131	2	0	0
575	2	2	134	1	0	0	134	2	0	0
559	2	2	139	1	0	0	139	2	1	0
565	2	2	143	1	0	0	143	2	0	0
565	2	2	146	1	0	0	146	2	0	0
435	2	2	148	1	0	0	148	2	0	0
435	2	2	151	1	0	0	151	2	0	0
538	3	1	62	1	0	0	62	2	0	0

538	3	1	65	1	0	0	65	2	0	0
539	3	1	67	1	0	0	67	2	1	0
539	3	1	70	1	0	0	70	2	0	0
550	3	1	80	1	0	0	80	2	0	0
550	3	1	83	1	0	0	83	2	0	0
547	3	1	85	1	1	0	85	2	1	0
551	3	2	90	1	1	0	90	2	0	0
551	3	2	93	1	0	0	93	2	0	0
546	3	1	95	1	0	0	95	2	0	0
546	3	1	98	1	0	0	98	2	0	0
549	3	2	100	1	1	0	100	2	0	0
549	3	2	103	1	0	0	103	2	0	0
552	3	2	109	1	1	0	109	2	1	0
552	3	2	112	1	0	0	112	2	0	0
548	3	2	127	1	0	0	127	2	0	0
548	3	2	130	1	0	0	130	2	0	0
575	3	2	132	1	0	0	132	2	0	0
575	3	2	135	1	0	0	135	2	0	0
559	3	2	137	1	0	0	137	2	0	0
565	3	2	147	1	0	0	147	2	1	0
435	3	2	149	1	0	0	149	2	0	0
435	3	2	152	1	0	0	152	2	0	0
Porca	T	G	Leitão	Dia	OcD	Med.	Leitão	Dia	OcD	Med.
538	1	1	63	3	1	1	63	4	1	0
538	1	1	66	3	1	1	66	4	1	0
539	1	1	68	3	0	0	68	4	0	0
539	1	1	71	3	0	0	71	4	1	0
540	1	1	73	3	0	0	73	4	0	0
540	1	1	76	3	0	0	76	4	0	0
550	1	1	81	3	0	0	81	4	1	0
550	1	1	84	3	NC	NC	84	4	NC	NC
547	1	1	86	3	1	1	86	4	0	0
551	1	2	88	3	1	0	88	4	0	0
551	1	2	91	3	1	0	91	4	1	0
546	1	1	96	3	1	0	96	4	1	0
546	1	1	99	3	0	0	99	4	0	0
549	1	2	101	3	1	0	101	4	0	0
549	1	2	104	3	1	0	104	4	0	0
552	1	2	107	3	0	0	107	4	0	0
552	1	2	110	3	0	0	110	4	0	0
548	1	2	125	3	1	0	125	4	1	0
548	1	2	128	3	0	0	128	4	0	0
575	1	2	133	3	0	0	133	4	0	0
575	1	2	136	3	1	0	136	4	0	0

559	1	2	138	3	1	0	138	4	0	0
565	1	2	142	3	0	0	142	4	0	0
565	1	2	145	3	1	1	145	4	0	0
435	1	2	150	3	0	0	150	4	0	0
538	2	1	61	3	0	0	61	4	0	0
538	2	1	64	3	1	1	64	4	0	0
539	2	1	69	3	1	0	69	4	0	0
539	2	1	72	3	0	0	72	4	1	0
540	2	1	74	3	0	0	74	4	0	0
540	2	1	77	3	1	0	77	4	0	0
550	2	1	79	3	0	0	79	4	1	0
550	2	1	82	3	0	0	82	4	0	0
547	2	1	87	3	0	0	87	4	0	0
551	2	2	89	3	0	0	89	4	0	0
551	2	2	92	3	1	0	92	4	1	0
546	2	1	94	3	1	0	94	4	0	0
546	2	1	97	3	1	0	97	4	0	0
549	2	2	102	3	1	0	102	4	1	0
549	2	2	105	3	0	0	105	4	0	0
552	2	2	108	3	1	1	108	4	0	0
552	2	2	111	3	0	0	111	4	0	0
548	2	2	126	3	0	0	126	4	0	0
548	2	2	129	3	0	0	129	4	0	0
575	2	2	131	3	1	0	131	4	1	0
575	2	2	134	3	1	0	134	4	1	0
559	2	2	139	3	0	0	139	4	0	0
565	2	2	143	3	0	0	143	4	0	0
565	2	2	146	3	0	0	146	4	0	0
435	2	2	148	3	0	0	148	4	1	0
435	2	2	151	3	0	0	151	4	0	0
538	3	1	62	3	0	0	62	4	0	0
538	3	1	65	3	0	0	65	4	0	0
539	3	1	67	3	1	0	67	4	0	0
539	3	1	70	3	1	0	70	4	1	0
550	3	1	80	3	1	0	80	4	0	0
550	3	1	83	3	0	0	83	4	0	0
547	3	1	85	3	0	0	85	4	1	0
551	3	2	90	3	0	0	90	4	0	0
551	3	2	93	3	0	0	93	4	0	0
546	3	1	95	3	0	0	95	4	0	0
546	3	1	98	3	0	0	98	4	0	0
549	3	2	100	3	0	0	100	4	0	0
549	3	2	103	3	0	0	103	4	0	0
552	3	2	109	3	0	0	109	4	0	0
552	3	2	112	3	1	0	112	4	0	0

548	3	2	127	3	0	0	127	4	0	0
548	3	2	130	3	0	0	130	4	0	0
575	3	2	132	3	1	0	132	4	1	0
575	3	2	135	3	1	0	135	4	1	0
559	3	2	137	3	0	0	137	4	0	0
565	3	2	147	3	0	0	147	4	0	0
435	3	2	149	3	0	0	149	4	0	0
435	3	2	152	3	0	0	152	4	1	0
Porca	T	G	Leitão	Dia	OcD	Med.	Leitão	Dia	OcD	Med.
538	1	1	63	5	0	0	63	6	1	0
538	1	1	66	5	1	0	66	6	0	0
539	1	1	68	5	0	0	68	6	0	0
539	1	1	71	5	0	0	71	6	1	0
540	1	1	73	5	0	0	73	6	0	0
540	1	1	76	5	0	0	76	6	0	0
550	1	1	81	5	0	0	81	6	0	0
550	1	1	84	5	NC	NC	84	6	NC	NC
547	1	1	86	5	1	0	86	6	NC	NC
551	1	2	88	5	0	0	88	6	0	0
551	1	2	91	5	1	1	91	6	0	0
546	1	1	96	5	0	0	96	6	0	0
546	1	1	99	5	0	0	99	6	0	0
549	1	2	101	5	0	0	101	6	0	0
549	1	2	104	5	0	0	104	6	0	0
552	1	2	107	5	0	0	107	6	0	0
552	1	2	110	5	0	0	110	6	0	0
548	1	2	125	5	1	1	125	6	NC	NC
548	1	2	128	5	0	0	128	6	0	0
575	1	2	133	5	0	0	133	6	1	0
575	1	2	136	5	0	0	136	6	1	0
559	1	2	138	5	1	0	138	6	0	0
565	1	2	142	5	1	0	142	6	1	0
565	1	2	145	5	0	0	145	6	1	0
435	1	2	150	5	0	0	150	6	0	0
538	2	1	61	5	0	0	61	6	0	0
538	2	1	64	5	0	0	64	6	0	0
539	2	1	69	5	0	0	69	6	1	0
539	2	1	72	5	0	0	72	6	0	0
540	2	1	74	5	0	0	74	6	0	0
540	2	1	77	5	0	0	77	6	0	0
550	2	1	79	5	0	0	79	6	0	0
550	2	1	82	5	0	0	82	6	0	0
547	2	1	87	5	0	0	87	6	0	0
551	2	2	89	5	0	0	89	6	0	0

551	2	2	92	5	1	1	92	6	0	0
546	2	1	94	5	0	0	94	6	0	0
546	2	1	97	5	0	0	97	6	0	0
549	2	2	102	5	1	1	102	6	0	0
549	2	2	105	5	0	0	105	6	0	0
552	2	2	108	5	0	0	108	6	0	0
552	2	2	111	5	0	0	111	6	0	0
548	2	2	126	5	1	0	126	6	0	0
548	2	2	129	5	1	0	129	6	1	0
575	2	2	131	5	1	1	131	6	1	0
575	2	2	134	5	0	0	134	6	1	0
559	2	2	139	5	0	0	139	6	1	0
565	2	2	143	5	0	0	143	6	1	0
565	2	2	146	5	0	0	146	6	0	0
435	2	2	148	5	0	0	148	6	0	0
435	2	2	151	5	0	0	151	6	0	0
538	3	1	62	5	1	0	62	6	0	0
538	3	1	65	5	1	0	65	6	0	0
539	3	1	67	5	1	0	67	6	0	0
539	3	1	70	5	0	0	70	6	0	0
550	3	1	80	5	0	0	80	6	0	0
550	3	1	83	5	1	0	83	6	0	0
547	3	1	85	5	0	0	85	6	0	0
551	3	2	90	5	0	0	90	6	0	0
551	3	2	93	5	0	0	93	6	0	0
546	3	1	95	5	0	0	95	6	1	0
546	3	1	98	5	0	0	98	6	0	0
549	3	2	100	5	0	0	100	6	0	0
549	3	2	103	5	0	0	103	6	0	0
552	3	2	109	5	0	0	109	6	0	0
552	3	2	112	5	0	0	112	6	0	0
548	3	2	127	5	0	0	127	6	0	0
548	3	2	130	5	1	0	130	6	0	0
575	3	2	132	5	0	0	132	6	0	0
575	3	2	135	5	1	1	135	6	0	0
559	3	2	137	5	0	0	137	6	0	0
565	3	2	147	5	0	0	147	6	0	0
435	3	2	149	5	0	0	149	6	0	0
435	3	2	152	5	1	0	152	6	0	0
Porca	T	G	Leitão	Dia	OcD	Med.	Leitão	Dia	OcD	Med.
538	1	1	63	7	0	0	63	8	1	0
538	1	1	66	7	0	0	66	8	0	0
539	1	1	68	7	0	0	68	8	0	0
539	1	1	71	7	0	0	71	8	1	0

540	1	1	73	7	0	0	73	8	0	0
540	1	1	76	7	0	0	76	8	0	0
550	1	1	81	7	1	0	81	8	1	0
550	1	1	84	7	NC	NC	84	8	NC	NC
547	1	1	86	7	NC	NC	86	8	NC	NC
551	1	2	88	7	0	0	88	8	0	0
551	1	2	91	7	0	0	91	8	0	0
546	1	1	96	7	0	0	96	8	0	0
546	1	1	99	7	0	0	99	8	0	0
549	1	2	101	7	1	0	101	8	1	0
549	1	2	104	7	0	0	104	8	0	0
552	1	2	107	7	0	0	107	8	0	0
552	1	2	110	7	0	0	110	8	0	0
548	1	2	125	7	NC	NC	125	8	NC	NC
548	1	2	128	7	0	0	128	8	0	0
575	1	2	133	7	1	0	133	8	1	1
575	1	2	136	7	1	0	136	8	1	1
559	1	2	138	7	0	0	138	8	0	0
565	1	2	142	7	1	1	142	8	1	0
565	1	2	145	7	1	0	145	8	0	0
435	1	2	150	7	0	0	150	8	0	0
538	2	1	61	7	1	0	61	8	0	0
538	2	1	64	7	0	0	64	8	1	0
539	2	1	69	7	0	0	69	8	0	0
539	2	1	72	7	0	0	72	8	0	0
540	2	1	74	7	0	0	74	8	0	0
540	2	1	77	7	0	0	77	8	0	0
550	2	1	79	7	0	0	79	8	0	0
550	2	1	82	7	0	0	82	8	0	0
547	2	1	87	7	0	0	87	8	0	0
551	2	2	89	7	0	0	89	8	0	0
551	2	2	92	7	0	0	92	8	0	0
546	2	1	94	7	0	0	94	8	0	0
546	2	1	97	7	0	0	97	8	0	0
549	2	2	102	7	0	0	102	8	0	0
549	2	2	105	7	0	0	105	8	1	0
552	2	2	108	7	0	0	108	8	0	0
552	2	2	111	7	0	0	111	8	0	0
548	2	2	126	7	0	0	126	8	0	0
548	2	2	129	7	1	1	129	8	0	0
575	2	2	131	7	1	1	131	8	1	1
575	2	2	134	7	1	0	134	8	1	1
559	2	2	139	7	0	0	139	8	0	0
565	2	2	143	7	1	0	143	8	1	1
565	2	2	146	7	1	0	146	8	1	0

435	2	2	148	7	0	0	148	8	0	0
435	2	2	151	7	0	0	151	8	0	0
538	3	1	62	7	0	0	62	8	0	0
538	3	1	65	7	0	0	65	8	1	0
539	3	1	67	7	0	0	67	8	0	0
539	3	1	70	7	0	0	70	8	0	0
550	3	1	80	7	0	0	80	8	0	0
550	3	1	83	7	0	0	83	8	1	0
547	3	1	85	7	0	0	85	8	0	0
551	3	2	90	7	0	0	90	8	0	0
551	3	2	93	7	0	0	93	8	0	0
546	3	1	95	7	0	0	95	8	0	0
546	3	1	98	7	0	0	98	8	0	0
549	3	2	100	7	1	0	100	8	0	0
549	3	2	103	7	0	0	103	8	0	0
552	3	2	109	7	0	0	109	8	0	0
552	3	2	112	7	0	0	112	8	0	0
548	3	2	127	7	0	0	127	8	0	0
548	3	2	130	7	0	0	130	8	0	0
575	3	2	132	7	0	0	132	8	1	1
575	3	2	135	7	0	0	135	8	0	0
559	3	2	137	7	0	0	137	8	0	0
565	3	2	147	7	1	0	147	8	0	0
435	3	2	149	7	0	0	149	8	1	0
435	3	2	152	7	0	0	152	8	0	0
Porca	T	G	Leitão	Dia	OcD	Med.	Leitão	Dia	OcD	Med.
538	1	1	63	9	1	0	63	10	0	0
538	1	1	66	9	0	0	66	10	0	0
539	1	1	68	9	0	0	68	10	0	0
539	1	1	71	9	1	0	71	10	0	0
540	1	1	73	9	0	0	73	10	0	0
540	1	1	76	9	0	0	76	10	0	0
550	1	1	81	9	0	0	81	10	0	0
550	1	1	84	9	NC	NC	84	10	NC	NC
547	1	1	86	9	NC	NC	86	10	NC	NC
551	1	2	88	9	0	0	88	10	0	0
551	1	2	91	9	0	0	91	10	0	0
546	1	1	96	9	0	0	96	10	0	0
546	1	1	99	9	0	0	99	10	0	0
549	1	2	101	9	0	0	101	10	0	0
549	1	2	104	9	0	0	104	10	0	0
552	1	2	107	9	0	0	107	10	1	1
552	1	2	110	9	0	0	110	10	0	0
548	1	2	125	9	NC	NC	125	10	NC	NC

548	1	2	128	9	0	0	128	10	0	0
575	1	2	133	9	0	0	133	10	0	0
575	1	2	136	9	1	0	136	10	1	0
559	1	2	138	9	0	0	138	10	1	0
565	1	2	142	9	1	0	142	10	1	1
565	1	2	145	9	0	0	145	10	1	0
435	1	2	150	9	0	0	150	10	0	0
538	2	1	61	9	0	0	61	10	0	0
538	2	1	64	9	1	0	64	10	0	0
539	2	1	69	9	0	0	69	10	0	0
539	2	1	72	9	1	0	72	10	1	0
540	2	1	74	9	0	0	74	10	0	0
540	2	1	77	9	0	0	77	10	0	0
550	2	1	79	9	0	0	79	10	0	0
550	2	1	82	9	0	0	82	10	0	0
547	2	1	87	9	0	0	87	10	0	0
551	2	2	89	9	0	0	89	10	0	0
551	2	2	92	9	0	0	92	10	0	0
546	2	1	94	9	0	0	94	10	0	0
546	2	1	97	9	0	0	97	10	0	0
549	2	2	102	9	0	0	102	10	0	0
549	2	2	105	9	0	0	105	10	0	0
552	2	2	108	9	0	0	108	10	0	0
552	2	2	111	9	0	0	111	10	0	0
548	2	2	126	9	0	0	126	10	0	0
548	2	2	129	9	1	0	129	10	0	0
575	2	2	131	9	0	0	131	10	1	0
575	2	2	134	9	1	0	134	10	0	0
559	2	2	139	9	0	0	139	10	0	0
565	2	2	143	9	1	0	143	10	0	0
565	2	2	146	9	1	1	146	10	1	0
435	2	2	148	9	0	0	148	10	0	0
435	2	2	151	9	0	0	151	10	0	0
538	3	1	62	9	0	0	62	10	0	0
538	3	1	65	9	0	0	65	10	0	0
539	3	1	67	9	0	0	67	10	0	0
539	3	1	70	9	0	0	70	10	1	0
550	3	1	80	9	0	0	80	10	0	0
550	3	1	83	9	0	0	83	10	0	0
547	3	1	85	9	1	0	85	10	0	0
551	3	2	90	9	0	0	90	10	1	0
551	3	2	93	9	0	0	93	10	0	0
546	3	1	95	9	0	0	95	10	0	0
546	3	1	98	9	0	0	98	10	0	0
549	3	2	100	9	0	0	100	10	0	0

549	3	2	103	9	0	0	103	10	0	0
552	3	2	109	9	1	0	109	10	0	0
552	3	2	112	9	0	0	112	10	0	0
548	3	2	127	9	0	0	127	10	0	0
548	3	2	130	9	0	0	130	10	0	0
575	3	2	132	9	0	0	132	10	0	0
575	3	2	135	9	0	0	135	10	0	0
559	3	2	137	9	0	0	137	10	0	0
565	3	2	147	9	0	0	147	10	1	0
435	3	2	149	9	1	0	149	10	0	0
435	3	2	152	9	0	0	152	10	0	0
Porca	T	G	Leitão	Dia	OcD	Med.	Leitão	Dia	OcD	Med.
538	1	1	63	11	0	0	63	12	0	0
538	1	1	66	11	0	0	66	12	0	0
539	1	1	68	11	0	0	68	12	0	0
539	1	1	71	11	0	0	71	12	0	0
540	1	1	73	11	1	0	73	12	1	0
540	1	1	76	11	1	0	76	12	1	0
550	1	1	81	11	0	0	81	12	0	0
550	1	1	84	11	NC	NC	84	12	NC	NC
547	1	1	86	11	NC	NC	86	12	NC	NC
551	1	2	88	11	0	0	88	12	0	0
551	1	2	91	11	0	0	91	12	0	0
546	1	1	96	11	0	0	96	12	0	0
546	1	1	99	11	0	0	99	12	0	0
549	1	2	101	11	0	0	101	12	1	0
549	1	2	104	11	0	0	104	12	0	0
552	1	2	107	11	0	0	107	12	1	0
552	1	2	110	11	0	0	110	12	1	0
548	1	2	125	11	NC	NC	125	12	NC	NC
548	1	2	128	11	0	0	128	12	0	0
575	1	2	133	11	0	0	133	12	0	0
575	1	2	136	11	0	0	136	12	0	0
559	1	2	138	11	0	0	138	12	0	0
565	1	2	142	11	1	0	142	12	1	0
565	1	2	145	11	0	0	145	12	0	0
435	1	2	150	11	0	0	150	12	0	0
538	2	1	61	11	0	0	61	12	0	0
538	2	1	64	11	1	0	64	12	1	0
539	2	1	69	11	0	0	69	12	0	0
539	2	1	72	11	0	0	72	12	0	0
540	2	1	74	11	1	0	74	12	0	0
540	2	1	77	11	1	0	77	12	0	0
550	2	1	79	11	0	0	79	12	0	0

550	2	1	82	11	0	0	82	12	0	0
547	2	1	87	11	0	0	87	12	0	0
551	2	2	89	11	0	0	89	12	0	0
551	2	2	92	11	0	0	92	12	0	0
546	2	1	94	11	0	0	94	12	0	0
546	2	1	97	11	0	0	97	12	0	0
549	2	2	102	11	0	0	102	12	0	0
549	2	2	105	11	0	0	105	12	0	0
552	2	2	108	11	1	0	108	12	0	0
552	2	2	111	11	0	0	111	12	0	0
548	2	2	126	11	0	0	126	12	0	0
548	2	2	129	11	0	0	129	12	0	0
575	2	2	131	11	0	0	131	12	0	0
575	2	2	134	11	0	0	134	12	0	0
559	2	2	139	11	1	0	139	12	1	0
565	2	2	143	11	0	0	143	12	1	0
565	2	2	146	11	0	0	146	12	0	0
435	2	2	148	11	0	0	148	12	0	0
435	2	2	151	11	0	0	151	12	0	0
538	3	1	62	11	0	0	62	12	0	0
538	3	1	65	11	0	0	65	12	0	0
539	3	1	67	11	0	0	67	12	0	0
539	3	1	70	11	0	0	70	12	0	0
550	3	1	80	11	0	0	80	12	0	0
550	3	1	83	11	0	0	83	12	0	0
547	3	1	85	11	0	0	85	12	0	0
551	3	2	90	11	0	0	90	12	0	0
551	3	2	93	11	0	0	93	12	0	0
546	3	1	95	11	0	0	95	12	0	0
546	3	1	98	11	0	0	98	12	0	0
549	3	2	100	11	0	0	100	12	0	0
549	3	2	103	11	0	0	103	12	0	0
552	3	2	109	11	0	0	109	12	0	0
552	3	2	112	11	0	0	112	12	0	0
548	3	2	127	11	0	0	127	12	0	0
548	3	2	130	11	0	0	130	12	0	0
575	3	2	132	11	0	0	132	12	0	0
575	3	2	135	11	0	0	135	12	0	0
559	3	2	137	11	0	0	137	12	0	0
565	3	2	147	11	0	0	147	12	0	0
435	3	2	149	11	0	0	149	12	0	0
435	3	2	152	11	0	0	152	12	0	0
Porca	T	G	Leitão	Dia	OcD	Med.	Leitão	Dia	OcD	Med.
538	1	1	63	13	0	0	63	14	0	0

538	1	1	66	13	0	0	66	14	0	0
539	1	1	68	13	0	0	68	14	0	0
539	1	1	71	13	1	1	71	14	1	0
540	1	1	73	13	0	0	73	14	0	0
540	1	1	76	13	1	1	76	14	0	0
550	1	1	81	13	1	0	81	14	1	0
550	1	1	84	13	NC	NC	84	14	NC	NC
547	1	1	86	13	NC	NC	86	14	NC	NC
551	1	2	88	13	0	0	88	14	0	0
551	1	2	91	13	0	0	91	14	0	0
546	1	1	96	13	0	0	96	14	0	0
546	1	1	99	13	0	0	99	14	0	0
549	1	2	101	13	1	0	101	14	0	0
549	1	2	104	13	0	0	104	14	0	0
552	1	2	107	13	1	0	107	14	0	0
552	1	2	110	13	0	0	110	14	0	0
548	1	2	125	13	NC	NC	125	14	NC	NC
548	1	2	128	13	0	0	128	14	0	0
575	1	2	133	13	0	0	133	14	0	0
575	1	2	136	13	0	0	136	14	0	0
559	1	2	138	13	0	0	138	14	1	0
565	1	2	142	13	0	0	142	14	1	0
565	1	2	145	13	0	0	145	14	0	0
435	1	2	150	13	0	0	150	14	0	0
538	2	1	61	13	0	0	61	14	0	0
538	2	1	64	13	1	0	64	14	0	0
539	2	1	69	13	1	1	69	14	0	0
539	2	1	72	13	0	0	72	14	0	0
540	2	1	74	13	0	0	74	14	0	0
540	2	1	77	13	0	0	77	14	0	0
550	2	1	79	13	0	0	79	14	0	0
550	2	1	82	13	1	0	82	14	0	0
547	2	1	87	13	0	0	87	14	0	0
551	2	2	89	13	0	0	89	14	0	0
551	2	2	92	13	0	0	92	14	0	0
546	2	1	94	13	0	0	94	14	0	0
546	2	1	97	13	0	0	97	14	0	0
549	2	2	102	13	0	0	102	14	0	0
549	2	2	105	13	0	0	105	14	0	0
552	2	2	108	13	1	0	108	14	0	0
552	2	2	111	13	0	0	111	14	0	0
548	2	2	126	13	0	0	126	14	0	0
548	2	2	129	13	1	0	129	14	0	0
575	2	2	131	13	0	0	131	14	0	0
575	2	2	134	13	1	0	134	14	0	0

559	2	2	139	13	1	1	139	14	1	0
565	2	2	143	13	0	0	143	14	0	0
565	2	2	146	13	0	0	146	14	0	0
435	2	2	148	13	0	0	148	14	1	0
435	2	2	151	13	0	0	151	14	0	0
538	3	1	62	13	0	0	62	14	0	0
538	3	1	65	13	0	0	65	14	0	0
539	3	1	67	13	0	0	67	14	0	0
539	3	1	70	13	0	0	70	14	0	0
550	3	1	80	13	0	0	80	14	0	0
550	3	1	83	13	0	0	83	14	0	0
547	3	1	85	13	0	0	85	14	0	0
551	3	2	90	13	0	0	90	14	0	0
551	3	2	93	13	0	0	93	14	0	0
546	3	1	95	13	1	0	95	14	1	0
546	3	1	98	13	0	0	98	14	0	0
549	3	2	100	13	0	0	100	14	0	0
549	3	2	103	13	1	0	103	14	0	0
552	3	2	109	13	0	0	109	14	0	0
552	3	2	112	13	0	0	112	14	0	0
548	3	2	127	13	0	0	127	14	0	0
548	3	2	130	13	0	0	130	14	0	0
575	3	2	132	13	0	0	132	14	0	0
575	3	2	135	13	0	0	135	14	0	0
559	3	2	137	13	0	0	137	14	0	0
565	3	2	147	13	0	0	147	14	0	0
435	3	2	149	13	0	0	149	14	0	0
435	3	2	152	13	0	0	152	14	0	0

APÊNDICE 10. Análise de freqüência de ocorrência de diarréias nos leitões, durante os 14 dias de experimento, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarréia*tratamento).

Estatística	GL	Valor do teste	P
X2	2	20,655	<0,0001
Likelihood Ratio X2	2	21,191	<0,0001
Mantel-Haenszel X2	1	20,581	<0,0001
Phi coeficiente		0,143	
Contigência Coeficiente		0,141	
Cramer's V		0,143	

APÊNDICE 11. Frequência observada e esperada () e percentagem da frequência dos leitões com e sem diarreia durante os 14 dias do período experimental, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarreia*tratamento). Comparação entre o controle e T2.

Tratamento	Sem Diarreia		Com Diarreia	
	Leitões x dias	%	Leitões x dias	%
Controle	232 (243,27)	72,5	88 (76,72)	27,5
T2	288 (276,73)	79	76 (87,27)	21
P	0,04			

APÊNDICE 12. Análise de frequência de ocorrência de diarreias nos leitões, durante os 14 dias de experimento, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarreia*tratamento). Comparação entre o controle e T2.

Estatística	GL	Valor do teste	P
X2	1	4,095	0,043
Likelihood Ratio X2	1	4,089	0,043
Mantel-Haenszel X2	1	4,089	0,043
Phi coeficiente		-0,077	
Contigência Coeficiente		0,077	
Cramer's V		-0,077	

APÊNDICE 13. Frequência observada e esperada () e percentagem da frequência dos leitões com e sem diarreia durante os 14 dias do período experimental, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarreia*tratamento). Comparação entre o controle e T3.

Tratamento	Sem Diarreia		Com Diarreia	
	Leitões x dias	%	Leitões x dias	%
Controle	232 (255,2)	72,5	88 (64,79)	27,5
T3	280 (256,8)	87	42 (65,20)	13
P	<0,0001			

APÊNDICE 14. Análise de freqüência de ocorrência de diarreias nos leitões, durante os 14 dias de experimento, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarreia*tratamento). Comparação entre o controle e T3.

Estatística	GL	Valor do teste	P
X2	1	20,770	<0,0001
Likelihood Ratio X2	1	21,135	<0,0001
Mantel-Haenszel X2	1	20,738	<0,0001
Phi coeficiente		-0,179	
Contigência Coeficiente		0,177	
Cramer's V		-0,179	

APÊNDICE 15. Freqüência observada e esperada () e percentagem da freqüência dos leitões com e sem diarreia durante os 14 dias do período experimental, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarreia*tratamento). Comparação entre T2 e T3

Tratamento	Sem Diarreia		Com Diarreia	
	Leitões x dias	%	Leitões x dias	%
T2	288 (301,39)	79	76 (62,61)	21
T3	280 (266,61)	87	42 (55,38)	13
P	0,006			

APÊNDICE 16. Análise de freqüência de ocorrência de diarreias nos leitões, durante os 14 dias de experimento, classificados em função dos tratamentos (dias com e sem diarreia*tratamento). Comparação entre T2 e T3.

Estatística	GL	Valor do teste	P
X2	1	7,365	0,006
Likelihood Ratio X2	1	7,476	0,006
Mantel-Haenszel X2	1	7,354	0,007
Phi coeficiente		-0,103	
Contigência Coeficiente		0,103	
Cramer's V		-0,103	

APÊNDICE 17. Análise de frequência de ocorrência de medicação dos leitões, durante os 14 dias de experimento, classificados em função dos tratamentos (Medicação*Tratamento).

Estatística	GL	Valor do teste	P
X2	2	8,310	0,015
Likelihood Ratio X2	2	10,520	0,005
Mantel-Haenszel X2	1	6,989	0,008
Phi coeficiente		0,090	
Contigência Coeficiente		0,090	
Cramer's V		0,090	

VITA

Liliane Rudnik, filha de Estanislava Rudnik e Wladyslaw Edward Rudnik, nasceu em 12 de julho de 1977, Curitiba, Paraná – Brasil.

Iniciou seus estudos de 1º e 2º no Colégio Estadual Lysímaco Ferreira da Costa e Colégio Estadual Rio Branco, onde completou o segundo grau em 1994.

Em 1995, ingressou na Faculdades Integradas Espírita, no curso de Zootecnia, no qual se formou em 1999.

Em 2001, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da professora Andréa Machado Leal Ribeiro.