

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“FREQUÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM
AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITÕES DESMAMADOS”**

JOSÉ PAULO HIROJI SATO

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“FREQUÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS
DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITÕES DESMAMADOS”

Autor: José Paulo Hiroji Sato

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Sanidade Suína

Orientador: Prof. David Emilio S. N. Barcellos

PORTO ALEGRE

2013

José Paulo Hiroji Sato

“FREQUÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS
DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITÕES DESMAMADOS”

Aprovado em 11 de março de 2013.

APROVADO POR:

David Emilio S. N. Barcellos

Orientador e Presidente da Comissão

David Driemeier

Membro da Comissão

Jalusa Deon Kich

Membro da Comissão

Marisa R. de Itapema Cardoso

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a vida e proteção.

Aos meus familiares: pais, José e Regina e aos meus irmãos, Josi e “Mir” pelo apoio, incentivo e amor. Tio Paulo, Adalto, Eliane e querida afilhada Milena, sua chegada foi muito importante para todos.

Ao meu orientador Prof. David Barcellos, pelos conhecimentos transmitidos, por ter acreditado no meu potencial e pela influência positiva no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos co-orientadores Prof. Fernando Bortolozzo e Prof. Ivo Wentz, pelos ensinamentos, conselhos e experiência profissional compartilhada. E a Prof. Mari Bernardi, pelo auxílio nas análises estatísticas, correções e ensinamentos.

Aos amigos da pós-graduação, bolsistas e estagiários do Setor de Suínos. Todos, sem exceção, foram importantes de alguma forma. Em especial aos que estiveram de alguma forma presentes nos trabalhos realizados: Karine, Maria Clara, Thais, Angélica, Mateus, Mariana A., Carolina, Carine, Mariana M. e Júlia. Obrigado pela ajuda, pela companhia e pelas risadas compartilhadas.

Aos amigos que fiz em Porto Alegre: Wesley, Vitor, Dionísio, Alecsander e Diego. Obrigado pelas conversas, convívio e pela amizade presente nas horas boas e ruins.

À BRF pela possibilidade da realização desde trabalho, em especial: Priscilla e Vinícius.

À Cooperativa Ouro do Sul pela oportunidade da coleta do material para o projeto “PCV2 em javalis”.

À EMBRAPA Suínos e Aves, em especial, Janice, Luiza, João, Neide, Dani e Maurício. Que foram essenciais nas análises das amostras de javalis.

Ao setor de helmintologia da UFRGS, em especial, Sandra Marques pela orientação e pela oportunidade da realização do projeto com parasitoses em javalis.

Aos membros do PPGCV da UFRGS.

À CAPES pelo auxílio financeiro e científico.

RESUMO

FREQUÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITÕES DESMAMADOS

Autor: José Paulo Hiroji Sato

Orientador: Prof. David Emilio S. N. Barcellos

O presente estudo teve como objetivo avaliar a frequência dos fatores de virulência em amostras de *Escherichia (E.) coli* isoladas de leitões desmamados. Para a classificação de cepas de *E. coli* do patotipo ETEC, foram coletados suabes retais de leitões com idade entre 25-40 dias (fase de creche) com sinal clínico de diarreia, em granjas dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, totalizando 456 amostras. Para isolamento e caracterização bacteriana, foram utilizados métodos fenotípicos e moleculares. Foi realizada a análise estatística da frequência dos fatores de virulência e dos virotipos, para as fímbrias F4, F5, F6, F18, F41 e toxinas LT, STa, STb e STx2e. Das 456 amostras analisadas, 287 apresentaram crescimento significativo de *E. coli*. As maiores frequências observadas foram para as fímbrias F4 e F18 e para as enterotoxinas LT, STa e STb. Os virotipos mais frequentes foram F18-STa, F4-LT-STa-STb, F4-STa, F4-LT-STb e F18-STa-STx2e. Noventa e três amostras (32,4%) não apresentaram nenhum gene dos fatores analisados. Foi observada a associação significativa entre amostras positivas para a fímbria F4 e as toxinas LT, STa e STb; entre a fímbria F18 e as toxinas STa e STx2e; entre a fímbria F5 e todas as toxinas. Os genes de toxinas mais detectados (LT, STb) apresentaram associação significativa ($P < 0,02$). A beta-hemólise foi observada em 47,4% das amostras e houve associação ($P < 0,0001$) entre as amostras hemolíticas e os fatores de virulência F4, F18, STa e STx2e. Em relação à consistência das fezes, observou-se associação entre as fezes com consistência líquida e F4 e STa. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a ETEC é um importante agente etiológico de diarreia em leitões desmamados. Em diversas amostras (32,4%) não foram detectados fatores de virulência, sugerindo a ação de outros fatores e/ou agentes desencadeantes de diarreia. E além destes, existem várias hipóteses para explicar esta discrepância, as quais foram revisadas neste trabalho.

Palavras-chave: Suínos, colibacilose, *Escherichia coli*, diarreia, fatores de virulência.

ABSTRACT

FREQUENCY AND ASSOCIATION OF VIRULENCE FACTORS IN ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED IN POSTWEANING PIGS

Author: José Paulo Hiroji Sato

Advisor: Prof. David Emilio S. N. Barcellos

The frequency of virulence factors in strains of Escherichia (E.) coli isolated from weaned piglets was assessed. For classification of the strains of enterotoxigenic pathotypes of E. coli, rectal swabs were collected from 25-40 days old nursery piglets with clinical signs of diarrhea in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná, totaling 456 samples. For isolation and bacterial characterization of the samples, phenotypic and molecular tests were used. The results of frequency of virulence factors and virotypes to fimbriae F4, F5, F6, F18, F41 and toxins LT, STa, STb and STx2e were submitted to statistical analysis. Out of 456 samples, 287 showed significant growth of E. coli. The highest frequency was observed for F4 and F18 fimbriae and LT, STa and STb enterotoxins. The most prevalent virotypes were F18-STa, F4-LT-STa-STb, STa-F4, F4-LT-STa-STb and F18-STx2e. Ninety-three samples (32.4%) were negative for virulence genes. There was a significant association between positive samples for F4 fimbriae and enterotoxins LT, STa and STb; between the F18 fimbriae and STa and STx2e; between F5 fimbriae and all enterotoxins. The most frequent toxins (LT, STb) presented significant association ($P < 0.02$). Beta-hemolysis was observed in 47.4% of the samples and there was a association ($P < 0.0001$) between hemolysis and fimbriae F4, F18, STa and STx2e. Regarding stool consistency, it was observed a association between liquid consistency and F4 and STa. Based on the results, it can be concluded that ETEC is an important agent of diarrhea in weaned pigs. In several samples (32.4%) virulence factors were not detected, suggesting the action of other factors and/or agents inducing diarrhea. And besides these, there are other hypotheses to explain this discrepancy, which were reviewed in this work.

Key words: Swine, colibacillosis, Escherichia coli, diarrhea, virulence factors.

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas no Artigo Científico	Página	
Tabela 1	Descrição do PCR <i>Multiplex</i> 1, 2 e 3 quanto à composição dos fatores de virulência (FV), sequência dos <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos amplificados (<i>amplicons</i>)	41
Tabela 2	Frequência individual dos genes de fímbrias e toxinas detectadas em 287 amostras de <i>E. coli</i> isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia	42
Tabela 3	Distribuição percentual das associações dos genes fimbriais e de toxinas nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas de leitões desmamados e com sinal clínico de diarreia	43
Tabela 4	Associação entre fímbrias de amostras de <i>E. coli</i> isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia	44
Tabela 5	Associação entre toxinas de amostras de <i>E. coli</i> isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia	45
Tabela 6	Associação entre fímbrias e toxinas de amostras de <i>E. coli</i> isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia	46

Tabela 7	Associação entre os fatores de virulência e o tipo de hemólise de amostras de <i>E. coli</i> isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia	47
Tabela 8	Associação entre os fatores de virulência de amostras de <i>E. coli</i> isoladas a partir de suabes retais e a consistência das fezes leitões desmamados com sinal clínico de diarreia	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Colibacilose Pós-desmame.....	10
2.1.1 Etiologia	10
2.1.2 Patogenia	11
2.1.2.1 Fímbrias.....	12
2.1.2.2 Enterotoxinas.....	13
2.1.2.2.1 Enterotoxinas Termolábil.....	14
2.1.2.2.2 Enterotoxinas Termoestáveis	15
2.1.2.2.3 Outras enterotoxinas encontradas em <i>Escherichia coli</i> isoladas em diarreia de suínos.....	16
2.1.2.3 Hemólise.....	17
2.1.3 Epidemiologia	18
2.1.4 Sinais Clínicos.....	20
2.1.5 Lesões	21
2.1.6 Diagnóstico.....	21
2.1.7 Controle e Prevenção.....	23
3 ARTIGO	26
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Escherichia (E.) coli enterotoxigênica (ETEC) é um dos principais agentes infecciosos causadores de diarreia em diversas fases da vida de leitões, sendo duas formas mais frequentes: a colibacilose neonatal que ocorre na maternidade e a colibacilose do desmame, afetando os leitões nas primeiras semanas de alojamento na fase de creche (NAGY & FEKETE, 1999; ALFIERI et al., 2010). A doença em leitões desmamados foi descrita pela primeira vez no Canadá por Richards & Fraser (1961), que associaram a afecção com a proliferação de cepas de *E. coli* beta-hemolíticas no intestino de animais com diarreia.

Além de ser considerada a principal responsável por diarreia na creche, a colibacilose apresenta índices de mortalidade que podem atingir 25% se medidas adequadas de prevenção e/ou tratamento não forem adotadas (HAMPSON, 1994; MORÉS & MORENO, 2012). A doença é descrita em todo o mundo (FAIRBROTHER & GYLES, 2006) e ocorre geralmente dentro de uma a três semanas após o desmame, principalmente após alterações no regime alimentar ou em instalações com deficiências de ambiente, manejo, estresse excessivo e/ou alta pressão de infecção ambiental (QUINN, 2005; MORÉS & MORENO, 2012).

A colibacilose é uma das mais importantes enfermidades na suinocultura, sendo responsável por expressivas perdas econômicas em decorrência do emagrecimento, atraso no crescimento (BARCELLOS & STEPAN, 1991; EWING & COLE, 1994), aumento no uso de medicamentos e desinfetantes, necessidade de assistência veterinária, piora da conversão alimentar, redução no ganho de peso, maior predisposição dos animais afetados a infecções secundárias e conseqüentemente variabilidade no peso dos leitões do lote (ALFIERI et al., 2010; BARCELLOS et al., 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Colibacilose Pós-desmame

2.1.1 Etiologia

A bactéria *E. coli* faz parte da microbiota intestinal dos animais domésticos (EWING & COLE, 1994; MORÉS & MORENO, 2007; MENIN et al., 2008), porém, algumas cepas podem causar diversas doenças em suínos não só restritas a distúrbios entéricos (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Há diferenças importantes entre as cepas patogênicas e não-patogênicas ou comensais (ALFIERI et al., 2010). E para definir a patogenicidade da cepa, é essencial a identificação de fatores de virulência (FRANCIS, 1999), que serão discutidos ao longo do trabalho.

Os isolados de *E. coli* são classificadas em **sorotipos** segundo os antígenos de superfície, O (somático), K (capsulares), H (flagelares) (GUERREIRO, 1984; EWING & COLE, 1994) e F (fimbriais) (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Outra classificação determina diferentes **virotipos** considerando os fatores de virulência que a bactéria expressa (FRANCIS, 1999; FAIRBROTHER & GYLES, 2006). E de acordo com o efeito causado no organismo do suíno pela infecção bacteriana podem ser definidos **patotipos**, sendo os principais: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* shiga toxigênica ou verotoxigênica e *E. coli* enterohemorrágica (STEC, VETEC e EHEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (BRITO et al., 2004; GYLES & FAIRBROTHER, 2004).

Na colibacilose do desmame, *E. coli* do patotipo ETEC é considerada como agente primário (MORÉS & MORENO, 2012). Sendo um importante patógeno em animais, causando disenteria em bovinos e diarreia neonatal em suínos, com expressivas perdas financeiras para a indústria agropecuária (GYLES & FAIRBROTHER, 2004; GUTH, 2008).

Atualmente são descritos aproximadamente 30 sorotipos de ETEC associados às diarreias em suínos (MORÉS & MORENO, 2012). Bactérias deste grupo se caracterizam pela presença de fatores de virulência, que são basicamente, estruturas de adesão e enterotoxinas (FAIRBROTHER & GYLES, 2006; MORÉS & MORENO, 2007). A adesão

é mediada por fímbrias, estruturas proteicas de superfície que podem se ligar a receptores localizados no epitélio intestinal, as quais possuem grande atividade antigênica e são importantes para a caracterização de cepas patogênicas (NATARO E KAPER, 1998, KELLY & KING, 2001; GYLES & FAIRBROTHER, 2004). Após a adesão aos enterócitos, as cepas se multiplicam e podem produzir um ou mais tipos de enterotoxinas (ALFIERI et al., 2010), que agem em células secretórias localizadas nas criptas das vilosidades (EWING & COLE, 1994).

A combinação de fatores de virulência em isolados de *E. coli* (virotipo) é comumente diagnosticada (MACÊDO et al., 2007), existindo uma ampla distribuição dos virotipos encontrados em diversos trabalhos realizados no Brasil e em outros países (POST et al., 2000; FRANCIS, 2004; MACÊDO et al., 2007; VIDOTTO et al., 2009). A análise dos virotipos encontrados, é importante para estabelecer a necessidade ou não de instituir o tratamento contra a infecção causada pela bactéria. Esses genes de virulência, são em sua maioria, carreados em plasmídeos (TURNER et al., 2006), no entanto, em cepas causadoras de infecções extraintestinais, os genes que determinam a virulência geralmente estão localizados no cromossomo (FAIRBROTHER & GYLES, 2006).

2.1.2 Patogenia

Os leitões adquirem o patógeno geralmente pela via fecal-oral. Uma vez instalada a infecção, ocorre a interação de diversos mecanismos relacionados aos fatores de virulência do agente e de defesa do hospedeiro. Dessa forma, para causar a doença, a *E. coli* ingerida deve ser capaz de evitar os efeitos do peristaltismo intestinal, se aderir, multiplicar e produzir enterotoxinas. Para tal, as fímbrias expressadas pela bactéria se ligam a receptores como manose, galactose ou ácido siálico, presentes no glicocálice das células epiteliais (COWART, 1995; MORÉS & BARCELLOS, 2012). As enterotoxinas atuam nos processos hormonais que mediam o transporte de líquidos e eletrólitos entre as células epiteliais e a luz intestinal, aumentando os níveis de fluídos no lúmen intestinal, considerado alto para ser reabsorvido pelo intestino grosso (IG) e como consequência ocorre diarreia do tipo secretória (EWING & COLE, 1994; VANNUCCI & GUEDES, 2009).

2.1.2.1 Fímbrias

As fímbrias são expressas e localizadas na superfície da célula bacteriana e possuem uma subunidade adesiva (lectina) que interage com receptores presentes na célula hospedeira. Embora ocorram tanto para o homem como para os animais, são distintas entre si e apresentam especificidade em relação ao hospedeiro (KELLY & KING, 2001). São classificadas quanto à sua capacidade hemaglutinante em presença e ausência de D-manose (BRITO et al., 2001) ou baseado nos aminoácidos de sua composição, subdivididas em classes de 1 a 5 (LOW et al., 1996). As principais fímbrias presentes nas ETEC de suínos são: F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987), F7 (F41) e F18 (COWART, 1995; FRANCIS, 2004; MORÉS & MORENO, 2012), e algumas fímbrias (F4 e F18) ocorrem em outras formas antigênicas, F4ab, F4ac e F4ad, e F18ab e F18ac (FRANCIS, 2002; NAGY & FEKETE, 2005). As ETEC podem produzir também uma adesina envolvida na aderência difusa (AIDA), mais associada à fímbria F18 (MORÉS & MORENO, 2012) e ao virotipo STx2e:F18 (MAINIL et al., 2002).

O processo de adesão de cada tipo fimbrial pode variar de acordo com alguns fatores, como:

- Ausência de receptores na superfície dos enterócitos, dependendo a idade do animal (FAIRBROTHER & GYLES, 2006);
- Resposta imunológica eficiente do hospedeiro, decorrente de uma exposição prévia, podendo influenciar na intensidade dos sinais clínicos (ALFIERI et al., 2010);
- Alguns receptores celulares podem estar ausentes em algumas raças e/ou linhagens de suínos (CHAPPUIS et al., 1984; RITA et al., 1994; FRANCIS, 2002; LI et al., 2007);
- Local da aderência no trato intestinal, bactérias portadoras do antígeno F4 aderem preferencialmente ao jejuno anterior (MORÉS & BARCELLOS, 2012). Esta localização estaria relacionada com a maior expressão de determinadas classes de glicídeos no glicocálice desta área, como a galactose, que atua como receptor para a F4 e é expressa preferencialmente nas porções craniais do ID. Cepas que expressam as fímbrias F5 e F6 dependem de outros receptores (como o ácido siálico) presentes na região posterior do jejuno e íleo (MORÉS & BARCELLOS, 2012).

Em leitões na **fase de creche** geralmente são expressas as fímbrias F4ab, F4ac, F18ab e/ou F18ac (FRANCIS, 2004; FAIRBROTHER & GYLES, 2006; ALFIERI et al., 2010), e os sorogrupos, O139-F18ab e O149-F4ac (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Alguns genes envolvidos na biossíntese das fímbrias (F4, F18) estão localizados em plasmídeos de alto peso molecular, que geralmente também albergam os genes para enterotoxinas (GUTH, 2008).

Em **leitões neonatos**, as cepas de ETEC mais frequentemente isoladas apresentam as fímbrias F4, F5, F6 ou F41 (FRANCIS, 2004; FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Acredita-se que em leitões de idade avançada, os receptores para as fímbrias F5 e F6 sejam expressados com menor intensidade no epitélio intestinal, reduzindo sua prevalência em leitões na fase de creche. Adesinas do tipo F41 são frequentemente encontradas associadas com a F5 em leitões neonatos (FRANCIS, 2002). Já a F4 não tem a sua expressão reduzida nesta fase (FAIRBROTHER & GYLES, 2006), podendo ser encontrada em leitões de creche. Receptores para F18 não são produzidos em leitões neonatos, porém se tornam abundantes em leitões desmamados (IMBERECHTS et al., 1997; FRANCIS, 2004). Sítios de ligação para F6 em animais mais velhos são bloqueados por competição por receptores análogos no conteúdo do lúmen intestinal ou açúcares presentes no glicocálice (DEAN, 1990).

Além dos fatores de adesão citados anteriormente, há descrições de infecção em leitões pelo patotipo de *E. coli* “*attaching and effacing*” (AEEC), que adere à mucosa intestinal e se fixa às células intestinais por meio de uma proteína externa da membrana da bactéria (*Eae*), causando lesões semelhantes ao patotipo enteropatogênico (EPEC) em humanos (MORÉS & BARCELLOS, 2012).

2.1.2.2 Enterotoxinas

Após a adesão aos enterócitos, as ETEC são capazes de se multiplicar e produzir um ou mais tipos de enterotoxinas (COWART, 1995; MORÉS & MORENO, 2007; ALFIERI et al., 2010), as quais são peptídeos ou proteínas e cujos genes estão localizados em plasmídeos (NATARO & KAPER, 1998; O'BRIEN & HOLMES, 1996). Entre estas, já foram identificadas a toxina termolábil (LT), toxina termoestável (ST), toxina Shiga like

tipo 2e (Stx2e) e toxina da *E. coli* enteroagregativa termoestável 1 (EAST1) (WILSON & FRANCIS, 1986; FRANCIS, 2002; FRANCIS, 2004).

Dois tipos de enterotoxinas são particularmente importantes na patogenia das diarreias em leitões desmamados e são classificadas de acordo com sua estabilidade térmica: a LT, inativada a 60°C por 15 minutos e a ST, resistente ao calor de 100°C por 15 minutos (FAIRBROTHER & GYLES, 2006), as quais possuem respectivamente, alto e baixo peso molecular (EWING & COLE, 1994).

As enterotoxinas provocam alterações nos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos e levam à alteração do equilíbrio hidrossalino do lúmen intestinal, resultando na secreção de eletrólitos e, conseqüentemente, aumento da excreção de fluídos (GUTH, 2008). Ambas as enterotoxinas LT e ST ocasionam diarreia do tipo secretora, porém, envolvem diferentes mecanismos de ação:

2.1.2.2.1 Enterotoxinas Termolábil:

As enterotoxinas LT apresentam semelhanças estruturais, antigênicas e funcionais com a toxina colérica (choleraen, expressa pelo *Vibrio cholerae*) (DALLAS & FALKOW, 1980; O'BRIEN & HOLMES, 1996) e constituem os determinantes de virulência mais bem caracterizados em ETEC (GUTH, 2008). Existem dois subtipos, LT-I e LT-II, respectivamente divididos em LT-Ih (humano) e LT-Ip (*pig*), e LT-IIa e LTIIb (DUBREUIL, 2008), codificados pelos genes *elt* ou *etx* localizados em plasmídeos, também podendo conter genes que codificam ST (NATARO & KAPER, 1998; TURNER et al., 2006). A LT-I é associada com doenças em humanos e a LT-II é associada primariamente com ETEC espécie-específica, ambas possuem mecanismos de ação similares, mas imunologicamente distintas (DUBREUIL, 2008).

Após ser secretada pela bactéria, a toxina se liga aos receptores na célula-alvo, sendo internalizada por endocitose (GUTH, 2008). A enterotoxina ocasiona o aumento da produção do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (NATARO & KAPER, 1998), dependente da proteína quinase A (WIMER-MACKIN et al., 2001). Após, ocorre fosforilação do CFTR (regulador transmembrana da fibrose cística) resultando na estimulação do aumento da secreção de Cl⁻ pelas células das criptas epiteliais e inibição da

absorção de Na^+ pelos enterócitos das vilosidades intestinais. Consequentemente, ocorre diarreia (SPRANGLER, 1992; RAPPUOLI et al., 1999), desidratação, acidose e hipercalemia nos animais acometidos (COWART, 1995).

Além deste, outro mecanismo alternativo pode estar associado à resposta secretora induzida pela enterotoxina LT, como a estimulação do metabolismo do ácido araquidônico, potencializando a produção de prostaglandinas e leucotrienos que estimulam o transporte eletrolítico e a mobilidade intestinal (NATARO & KAPER, 1998; GUTH, 2008).

2.1.2.2.2 Enterotoxinas Termoestáveis:

Essa enterotoxina é dividida em duas classes, STa (STI) e STb (STII), de acordo com a solubilidade em etanol e atividade biológica. A STa é solúvel em metanol e resistente à proteases, enquanto que a STb é insolúvel em metanol e sensível à proteases (BURGESS et al., 1978; GUTH, 2008).

Variantes genéticas da toxina STa apresentam homologia parcial tanto na sequência de aminoácidos como na de nucleotídeos, e foram caracterizadas de acordo com o hospedeiro do qual são isoladas. Dessa forma, amostras de origem humana são denominadas STh (ou ST-Ib) (DUBREUIL, 2006), enquanto que a STp (ou ST-Ia) foi identificada em amostras que causavam doenças em suínos, também sendo detectadas em bovinos e humanos (NAIR & TAKEDA, 1998; GUTH, 2008).

A toxina STa estimula a produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (COWART, 1995; VAANDRAGER, 2002), levando à ativação do CFTR dependente da fosforilação da proteína quinase G (DUBREUIL, 2008). Esta ativação leva ao aumento da secreção de Cl^- e água e inibição da absorção de Na^+ no intestino delgado, desencadeando diarreia (VAANDRAGER, 2002; MORÉS & MORENO, 2007). É mais frequente e de grande importância na diarreia em animais neonatos (FRANCIS, 2004; TURNER et al., 2006; ALFIERI et al., 2010).

A ação da STb ainda é pouco compreendida, porém, sabe-se que não há envolvimento dos nucleotídeos intracitoplasmáticos AMPc ou GMPc, como ocorre na LT e STa (DUBREUIL, 2008). Dreyfus et al. (1993) sugerem que a ação da STb seja pelo estímulo dos canais de Cl^- dependentes de Ca^{2+} (CaCC), elevando seus níveis

intracelulares. Essa ação ativa a proteína quinase C e, conseqüentemente, o CFTR. Segundo PETERSON & WHIPP (1995), o estímulo secretório induzido pela ação da STb envolveria a ativação do sistema nervoso entérico. Neste processo há a síntese de prostaglandina endoperoxidase levando assim aos mecanismos secretórios (DUBREUIL, 2008). Além de alterações no trânsito e absorção intestinal, a ligação da STb aos enterócitos causa também lesões estruturais no epitélio, como o encurtamento e atrofia de vilosidades, mas sem alterar os enterócitos presentes nas criptas das vilosidades intestinais (CHAO & DREYFUS, 1997; DUBREUIL, 2008; ALFIERI et al., 2010). Originalmente, essa enterotoxina foi relacionada à diarreia em suínos, geralmente detectada em animais com mais de uma semana de idade (ALFIERI et al., 2012), mas também foi encontrada em amostras de ETEC humanas (OKAMOTO et al., 1993; GUTH, 2008).

Os genes da STb, assim como da STa, estão localizados em plasmídeos e foram descritos como parte de um *transposon* (Tn₄₅₂₁) (LEE et al., 1985). Outro plasmídeo carregando uma ilha de patogenicidade (PAI₂₁₇₃) foi descrito portando os genes de ambas ST em um plasmídeo conjugado (pTC₂₁₇₃) que também continha o gene *tetB*, que confere resistência a tetraciclina (NAGY & FEKETE, 2005).

As ETEC frequentemente isoladas em casos de diarreia em leitões na creche são caracterizadas pela produção das enterotoxinas LT, STa e STb ou combinações das mesmas (NAGY & FEKETE, 1999). Ambas LT e STb e, em alguns casos, também a STa, são expressas simultaneamente com a fímbria F4 (BOERLIN et al., 2005; DO et al., 2006).

2.1.2.2.3 Outras enterotoxinas encontradas em *Escherichia coli* isoladas em diarreia de suínos:

Existe ainda uma terceira classe de ST, associada à STa, denominada de EAST1 que normalmente está presente em cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAEC) e eventualmente é encontrada em ETEC isoladas de suínos (FRANCIS, 2004; MORÉS & MORENO, 2007; FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Apesar de apresentar 50% de homologia com o domínio enterotoxigênico da STa, foi considerada diferente das ST. A atividade biológica da EAST1 parece ser similar à atividade da STa, pois a partir da exposição da mucosa

intestinal, também foi demonstrada elevação na concentração intracitoplasmática de GMPc (SAVARINO et al., 1993).

Outra toxina que pode ser produzida pela ETEC é a toxina Shiga-like tipo 2e (STx2e). Esta toxina tem uma maior relação com a doença do edema dos suínos (pós-desmame), e não as síndromes de diarreias (FRANCIS, 2004; ALFIERI et al., 2010). Porém, algumas cepas podem causar tanto diarreia como doença do edema, podendo ocorrer como doenças isoladas ou associadas (FRANCIS, 2002; FAIRBROTHER & GYLES, 2006).

2.1.2.3 Hemólise

A maioria das amostras de *E. coli* causadoras de diarreia na creche são beta-hemolíticas em ágar sangue (GUERREIRO, 1984) e parecem ter vantagem seletiva à proliferação e consequente dominância sobre a microbiota intestinal de leitões desmamados (HAMPSON, 1994). Entretanto, cepas alfa ou fracamente beta-hemolíticas (NAGY & FEKETE, 1999; FAIRBROTHER & GYLES, 2006) e não-hemolíticas também podem estar associadas a casos de colibacilose na creche (HOBLE et al., 1986; NAGY & FEKETE, 1999). Já no período neonatal, é encontrado um número maior de cepas alfa ou não-hemolíticas associadas à diarreia (FRANCIS, 2004). A presença da hemólise como marcador de clones virulentos foi utilizada por vários autores como indicadores de patogenicidade (VAN DEN BOSCH et al., 1982; BRITO et al., 1999; ALFIERI et al., 2010). Outros trabalhos associam a produção de hemolisinas com maior frequência a determinados virotipos fimbriais (F4 e F18), frequentes durante o alojamento na creche, e não aos virotipos fimbriais que ocorrem na fase de maternidade (F5, F6 e F41), pois estes geralmente não são hemolíticos (FRANCIS, 2002).

A fímbria F4 tem o gene responsável por sua expressão geralmente localizado no mesmo plasmídeo que alberga o gene determinante da hemólise (MORÉS & BARCELLOS, 2012). Como a fímbria F4 geralmente é a mais frequente nas diarreias da creche, grande parte das amostras patogênicas isoladas nesta fase tendem a ser hemolíticas quando semeadas em ágar sangue (MORÉS & MORENO, 2012).

2.1.3 Epidemiologia

Perdas com a diarreia em leitões desmamados já foram descritas em praticamente todo mundo, sendo que a morbidade é extremamente variável, em função dos fatores de risco existentes nas criações (MORÉS & MORENO, 2012). Trabalhos relatam que a colibacilose pode afetar até 80% dos animais durante um surto, com uma média de 30-40% (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). O índice de mortalidade pode atingir 25% se adequadas medidas de tratamento não forem aplicadas (HAMPSON, 1994), sendo considerada uma importante causa de morte em leitões desmamados. Os principais fatores considerados como predisponentes à colibacilose na fase, de creche são:

- Temperatura e umidade: excesso de frio e/ou umidade nas instalações, falha em manter temperatura dentro da faixa de conforto térmico (entre 22°-28°C), excesso de variação térmica diária (acima de 6°C em um dia) (MORÉS & MORENO, 2012) e uso de pisos com má drenagem, gerando excesso de umidade;
- Nutrição: má qualidade da ração e/ ou da água, alimentação não padronizada, rações inadequadas para a idade dos animais (MORÉS & MORENO, 2012) ou desbalanceadas para determinados ingredientes, presença de micotoxinas na ração e fornecimento de água não potável;
- Alta pressão de infecção: uso de sistema de produção contínuo, ausência de vazio sanitário adequado (MORÉS & MORENO, 2012), falhas de limpeza e desinfecção das instalações entre os alojamentos e falhas na higienização diária das baias. A dificuldade em manter o ambiente livre de contaminação fecal é considerada um importante fator predisponente na etiologia das diarreias (BARCELLOS et al., 2011);
- Estresse: transporte em condições de desconforto, espaço reduzido nas baias (MORÉS & MORENO, 2012), mistura de animais de várias origens (ALFIERI et al., 2010), vacinação e mudança da alimentação;
- Condição do leitão na chegada à creche: peso ao desmame menor que 6,3kg e/ou mau estado dos animais por ocasião da transferência das maternidades para as creches (MORÉS & MORENO, 2012).

Em muitos casos, são identificados em animais doentes outros agentes infecciosos associados. No Brasil, os mais comuns tem sido *Isospora suis*, Rotavirus tipo A, *Clostridium perfringens*, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira* sp., *Salmonella typhimurium* (MORES & BRITO, 2007; MORÉS & MORENO, 2012) e o Circovirus Suíno tipo 2 (PCV2) (BARCELLOS et al., 2011). A variação na prevalência dos enteropatógenos nos rebanhos suínos geralmente se relaciona com fatores como manejo, dinâmica de infecciosidade dos agentes, pressão de infecção, *status* imunitário do rebanho e uso de antimicrobianos (MENIN et al., 2008). O quadro clínico das infecções associadas geralmente é similar ao da colibacilose, com desidratação e aumento de mortalidade (NEUMANN, 2009).

É reconhecido que sorotipos específicos de *E. coli* desempenham um papel central na etiologia da diarreia pós-desmame. Entretanto, a condição é complexa e multifatorial (HAMPSON, 1994). Entre os fatores predisponentes citados, as alterações na fisiologia digestiva decorrentes do início da ingestão da ração pré-inicial são considerados como os mais comuns. Principalmente devido ao uso de rações de baixa digestibilidade, que podem gerar substratos no ID, atuando como meio favorável para a multiplicação das ETEC, e também pode ocorrer após o fornecimento de rações em comedouros sujos, ou a ingestão de rações já fermentadas (MORÉS & MORENO, 2012).

Os virotipos podem estar associados à área geográfica em que a bactéria é isolada, existindo variabilidade na prevalência e associação dos mesmos (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Os principais virotipos e sorogrupos O de *E. coli* associados com a diarreia nesta fase são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características das cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) associadas às infecções em suínos da fase de creche

Sorogrupo	CARACTERÍSTICAS DA ETEC			IDADE DO ANIMAL	
	Fímbria	Toxina	Hemolisina	Neonato	Desmamado
O8	F4 ^{1,2}	LT ^{1,2} , STb ^{1,2} +/- STa ^{1,2}	+	Sim	Sim
O149	F4 ^{1,2}	LT ^{1,2} , STb ^{1,2} +/- STa ^{1,2}	+	Sim	Sim
O157	F4 ^{1,2}	LT ^{1,2} , STb ^{1,2} +/- STa ^{1,2}	+	Sim	Sim
O138	F18ab ^{1,2} , F18ac ^{1,2}	STa ^{1,2} , STb ^{1,2} , Stx2e ²	+	Não	Sim
O139	F18ab ^{1,2}	STa ^{1,2} , STb ^{1,2} , Stx2e ²	+	Não	Sim
O141	F18ac ^{1,2}	STa ^{1,2} , STb ^{1,2}	+	Não	Sim
O157	F18ac ^{1,2}	STa ^{1,2} , STb ^{1,2} +/- Stx2e ²	+	Não	Sim

ST: toxina termoestável; LT: toxina termolábil

¹ Alfieri et al., 2010; ² Francis, 2002

2.1.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da diarreia na creche por ETEC são semelhantes aos da colibacilose neonatal, porém o curso da doença pode ser mais lento (MORÉS & MORENO, 2012). Usualmente começa dentro de 3-5 dias após o desmame e tem um curso de 2 a 3 dias, podendo se estender (HAMPSON, 1994; MORÉS & MORENO, 2012).

O principal sinal clínico presente é diarreia com consistência variando de pastosa a líquida (MORÉS & MORENO, 2012), de coloração amarelada ou acinzentada, causando perda de peso progressiva (RICHARDS & FRASER, 1961). Os leitões afetados apresentam apatia, perda de apetite, desidratação e mau estado corporal (HAMPSON, 1994). Pode ser observada agitação da cauda dos leitões afetados, as extremidades do focinho, orelha e abdômen podem estar cianóticas, a temperatura retal tende a ser normal e, eventualmente, podem ocorrer sinais de incoordenação motora (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Em decorrência da desidratação, pode ocorrer hemo-concentração, acidose metabólica

(MORÉS & MORENO, 2007) e depleção de eletrólitos (EWING & COLE, 1994), evoluindo para a morte. Em alguns casos, um ou mais leitões em boas condições podem morrer subitamente no início da doença (HAMPSON, 1994), geralmente observado por volta de dois dias após o desmame, sendo o maior índice entre 6-10 dias pós-desmame (FAIRBROTHER & GYLES, 2006).

2.1.5 Lesões

Na necropsia geralmente não são detectadas lesões macroscópicas ou microscópicas significativas (MORÉS & MORENO, 2012). Observa-se no ID apenas excesso de conteúdo com consistência variando de líquido a mucoide e, às vezes, excesso de gás (FAIRBROTHER & GYLES, 2006; MORÉS & MORENO, 2012). No IG, presença de conteúdo excessivamente líquido (FAIRBROTHER & GYLES, 2006; MORÉS & MORENO, 2012) com coloração acinzentada ou amarelada (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Em geral, o estômago está cheio de ração ou conteúdo líquido (HAMPSON, 1994; MORÉS & MORENO, 2012). As alças intestinais apresentam-se dilatadas e com parede delgada e a serosa do ID pode estar levemente avermelhada (HAMPSON, 1994; FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Em leitões com colibacilose e em choque, pode ser observada severa congestão gástrica e da mucosa do ID. Estas lesões são comumente associadas com trombos microvasculares fibrinosos (FAIRBROTHER & GYLES, 2006).

O principal achado microscópico é a presença de enterite catarral, hiperplasia das criptas intestinais e presença de bactérias com morfologia de bastonetes aderidas à mucosa intestinal (MORÉS & MORENO, 2012). Praticamente não há outras lesões, em alguns casos pode ser observado aumento de neutrófilos na superfície da lâmina própria (FAIRBROTHER & GYLES, 2006).

2.1.6 Diagnóstico

A colibacilose e outras diarreias que ocorrem durante o alojamento na creche possuem sinais clínicos e alterações anatomopatológicas similares (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Por isso, para que seja possível obter um diagnóstico preciso, deve-se

recorrer a exames laboratoriais (MORÉS & MORENO, 2007; MORÉS & MORENO, 2012).

No Brasil, com frequência o diagnóstico de colibacilose em leitões é realizado somente através do isolamento bacteriano, sem a identificação da presença ou ausência de fatores de virulência nas cepas isoladas (MACÊDO, 2005). Como a *E. coli* faz parte da microbiota intestinal, apenas o isolamento não deve ser considerado suficiente para concluir um diagnóstico. Recomenda-se a caracterização fenotípica e genotípica da amostra, a fim de detectar fatores de virulência na cepa isolada (NAGY & FEKETE, 1999; FAIRBROTHER, 2006; ALFIERI et al., 2010) e, desta forma, aumentar a precisão do diagnóstico.

O exame laboratorial para isolamento da *E. coli* pode ser realizado com fezes ou conteúdo intestinal (MORÉS & MORENO, 2007). As amostras devem ser coletadas de modo asséptico diretamente do reto do leitão, com a utilização de luvas e/ou suabes e frascos estéreis, evitando contaminação com cepas de *E. coli* ambientais ou veiculadas pelo homem (ALFIERI et al., 2010).

A detecção dos genes codificadores das fímbrias e enterotoxinas nas amostras de *E. coli* permitem um grande avanço no diagnóstico da infecção pelo agente (MORÉS & BARCELLOS, 2012). A caracterização genotípica da *E. coli* pode ser realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que apresenta alta sensibilidade e especificidade quando utilizada em amostras clínicas ou colônias bacterianas isoladas, identificando o(s) gene(s) que codifica(m) a(s) fímbria(s) e/ou enterotoxina(s) (NATARO & KAPER, 1998; QUADRI et al., 2005; FAIRBROTHER, 2006; ALFIERI et al., 2010). A técnica de PCR *multiplex* representa uma melhoria no processo de diagnóstico, pois permite a pesquisa de diferentes fatores de virulência da *E. coli* pela amplificação de DNA, com a utilização de diferentes *primers* em uma mesma reação (NATARO & KAPER, 1998; FRANCIS, 2004; QUADRI et al., 2005), simplificando e reduzindo os custos da identificação do agente. O seu uso evita problemas na detecção de alguns fatores associados com a baixa expressão "*in vitro*" dos mesmos (MORÉS & BARCELLOS, 2012). Porém, apesar das vantagens da PCR *multiplex*, o método também apresenta limitações, pois já foi verificado que algumas cepas de *E. coli* apresentam o gene para determinada proteína, mas não o expressam como fator de virulência (FRANCIS, 2004; ALFIERI et al., 2010), gerando resultados falso-positivos.

No exame histopatológico, as lesões da colibacilose são pouco evidentes, pode-se identificar bactérias aderidas à mucosa intestinal pelas técnicas de imunofluorescência indireta ou imunoperoxidase (FAIRBROTHER & GYLES, 2006), podendo servir como uma informação importante para definir o agente como causador da diarreia (WILSON & FRANCIS, 1986).

Provas sorológicas (tipagem sorológica) tem alto valor epidemiológico, permitindo obter dados relativos à dinâmica da infecção ou mesmo analisar fontes de infecção (MORÉS & BARCELLOS, 2012). Originalmente, a tipificação das cepas de *E. coli* era realizada através de técnicas sorológicas (soroaglutinação em lâmina), pouco práticas, principalmente pela dificuldade de obtenção de painéis de soros confiáveis. Outras formas de diagnóstico fenotípicos para *E. coli* podem ser ainda realizadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) ou por imunofluorescência indireta, para a identificação da presença das fímbrias nas cepas isoladas (FRANCIS, 2004; FAIRBROTHER & GYLES, 2006; ALFIERI et al., 2010). Anticorpos monoclonais apresentam especificidade, sensibilidade e permitem a detecção dos fatores de virulência STa, F4, F5 e F41 (FAIRBROTHER & GYLES, 2006). Entretanto essas técnicas apresentam limitações, pois alguns fatores de virulência da *E. coli* (como F6 e o subtipo F18ab) não são expressados de forma satisfatória em cultivos "*in vitro*" (ALFIERI et al., 2010).

2.1.7 Controle e Prevenção

A medida de controle inicial para o controle da colibacilose deve ser a identificação e correção dos fatores de risco e aspectos ligados à limpeza e desinfecção, priorizando também a manutenção de ambientes secos e aquecidos para os leitões (MORÉS & BARCELLOS, 2012). Pode ser cessado o fornecimento da ração dos animais por um dia, oferecendo apenas água medicada e/ou reidratante, reiniciando o arraçoamento de forma gradativa, com pequenas quantidades, várias vezes ao dia (MORÉS & MORENO, 2012).

Para o tratamento da doença podem ser utilizados, por via oral e/ou parenteral, antibióticos de amplo espectro de ação e que ajam com eficiência frente a bactérias Gram-negativas (NAGY & FEKETE, 1999; ALFIERI et al., 2010). Os princípios ativos mais eficientes são, em geral, as cefalosporinas (ceftiofur), aminociclítóis (apramicina), sulfas

associadas à trimetoprima, polimixina (colistina), aminoglicosídeos (como gentamicina e neomicina) e quinolonas (como enrofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina e danofloxacina) (ALFIERI et al., 2010; MORÉS & BARCELLOS, 2012). A medicação deve ser fornecida por 5-7 dias, preferencialmente via água, pois o consumo de ração logo após o desmame é menor e pode variar (NAGY & FEKETE, 1999).

O amplo e algumas vezes indiscriminado uso de antimicrobianos pode resultar na seleção de bactérias resistentes, podendo tornar-se predominantes na população bacteriana e transferir material genético para outros microorganismos susceptíveis, que então adquirem resistência (VAZ, 2009). Sabe-se que em *E. coli* genes de resistência podem residir no mesmo plasmídeo de genes de virulência. Por exemplo, como citado anteriormente, os genes das toxinas STa e STb e o gene de resistência às tetraciclina estão conjugados e presentes no plasmídeo de 120kb, denominado pTC (OLASZ et al., 2005). O conhecimento da patogenicidade dos isolados, bem como de seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos, podem auxiliar para a redução do uso dessas drogas no tratamento dos animais, e dessa forma diminuir o risco de surgimento de *E. coli* resistentes em suínos e no seu ambiente (MACÊDO, 2005).

Como suporte pode ser realizado a fluidoterapia (NAGY & FEKETE, 1999), principalmente para a colibacilose neonatal, pois os leitões podem apresentar alta taxa de desidratação que geralmente leva o animal à morte se não tratado a tempo (ALFIERI et al., 2010).

Outras medidas importantes para o controle e prevenção da colibacilose consistem em aumentar a idade e o peso do animal ao desmame; uso de dietas com boa digestibilidade; uso de probióticos, prebióticos e/ou acidificantes (NAGY & FEKETE, 1999). Devido à baixa absorção no trato gastrointestinal e baixo custo, a suplementação em dietas no pós-desmame com altos níveis de óxido de zinco constitui uma prática utilizada mundialmente, visando à prevenção da diarreia, uma vez que os íons de zinco (Zn) podem interagir com a *E. coli* inibindo e/ou reduzindo a atividade da mesma no trato gastrointestinal dos suínos (JENSEN-WAERN et al., 1996).

Na resposta imunitária contra as diferentes formas colibacilose deve-se procurar desenvolver títulos altos da imunoglobulina A (IgA), que tem como ação a proteção das mucosas (GUERREIRO, 1984). As vacinas para porcas disponíveis no mercado tem a

finalidade de transmitir imunidade aos leitões na maternidade através de anticorpos (principalmente da classe IgA) que são veiculados pelo colostro e/ ou leite (EWING & COLE, 1994; NAGY & FEKETE, 1999). Essas vacinas são inativadas, contendo diferentes antígenos de *E. coli*, os mais comuns são as fímbrias dos tipos F4, F5 e F6 e a enterotoxina LT (MORÉS & BARCELLOS, 2012). Pela supressão da ingestão do leite no desmame, as vacinas comerciais teriam um efeito significativo somente para a colibacilose na maternidade.

Já foram testadas vacinas de *E. coli* para leitões desmamados, como um produto contendo cepas vivas de *E. coli* F4+ não-patogênicas. Animais imunizados com a mesma apresentaram maior resistência a infecções com cepas expressando o fator de virulência F4 (EWING & COLE, 1994). Em geral, vacinas deste tipo ainda não são consideradas alternativas totalmente práticas e eficientes (NAGY & FEKETE, 1999) e, por isso, não são empregadas rotineiramente. Recentemente, uma vacina para leitões em aleitamento contendo o antígeno F4 numa amostra viva avirulenta foi lançada comercialmente no Canadá (NADEAU et al., 2010) e está em fase de registro no Brasil. Além destas, uma vacina viva produzida com amostra atenuada de *Salmonella*, a qual expressa fímbrias de ETEC, tem apresentado resultados significativos em situações experimentais (MORÉS & BARCELLOS, 2012).

3 ARTIGO

“FREQUÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITÕES DESMAMADOS”

Abstract

The frequency of virulence factors in strains of Escherichia (E.) coli isolated from weaned piglets was assessed. For classification of the strains of enterotoxigenic pathotypes of E. coli, rectal swabs were collected from 25-40 days old nursery piglets with clinical signs of diarrhea in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná, totaling 456 samples. For isolation and bacterial characterization of the samples, phenotypic and molecular tests were used. The results of frequency of virulence factors and virotypes to fimbriae F4, F5, F6, F18, F41 and toxins LT, STa, STb and STx2e were submitted to statistical analysis. Out of 456 samples, 287 showed significant growth of E. coli. The highest frequency was observed for F4 and F18 fimbriae and LT, STa and STb enterotoxins. The most prevalent virotypes were F18-STa, F4-LT-STa-STb, STa-F4, F4-LT-STa-STb and F18-STx2e. Ninety-three samples (32.4%) were negative for virulence genes. There was a significant association between positive samples for F4 fimbriae and enterotoxins LT, STa and STb; between the F18 fimbriae and STa and STx2e; between F5 fimbriae and all enterotoxins. The most frequent toxins (LT, STb) presented significant association ($P < 0.02$). Beta-hemolysis was observed in 47.4% of the samples and there was a association ($P < 0.0001$) between hemolysis and fimbriae F4, F18, STa and STx2e. Regarding stool consistency, it was observed a association between liquid consistency and F4 and STa. Based on the results, it can be concluded that ETEC is an important agent of diarrhea in weaned pigs. In several samples (32.4%) virulence factors were not detected, suggesting the action of other factors and/or agents inducing diarrhea. And besides these, there are other hypotheses to explain this discrepancy, which were reviewed in this work.

Key words: Swine, colibacillosis, *Escherichia coli*, diarrhea, virulence factors.

INTRODUÇÃO

Escherichia (E.) coli enterotoxigênica (ETEC) é um dos principais agentes infecciosos das duas formas mais frequentes de diarreia dos leitões, a colibacilose neonatal, na maternidade, e a colibacilose do desmame, nas primeiras semanas após o alojamento na creche (NAGY & FEKETE, 1999; ALFIERI et al., 2010). Além de ser considerada a principal responsável por diarreia logo após o desmame, a colibacilose pode causar alta mortalidade de leitões nesta fase, podendo atingir 25% se medidas adequadas de prevenção e/ou tratamento não forem adotadas (HAMPSON, 1994). Pode ainda provocar expressivas perdas econômicas pelo emagrecimento, atraso no crescimento (BARCELLOS & STEPAN, 1991; EWING & COLE, 1994), aumento no uso de medicamentos e desinfetantes, necessidade de serviços veterinários, piora da conversão alimentar, redução no ganho de peso, predisposição dos animais afetados a infecções secundárias e, conseqüentemente, determinando variabilidade no peso dos animais do lote (ALFIERI et al., 2010; BARCELLOS et al., 2011).

A bactéria *E. coli* faz parte da microbiota intestinal dos animais domésticos (EWING & COLE, 1994; MENIN et al., 2008; MORÉS & MORENO, 2012) e algumas amostras podem causar uma variedade de doenças em suínos. Para produzir diarreia, a bactéria precisa aderir ao epitélio dos enterócitos, evitando sua eliminação através do peristaltismo (COWART, 1995; MENIN et al., 2008) e produzir enterotoxinas (FAIRBROTHER & GYLES, 2006; MORÉS & MORENO, 2012). A adesão é mediada por fímbrias, sendo as principais: F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987), F7 (F41) (COWART, 1995; FRANCIS, 2004; MORÉS & MORENO, 2012) e F18 (MORÉS & MORENO, 2012). E as enterotoxinas frequentemente envolvidas nos casos de diarreia são a termolábil (LT) e as termoestáveis (STa, STb) (DUBREUIL, 2008). Sendo assim, para definir a patogenicidade, é essencial a identificação destes fatores de virulência (NATARO & KAPER, 1998; FRANCIS, 1999).

Denomina-se virotipo, o conjunto dos fatores de virulência presente em um mesmo isolado de ETEC (MACÊDO et al., 2007). Existe uma ampla distribuição de virotipos em casos de colibacilose no Brasil e em outros países (POST et al., 2000; FRANCIS, 2004; MACÊDO et al., 2007; VIDOTTO et al., 2009) e a definição da significância ou não de um

virotipo é um fator crítico para estabelecer a necessidade ou não de instituir um tratamento contra a infecção. Com isto, pode-se prevenir o uso inadequado de antimicrobianos, reduzindo o risco da indução de resistência (VAZ, 2009). Além disto, constitui uma informação importante para a definição da epidemiologia da infecção nas granjas.

O objetivo deste estudo foi pesquisar a frequência de virotipos de ETEC envolvidos com diarreia em suínos na fase de creche, usando a técnica de PCR *multiplex real time* com *primers* específicos para os genes codificadores dos principais fatores de virulência. Também foi realizada análise estatística das associações entre a presença de toxinas; fímbrias e toxinas; fatores de virulência e tipo de hemólise; e fatores de virulência e a consistência das fezes.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas

Foram analisados materiais de treze granjas de sete áreas criatórias de suínos dos estados do Rio Grande do Sul (Lajeado e Marau), Santa Catarina (Concórdia e Videira) e Paraná (Cascavel, Marechal Cândido Rondon e Toledo), totalizando 456 amostras. Para exame, foram coletados suabes retais de leitões desmamados com idade entre 25-40 dias (fase de creche) com sinal clínico de diarreia, entre os meses de dezembro de 2011 a julho de 2012. Os animais não haviam sido medicados, com exceção do antibiótico que era adicionado à ração de forma preventiva (Colistina 120ppm). Todas as granjas amostradas pertenciam a uma mesma agroindústria e tinham manejo, instalações, ração e medicação das rações similares. No momento da coleta, para selecionar os animais com diarreia, era realizado um exame clínico incluindo observações como: presença de fezes com consistência alterada no piso, parede e/ou área inferior da baia ou gaiola dos animais; leitões sujos com fezes; região perineal com coloração avermelhada e/ou úmida; presença de agitação de cauda e, eventualmente, desidratação. As fezes foram classificadas visualmente, de acordo com a consistência em pastosas, cremosas e líquidas (GHELLER et al., 2008). Imediatamente após coletados, os suabes foram armazenados em meio de transporte (*Stuart*) e transferidos sob-refrigeração para processamento.

Análise Laboratorial

Para obtenção de colônias isoladas, cada suabe foi semeado, por esgotamento, em meio ágar sangue (enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado) e ágar MacConkey, incubados por 24 horas a 37°C. Para definir como significativo o crescimento nas placas, foi adotado o critério de que pelo menos 90% das colônias fossem fenotipicamente similares. Colônias com características sugestivas de *E. coli* (ágar sangue – coloração acinzentada e hemólise; ágar MacConkey – lactose positiva) foram repicadas para posterior realização de provas bioquímicas (OLIVEIRA, 2000). No ágar sangue, foi anotada a atividade hemolítica, classificada em alfa-hemólise (halo e ágar escurecidos) e beta-hemólise (halo bem delimitado com hemólise forte).

A extração do DNA (usando o kit NewGene Prep e NewGene Preamp) e a amplificação do DNA (kit NewGene Amp) foram realizados conforme as instruções do fabricante (Símbios Biotecnologia, Canoas, RS) e estão descritas resumidamente a seguir:

Extração de DNA: Uma suspensão bacteriana isolada no ágar sangue ou ágar MacConkey foi adicionada a 1000µL da solução NewGene Prep e incubada a 60°C por 10 min. Após centrifugação (10.000RPM/ 1min.), o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 20µL de uma suspensão sílica (fornecido no kit NewGene Preamp), agitando por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo agitado por inversão a cada dois minutos. Posteriormente foi realizada centrifugação (10.000RPM/ 1min.), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado e centrifugado (10.000RPM/ 1min.) duas vezes com 150µL de solução de lavagem "A" (5M tiocinato de guanidina, 0.1 M Tris-HCl [pH 6.4]), duas vezes com 150µL de solução de lavagem "B" (etanol 96%) e uma vez com 150µL de solução lavagem "C" (etanol absoluto), após esta última etapa, foram centrifugados duas vezes, para eliminação do sobrenadante. Posteriormente, foi realizada a secagem total da sílica (60°C/ 2 min.), adicionado 50µL de solução de eluição (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA), centrifugação por 3 minutos (10.000RPM) e coletado o sobrenadante com o DNA.

Deteção dos fatores de virulência: O kit NewGene Amp consiste de um PCR *multiplex real time*, no qual 2µL do DNA extraído é adicionado em 28µL de um mix

dos reagentes de amplificação (Master mix e *Taq* Polimerase). Os genes dos nove fatores de virulência foram amplificados em três reações *multiplex* distintas (*Multiplex1*, *Multiplex2* e *Multiplex3*) no termociclador StepOnePlus (Applied BiosystemsTM), onde o programa de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação de 3 minutos a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, e o anelamento por 1 minuto a 60°C. Os resultados foram obtidos através do Software StepOnePlusTM v2.2 (Applied BiosystemsTM). A Tabela 1 apresenta os *primers* utilizados neste estudo para a detecção dos genes que codificam as toxinas LT, STa, STb e STx2e e as fímbrias de adesão F4, F5, F6, F18 e F41.

Análise Estatística

A análise da frequência dos fatores de virulência e dos virotipos, para as fímbrias F4, F5, F6, F18, F41 e toxinas LT, STa, STb e STx2e foi efetuada com o uso do procedimento **FREQ** do SAS (SAS, 2005). A associação entre fímbrias, toxinas, hemólise e consistência das fezes foi realizada pelo Teste Qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 456 amostras, 287 (62,9%) foram positivas para *E. coli*, indicando que a maioria dos casos de diarreia no período pós-desmame observados neste estudo tinham como agente etiológico esta bactéria. As maiores frequências de genes para fímbrias foram para F4 (38,0%) e F18 (18,8%) e para as toxinas STa (48,8%), STb (31,4%) e LT (28,6%) (Tabela 2). Os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores, onde também foram descritos em maior frequência virotipos expressando as fímbrias F4 e/ou F18 (POST et al., 2000; FRYDENDAHL, 2002; FRANCIS, 2004; DO et al., 2005; NAGY & FEKETE, 2005; FAIRBROTHER & GYLES, 2006; ALFIERI et al., 2010), coincidindo com os achados do presente estudo (Tabela 3). Entre as duas fímbrias, a F4 tem sido a preponderante (WILSON & FRANCIS, 1986; OSEK, 1999; DO et al., 2005; WANG et al., 2006; MENIN et al., 2008).

A fímbria F5 foi encontrada com baixa frequência (5,6%). Valores pouco maiores (12,2%) foram relatados em creches no Brasil por Macêdo et al. (2007), e os autores sugeriram a possibilidade de que animais doentes na maternidade, já curados, ainda

estivessem portando o agente na creche. Outra possível interferência seria o desmame precoce, que influencia a redução dos receptores para esta fímbria (MACÊDO et al., 2007). Isto foi demonstrado estatisticamente ($P < 0,01$) por Wang et al. (2006), ao comprovar a relação entre o tipo de fímbria e a idade dos animais.

Nenhum isolado expressou as fímbrias F6 e F41, que são comuns apenas em diarreia de leitões na maternidade (FRANCIS, 2004; WANG et al., 2006; MENIN et al., 2008). Acredita-se que, com a idade, os receptores oligossacarídeos da parede celular para F5 e F6 sejam expressos com menor intensidade, reduzindo sua presença na creche. Já para a fímbria F4, os receptores não diminuem nesta fase (FAIRBROTHER & GYLES, 2006) e estão associados com diarreia tanto em neonatos como em desmamados (BROECK et al., 2000; JIN & ZHAO, 2000). Para a fímbria F18, os receptores não são produzidos em leitões na fase de aleitamento, porém tornam-se abundantes em leitões desmamados (IMBERECHTS et al., 1997; FRANCIS, 2004).

As amostras de ETEC comuns em episódios de diarreia em leitões da fase de creche geralmente produzem as toxinas LT, STa e STb ou combinações das mesmas (HAMPSON, 1994; NAGY & FEKETE, 1999). Os percentuais próximos ou superiores a 30% observados para estas toxinas corroboram valores iguais ou superiores a 56% do estudo de Do et al. (2006). A toxina STx2e foi encontrada em menor proporção do que as outras toxinas (7,0%), como também observado por Vidotto et al. (2009). Essa toxina é absorvida, age sistemicamente e está relacionada à doença do edema dos suínos (pós-desmame) e não à síndrome da diarreia neonatal ou pós desmame (IMBERECHTS et al., 1992; FRANCIS, 2004; ALFIERI et al., 2010). Algumas amostras podem causar diarreia e doença do edema, podendo ocorrer isoladamente ou associadas (FAIRBROTHER & GYLES, 2006).

Para definir se uma amostra é patogênica, é necessário que esteja expressando simultaneamente pelo menos uma fímbria e uma toxina. No presente estudo, 50,5% amostras foram consideradas ETEC patogênicas, de acordo com este critério. De todos os isolados, 55,7% e 62,4% foram positivos para pelo menos um tipo de fímbria e toxina, respectivamente. A ocorrência de mais de uma fímbria foi observada em 6,3% dos isolados enquanto 37,0% foram positivos para mais de uma toxina (Tabela 3). Os virotipos

encontrados com maior frequência foram F18-STa (11,1%), F4-LT-STa-STb (9,8%), F4-STa (7,3%), F4-LT-STb (6,3%) e F18-STa-STx2e (4,5%) (Tabela 3). Post et al. (2000) descreveram os virotipos F4-LT-STb (41,1%) e F18-STa-STb-STx2e (32,0%) como os mais frequentes para leitões desmamados com sinais clínicos de diarreia. O virotipo F4-LT-STa-STb foi o mais frequente nos estudos de Boerlin et al. (2005) e Do et al. (2006) (33,3%) em Ontario e Vietnã, respectivamente, e a combinação F4-LT-STb (42,5%) foi uma das mais prevalentes em um estudo nos EUA (ZHANG et al., 2007). A variação na frequência dos enteropatógenos e dos virotipos de ETEC nos rebanhos suínos pode estar relacionada com aspectos de manejo, dinâmica e pressão de infecção, integridade gastrointestinal, inibição competitiva, imunidade do rebanho, nutrição, uso de antimicrobianos e fatores estressantes (MENIN et al., 2008). Numa análise geral dos trabalhos em que fatores de virulência foram estudados, pode-se observar uma ampla distribuição de virotipos, indicando variabilidade de acordo com fatores multifatoriais presentes nas diferentes granjas ou áreas amostradas.

Noventa e três amostras (32,4%) não apresentaram simultaneamente gene fimbrial e de toxina (Tabela 3), maior do que o valor de 18,2% encontrado no trabalho de Do et al. (2006). A presença de amostras de *E. coli* com cultivo em placa de forma fenotipicamente significativa e não apresentando ao mesmo tempo uma fímbria e uma toxina é de difícil análise na interpretação de exames laboratoriais. Algumas hipóteses poderiam explicar este tipo de ocorrência: (i) mudança na expressão de receptores de acordo com a idade (FAIRBROTHER & GYLES, 2006); (ii) teste falso negativo para fimbrias com baixa expressão “in vitro”, como F6 e F41 (ALFIERI et al., 2010); (iii) presença de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) ou da fímbria AIDA não analisadas no painel de PCR usado no presente estudo (como observado por ALMEIDA et al., 2007); (iv) diarreia causada por outros patógenos como *Isospora suis* e rotavirus suíno (MORÉS & MORENO, 2012); (v) uso de vacinas comerciais, capazes de interferir com o efeito de fatores de virulência ou modificar a composição da microbiota intestinal e a inibição competitiva (DO et al., 2005); (vi) raras, mas possíveis mudanças na sequência de nucleotídeos analisadas na PCR, fazendo com que haja falha dos *primers* na etapa de sequenciamento (POST et al., 2000); (vii) perda de plasmídeo durante o processo de cultivo da amostra, resultando na ausência da produção de fímbria e/ou toxina (WITTIG et al.,

1994); (viii) existe também a possibilidade que os clones bacterianos examinados fossem negativos para determinados fatores de virulência, já que poucas colônias foram selecionadas para repique e posterior análise por PCR e sabe-se que em uma população bacteriana de uma placa de meio de cultivo coexistem colônias fenotipicamente similares expressando ou não fatores de virulência.

Houve associação significativa entre as fímbrias F4-F18 e F4-F5 ($P < 0,0002$) (Tabela 4). Para as toxinas mais detectadas (LT, STa e STb) houve associação significativa ($P < 0,02$) (Tabela 5), o que confirma relatos anteriores (SMITH & GYLES, 1970; VIDOTTO et al., 2009). Embora essas toxinas possam estar presentes na maioria das infecções sintomáticas, a LT é mais frequentemente relacionada ao quadro clínico de diarreia, pois geralmente ocorre simultaneamente com os principais fatores de colonização (ALFIERI et al., 2010). A maior frequência das toxinas LT e STb ou somente a STb no mesmo isolado, corrobora os resultados de outros trabalhos (HAREL et al., 1991; FRYDENDAHL, 2002), nos quais foram detectados plasmídeos contendo simultaneamente os genes para LT e STb e outros contendo somente o gene para STb. A presença de várias toxinas nas ETEC pode ser explicada pela ampla distribuição de plasmídeos conjugativos com múltiplos genes de virulência em amostras ETEC de suínos (VIDOTTO et al., 2009).

As ETEC de suínos podem apresentar diferentes associações de fímbrias e toxinas (NAGY & FEKETE, 2005). Foi observada a associação significativa ($P < 0,0001$) entre amostras positivas para a fímbria F4 e para toxinas LT, STa e STb; entre a fímbria F5 e todas as toxinas detectadas e a fímbria F18 e as toxinas STa e STx2e (Tabela 6). Smith & Gyles (1970) descrevem a fímbria F4 em associação com a toxina LT ou em combinação com as toxinas STa e/ou STb. Em outro estudo (DO et al., 2006), é descrita a associação de todos os isolados estudados expressando a fímbria F4 com a toxina STa. A F18 é a fímbria mais comumente associada à doença do edema dos suínos (FRANCIS, 2002; ALFIERI et al., 2010), e apresentou associação significativa ($P < 0,0001$) com a toxina STx2e (Tabela 6).

Também devem ser considerados que diversos genes de virulência bacteriano podem coexistir simultaneamente em plasmídeos com genes de resistência a antibióticos (VIDOTTO et al., 2009), o que poderia explicar a alta frequência de resistência

antimicrobiana que ocorre em granjas comerciais de suínos, que usam intensivamente princípios ativos no processo de produção (OLASZ et al., 2005). Nas granjas amostradas a colistina era usada rotineiramente como medicação profilática, o que poderia ter influenciado os resultados do estudo. Entretanto, não encontramos referências sobre a influência deste antibiótico e a expressão de fatores de virulência em *E. coli*. Existem na literatura registros da associação de genes para ETEC e determinados antibióticos, como para STa e STb e a resistência às tetraciclina que estão conjugados e presentes no mesmo plasmídeo de 120kb, denominado pTC (NAGY & FEKETE, 2005; OLASZ et al., 2005).

Em relação ao tipo de hemólise, 136 amostras (47,4%) apresentaram beta hemólise, coincidindo com o trabalho de Chapman et al. (2006). Foi observada associação significativa ($P < 0,0001$) entre as amostras beta-hemolíticas e as fímbrias F4 e F18 e as toxinas STa e STx2e (Tabela 7). A associação significativa entre a atividade hemolítica e a patogenicidade de amostras de *E. coli* já foi descrita em outros estudos (FRYDENDAHL, 2002; DO et al., 2005), porém, somente o uso deste critério pode levar a resultados falso positivos (FRYDENDAHL, 2002). A hemólise que ocorre durante o crescimento de determinadas amostras de *E. coli* em placas de ágar sangue é devida à produção de uma hemolisina, que por si só não é considerada um fator de patogenicidade significativo para a bactéria. A importância desta característica se dá pela frequente associação de clones hemolíticos com casos de diarreia em suínos, principalmente na fase de creche. A presença desse fenótipo como marcador de clones virulentos foi utilizada por vários autores como indicador de patogenicidade (VAN DEN BOSCH et al., 1982; BRITO et al., 1999). Alguns trabalhos associam a produção de hemolisinas com maior frequência aos virotipos fímbrias (F4 e F18), prevalentes durante o alojamento na creche, e não aos virotipos fímbrias que ocorrem na fase de maternidade (F5, F6 e F41), pois geralmente estes não apresentam hemólise em ágar sangue (FRANCIS, 2002). O sorogrupo hemolítico O149:K91 expressando o virotipo F4-LT-STa-STb foi encontrado com maior frequência por Do et al. (2006). A associação entre o sorogrupo O149 e a expressão do antígeno F4 tem sido confirmada em vários estudos (WILSON & FRANCIS, 1986; NAGY et al., 1990; HAREL et al., 1991), sendo estes isolados hemolíticos na maioria dos casos (DAM & KNOX, 1974; WILSON & FRANCIS, 1986; WITTIG & FABRICIUS, 1992). Estas observações reforçam a associação significativa ($P < 0,0001$) entre a fímbria F4 e a beta-hemólise,

observada no presente estudo (Tabela 7). A base genética que fundamenta a associação entre o fator de virulência e a capacidade hemolítica é devido ao fato de que a fímbria F4 tem o gene responsável por sua expressão geralmente localizado no mesmo plasmídeo que alberga o gene determinante da hemólise (MORÉS & BARCELLOS, 2012).

As fezes foram classificadas em “pastosas”, “cremosas” e “líquidas”, de acordo com a consistência (GHELLER et al., 2008). Nesse modelo, as fezes líquidas e cremosas certamente caracterizariam diarreia, e as fezes pastosas poderiam representar diarreia amena ou um desequilíbrio eventual de trânsito intestinal em alguns indivíduos, sem caracterizar diretamente uma situação patológica (BARCELLOS et al., 2011). A associação significativa observada entre as fezes de consistência líquida e a fímbria F4 e a toxina STa (Tabela 8) pode indicar relação com a intensidade dos sinais clínicos. Entretanto, a avaliação da consistência fecal é uma análise muito subjetiva, havendo diferenças nos critérios de diagnóstico mesmo entre técnicos experientes (BARCELLOS et al., 2011).

CONCLUSÕES

- A ETEC é um importante agente etiológico causador de diarreia em leitões desmamados.
- Amostras positivas apresentam amplas combinações entre os principais fatores de virulência envolvidos na patogenia da colibacilose na creche.
- *E. coli* não patogênicas são isoladas em leitões desmamados apresentando sinal clínico de diarreia, sugerindo outros fatores desencadeadores da diarreia.
- Correlações significativas entre as variáveis: fímbrias, toxinas, tipo de hemólise e consistência fecal, são encontradas em amostras de ETEC causando colibacilose em leitões desmamados.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BARRY, A. Diarreias em suínos. In: ALFIERI, A.F.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.A.; et al. (Eds.). **Tópicos em Sanidade e Manejo de Suínos**. Campinas: Sanphar; Sorocaba: Curuca Consciência Ecológica, p.165-184, 360p., 2010.
- ALMEIDA, F.S.; RIGOBELLO, E.C.; MARIN, J.M.; MALUTA, R.P.; ÁVILA, F.A. Diarreia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Ars Veterinária**, v.23, n.3, p.151-157, 2007.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; STEPAN, A.L. Estudo etiológico de diarreia em leitões recentemente desmamados. **Anais...** In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Águas de Lindóia/SP, p.60, 1991.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; SATO, J.P.H.; ANDRADE, M.R. Diarreias nutricionais dos suínos: uma visão do veterinário clínico. **Anais...** In: Simpósio Internacional de Suinocultura, Porto Alegre/RS, p.23-34, 2011.
- BOERLIN, P.; TRAVIS, R.; GYLES, C.L.; REID-SMITH, R.; LIM, N.J.H.; NICHOLSON, V.; McEWEN, S.A.; FRIENDSHIP, R.; ARCHAMBAULT, M. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.6753-6761, 2005.
- BRITO, B.G.; LEITE, D.S.; LINHARES, R.E.; VIDDOTTO, M.C. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.65, p.123-132, 1999.
- BROECK, W.V.; COX, W.; OUDEGA, B.; GODDEERIS, B.M. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. **Veterinary Microbiology**, v.71, p.223-244, 2000.
- CHAPMAN, T.A.; WU, X.; BARCHIA, I.; BETTELHEIM, K.A.; DRIESEN, S.; TROTT, D.; WILSON, M.; CHIN, J.J.C. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.7, p.4782-4795, 2006.
- COWART, R.P. Colibacillosis. In: COWART, R.P. (Ed.). **An Outline of Swine Diseases: A Handbook**. Iowa: Iowa State University Press, p.54-56, 1995.
- DAM, A.; KNOX, B. Haemolytic *Escherichia coli* associated with enteritis and enterotoxaemia in pigs in Denmark, with particular reference to the rapid spread of serogroup O149:K91. **Nordisk Veterinaer-Medicin**, v.26, n.3, p.219-225, 1974.

DO, T.N.; CU, P.H.; NGUYEN, H.X.; AU, T.X.; VU, Q.N.; DRIESEN, S.J.; TOWNSEND, K.M.; CHIN, J.; TROTT, D.J. Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre-weaning pigs in North Vietnam. **Journal Medical Microbiology**, v.55, p.93-99, 2006.

DO, T.; STEPHENS, C.; TOWNSEND, K.; WU, X.; CHAPMAN, T.; CHIN, J.; McCORMICK, B.; BARA, M.; TROTTI, D.J. Rapid identification of virulence genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates associated with diarrhoea in Queensland piggeries. **Australian Veterinary Journal**, v.83, n.5, p.293-299, 2005.

DUBREUIL, J.D. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. **FEMS Microbiology Letters**, v.278, n.2, p.137-145, 2008.

EWING, W.N.; COLE, D.J.A. **The Living Gut: An Introduction to Microorganisms in Nutrition**. N. Ireland: Context, 220p., 1994.

FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. Post-weaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. In: STRAW, B.E.; et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9.ed., Iowa: Blackwell Publishing, p.649-662, 2006.

FRANCIS, D.H. Colibacillosis in pigs and its diagnosis. **Journal Swine Health Production**, v.7, n.5, p.241-244, 1999.

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

FRANCIS, D.H. Post-weaning *E. coli* - diagnosis, treatment, control, and its effect on subsequent growth performance. **Proceedings...** In: American Association of Swine Veterinarians, p.495-499, 2004.

FRYDENDAHL, K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with post-weaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. **Veterinary Microbiology**, v.85, p.169-182, 2002.

GHELLER, N.B.; SANTI, M.; LIPPKE, R.T.; GONÇALVES, M.A.D.; RIBEIRO, A.M.L.; BARCELLOS, D.E.S.N. Visual assessment of fecal consistency in pigs. **Proceedings...** In: International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa, p.206, 2008.

HAMPSON, D.J. Post-weaning *E. coli* diarrhea in pigs. In: GYLES, C.L. (Ed.). **E. coli in Domestic Animals and Humans**. London: CABI, p.171-192, 1994.

HAREL, J.; LAPOINTE, H.; FALLARA, A.; LORTIE, L.A.; BIGRAS-POULIN, M.; LARIVIERE, S.; FAIRBROTHER, J.M. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.4, p.745-752, 1991.

IMBERECHTS, H.; DE GREVE, H.; LINTERMANS, P. The pathogenesis of edema disease in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.31, p.221-233, 1992.

IMBERECHTS, H.; BERTSCHINGER, H.U.; NAGY, B.; DEPREZ, P.; POHL, P. Fimbrial colonization factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea and edema disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.412, p.175-183, 1997.

JIN, L.Z.; ZHAO, X. Intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine - a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.54, p.311-318, 2000.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P.; RISTOW, L.E.; REIS, A.; GUEDES, R.M.C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR *multiplex* e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1117-1123, 2007.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1687-1693, 2008.

MORÉS, N.; BARCELLOS, D.E.S.N. Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial, p.116-122, 2012.

MORÉS, N.; MORENO, A.M. Colibacilose da terceira semana. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**, 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial, p.115-116, 2012.

NAGY, B.; CASEY, T.A.; MOON, H.W. Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea in Hungary. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.28, p.651-653, 1990.

NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v.30, p.259-284, 1999.

NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v.295, p.443-454, 2005.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

OLASZ, F.; FEKETE, P.Z.; BLUM-OEHLER, G.; BOLDOGKOI, Z.; NAGY, B. Characterization of an F18+ enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from post-weaning

diarrhoea of swine, and of its conjugative virulence plasmid pTC. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, n.2, p.281-289, 2005.

OLIVEIRA, S.J.de. **Microbiologia Veterinária - Guia Bacteriológico Prático**. 2.ed., Canoas: Editora Ulbra, 235p., 2000.

OSEK, J. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. **Veterinary Microbiology**, v.68, p.209-217, 1999.

POST, K.W.; BOSWORTH, B.T.; KNOTH, J.L. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea and edema disease in North Carolina. **Swine Health and Production**, v.8, n.3, p.119-120, 2000.

SAS. SAS/STAT User's Guide, Release 6.12 SAS Institute INC, Cary, NC. 2005.

SMITH, H.W.; GYLES, C.L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **Journal of Medical Microbiology**, v.3, p.387-401, 1970.

VAN DEN BOSCH, J.F.; EMÖDY, L.; KÉTYI, I. Virulence of haemolytic strains of *Escherichia coli* in various animal models. **FEMS Microbiology Letters**, v.13, p.427-430, 1982.

VAZ, E.K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p.147-150, 2009.

VIDOTTO, M.C.; LIMA, N.C.S.; FRITZEN, J.T.T.; FREITAS, J.C.; VENÂNCIO, E.J.; ONO, M.A. Frequency of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea in the North Parana State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.199-204, 2009.

WANG, J.; JIANG, S.W.; CHEN, X.H.; LIU, Z.L.; PENG, J. Prevalence of fimbrial antigen (K88 variants, K99 and 987P) of enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal and post-weaning piglets with diarrhea in central China. **Asian-Australasian Association of Animal Societies**, v.19, n.9, p.1342-1346, 2006.

WILSON, R.A.; FRANCIS, D.H. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.2, p.213-217, 1986.

WITTIG, W.; FABRICIUS, C. *Escherichia coli* types isolated from porcine *E. coli* infections in Saxony from 1963 to 1990. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.277, n.3, p.389-402, 1992.

WITTIG, W.; PRAGER, R.; STAMM, M.; STRECKEL, W.; TSCHAPE, H. Expression and plasmid transfer of genes coding for the fimbrial antigen F107 in porcine *Escherichia coli* strains. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.81, n.2, p. 130-139, 1994.

ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.145-152, 2007.

Tabela 1 - Descrição do *Multiplex* 1, 2 e 3 quanto à composição dos fatores de virulência (FV), sequência dos *primers* e tamanho dos fragmentos amplificados (amplicon).

PCR	FV*	SEQUÊNCIA Primers	Amplicon (pb**)
<i>Multiplex</i> 1 STa, STb, F18	STa	5' – CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT – 3'	158
		5' – TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG – 3'	
	STb	5' – TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT – 3'	113
		5' – CTC CAG CAG TAC CAT CTC TA – 3'	
	F18	5' – TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA – 3'	313
		5' – ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG – 3'	
<i>Multiplex</i> 2 CMPAmp LT, F41, STx2e	LT	5' – GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT – 3'	272
		5' – TGG TCT CGG TCA GAT AATG T – 3'	
	F41	5' – AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG – 3'	612
		5' – CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC – 3'	
	STx2e	5' – AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT – 3'	733
		5' – TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC – 3'	
<i>Multiplex</i> 3 CMPAmp F6, F4, F5	F6	5' – GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC – 3'	409
		5' – AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC – 3'	
	F4	5' – GTA TCT GTC CGA GAA TAT CA – 3'	499
		5' – GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG – 3'	
	F5	5' – AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA – 3'	230
		5' – AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT – 3'	

*Fator de virulência

**Pares de bases

Tabela 2. Frequência individual dos genes de fímbrias e toxinas detectadas em 287 amostras de *E. coli* isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia.

Fatores de Virulência	Presença % (n)
F4	38,0 (109)
F5	5,6 (16)
F6	0,0 (0)
F18	18,8 (54)
F41	0,0 (0)
LT	28,6 (82)
STa	48,8 (140)
STb	31,4 (90)
STx2e	7,0 (20)

Tabela 3. Distribuição percentual das associações dos genes fimbriais e de toxinas nas amostras de *E. coli* isoladas de leitões desmamados e com sinal clínico de diarreia.

	F4	F5	F18	F4+F5	F4+F18	F4+F5+ F18	Sem fímbria	TOTAL % (n)
LT	0,70* (2**)	-	0,35 (1)	-	-	-	-	1,05 (3)
STa	7,32 (21)	-	11,15 (32)	-	0,70 (2)	-	3,14 (9)	22,30 (64)
STb	0,70 (2)	-	-	-	-	-	1,39 (4)	2,09 (6)
LT+STa	0,70 (2)	-	-	-	-	-	0,35 (1)	1,05 (3)
LT+STb	6,27 (18)	-	-	-	-	-	4,18 (12)	10,45 (30)
LT+STa+STb	9,76 (28)	-	-	4,18 (12)	1,05 (3)	0,35 (1)	0,70 (2)	16,03 (46)
STa+STb	-	-	0,35 (1)	-	-	-	2,09 (6)	2,44 (7)
STa+STx2e	1,05 (3)	1,05 (3)	4,53 (13)	-	-	-	-	6,62 (19)
STa+STb +STx2e	-	-	0,35 (1)	-	-	-	-	0,35 (1)
Nenhuma toxina	5,23 (15)	-	-	-	-	-	32,40 (93)	37,63 (108)
TOTAL, % (n)	31,71 (91)	1,05 (3)	16,72 (48)	4,18 (12)	1,74 (5)	0,35 (1)	44,25 (127)	100,0 (287)

* percentual de amostras positivas; ** número de amostras positivas

Tabela 4. Associação entre fímbrias de amostras de *E. coli* isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia.

Fatores de virulência		Amostras positivas	
		F4	F5
F18	Negativa (n= 233)	44,2 (103)	6,4 (15)
	Positiva (n= 54)	11,1 (6)	1,8 (1)
	Valor de P (χ^2)	<0,0001	0,3214*
F4	Negativa (n= 178)	-	1,7 (3)
	Positiva (n= 109)	-	11,9 (13)
	Valor de P (χ^2)	-	0,0002

*Valor de P pelo teste de Fisher.

Tabela 5. Associação entre toxinas de amostras de *E. coli* isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia.

Fatores de virulência		Amostras positivas		
		STa	STb	STx2e
LT	Negativo (n= 205)	44,4 (91)	6,8 (14)	9,8 (20)
	Positivo (n= 82)	59,8 (49)	92,7 (76)	0,0 (0)
	Valor de P (χ^2)	0,0186	<0,0001	0,0034
STa	Negativo (n= 197)	-	-	9,6 (19)
	Positivo (n= 90)	-	-	1,1 (1)
	Valor de P (χ^2)	-	-	0,0084
STb	Negativo (n= 147)	43,6 (86)	-	0,0 (0)
	Positivo (n = 140)	60,0 (54)	-	14,3 (20)
	Valor de P (χ^2)	0,0102	-	<0,0001

Tabela 6. Associação entre fímbrias e toxinas de amostras de *E. coli* isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia.

	Fatores de virulência	Amostras positivas			
		LT % (n)	STa % (n)	STb % (n)	STx2e % (n)
F4	Negativa (n= 178)	9,0 (16)	38,2 (68)	14,6 (26)	9,5 (17)
	Positiva (n= 109)	60,5 (66)	66,1 (72)	58,7 (64)	2,7 (3)
	Valor de P (χ^2)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0281
F5	Negativa. (n= 271)	25,5 (69)	45,8 (124)	28,4 (77)	6,3 (17)
	Positiva (n= 16)	81,2 (13)	100,0 (16)	81,2 (13)	18,7 (3)
	Valor de P (χ^2)	<0,0001F	<0,0001	<0,0001	0,0903F
F18	Negativa (n= 233)	33,0 (77)	37,3 (87)	36,0 (84)	2,6 (6)
	Positiva (n= 54)	9,3 (5)	98,1 (53)	11,1 (6)	25,9 (14)
	Valor de P (χ^2)	0,0005	<0,0001	0,0004	<0,0001

Tabela 7. Associação entre os fatores de virulência e o tipo de hemólise de amostras de *E. coli* isoladas a partir de suabes retais obtidos de leitões desmamados com sinal clínico de diarreia.

Fatores de virulência	α hemólise (n= 151) % (n)	β hemólise (n= 136) % (n)	Valor de P (χ^2)
F4	26,5 (40)	50,7 (69)	<0,0001
F5	7,3 (11)	3,7 (5)	0,1834
F18	4,0 (6)	35,3 (48)	<0,0001
LT	31,1 (47)	25,7 (35)	0,3128
STa	29,8 (45)	69,9 (95)	<0,0001
STb	36,4 (55)	25,7 (35)	0,0513
STx2e	1,3 (2)	13,2 (18)	<0,0001

Tabela 8. Associação entre os fatores de virulência de amostras de *E. coli* isoladas a partir de suabes retais e a consistência das fezes leitões desmamados com sinal clínico de diarreia.

Fatores de virulência	Consistência das fezes			Valor de P (χ^2)
	Líquida (n= 139) % (n)	Cremosa (n= 117) % (n)	Pastosa (n= 31) % (n)	
F4	50,4a (70)	29,1b (34)	16,1b (5)	<0,001
F5	7,9 (11)	2,6 (3)	6,4 (2)	0,1734
F18	23,0 (32)	14,5 (17)	16,1 (5)	0,2057
LT	32,4 (45)	27,3 (32)	16,1 (5)	0,1807
STa	58,3a (81)	39,3b (46)	41,9ab (13)	<0,003
STb	30,9 (43)	33,3 (39)	25,8 (8)	0,7162
STx2e	5,8 (8)	10,3 (12)	0,0 (0)	0,1008

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a coleta das amostras, foi observada a dificuldade do diagnóstico clínico de leitões com diarreia, pelo fato de que as instalações tinham pisos com boa drenagem. Nestas, as fezes passavam pelas frestas e, aparentemente, os animais não apresentavam sinal clínico. O diagnóstico era fácil apenas nos casos mais graves, em que os animais estavam sujos, apáticos e/ou desidratados. Nas granjas visitadas e que apresentavam surtos de diarreia, claramente o problema estava sendo subestimado pelas dificuldades mencionadas anteriormente.

A ETEC foi um agente etiológico importante em leitões desmamados com sinal clínico de diarreia. As amostras positivas apresentaram amplas combinações entre os principais fatores de virulência envolvidos na patogenia da colibacilose na creche (F4, F18, LT, STa e STb). Porém, houve uma alta porcentagem (32,4%) de amostras com resultados negativos para os fatores de virulência analisados. Existem várias hipóteses para explicar esta discrepância, foram revisados no nosso trabalho.

Através da análise estatística dos dados coletados, foram obtidas correlações significativas entre algumas variáveis utilizadas: fímbria F4 com toxinas LT, STa e STb; F5 e todas as toxinas detectadas; F18 com STa e STx2e; toxinas LT, STa e STb, β -hemólise e F4, F18, STa e STx2e.

Também foi observada correlação significativa entre a consistência fecal líquida e os fatores de virulência das ETEC envolvidos em casos de diarreia.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BARRY, A. Diarreias em suínos. In: ALFIERI, A.F.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.A.; et al. (Eds.). **Tópicos em Sanidade e Manejo de Suínos**. Campinas: Sanphar; Sorocaba: Curuca Consciência Ecológica, p. 165-184, 2010.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; STEPAN, A.L. Estudo etiológico de diarreia em leitões recentemente desmamados. **Anais...** In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Águas de Lindóia/SP, p.60, 1991.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; SATO, J.P.H.; ANDRADE, M.R. Diarreias nutricionais dos suínos: uma visão do veterinário clínico. **Anais...** In: Simpósio Internacional de Suinocultura, Porto Alegre/RS, p.23-34, 2011.
- BOERLIN, P.; TRAVIS, R.; GYLES, C.L.; REID-SMITH, R.; LIM, N.J.H.; NICHOLSON, V.; McEWEN, S.A.; FRIENDSHIP, R.; ARCHAMBAULT, M. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.6753-6761, 2005.
- BRITO, B.G.; LEITE, D.S.; LINHARES, R.E.; VIDDOTTO, M.C. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.65, p.123-132, 1999.
- BRITO, B.G.; TAGLIARI, K.C.; PIFFER, I.A. Caracterização da virulência da cepa de *Escherichia coli* - BK99. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.455-459, 2001.
- BRITO, B.G.; VIDOTTO, M.C.; BERBEL, M.M.; TAGLIARI, K.C. Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.645-652, 2004.
- BURGESS, M.N.; BYWATER, R.J.; COWLEY, C.M.; MULLAN, N.A.; NEWSOME, P.M. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. **Infection and Immunity**, v.21, n.2, p.526-531, 1978.
- CHAO, K.L.; DREYFUS L.A. Interaction of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.65, n.8, p.3209-3217, 1997.
- CHAPPUIS, J.P.; DUVAL-IFLAH, Y.; OLLIVIER, L.; LEGAULT, C. *Escherichia coli* K88 adhesion: A comparison of Chinese and Large White piglets. **Genetics Selection Evolution**, v.16, n.3, p.385-390, 1984.
- COWART, R.P. Colibacillosis. In: COWART, R.P. **An Outline of Swine Diseases: A Handbook**. Iowa: Iowa State University Press, p.54-56, 1995.

DALLAS, W.S.; FALKOW, S. Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. **Nature**, v.288, p.499-501, 1980.

DEAN, E.A. Comparison of receptors for 987P pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the small intestine of neonatal and older pigs. **Infection and Immunity**, v.58, p.4030-4035, 1990.

DO, T.N.; CU, P.H.; NGUYEN, H.X.; AU, T.X.; VU, Q.N.; DRIESEN, S.J.; TOWNSEND, K.M.; CHIN, J.; TROTT, D.J. Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre-weaning pigs in north Vietnam. **Journal Medical Microbiology**, v.55, p.93-99, 2006.

DREYFUS, L.A.; HARVILLE, B.; HOWARD, D.E.; SHABAN, R.; BEATTY, D.M.; MORISS, S.J. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STb). **National Academy of Sciences**, v.90, p.3202-3206, 1993.

DUBREUIL, J.D. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. **FEMS Microbiology Letters**, v.278, n.2, p.137-145, 2008.

EWING, W.N.; COLE, D.J.A. **The Living Gut: An Introduction to Microorganisms in Nutrition**. N. Ireland: Context, 220p., 1994.

FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. Post-weaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. In: STRAW, B.E. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9.ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing, p.649-662, 2006.

FRANCIS, D.H. Colibacillosis in pigs and its diagnosis. **Journal Swine Health Production**, v.7, n.5, p.241-244, 1999.

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

FRANCIS, D.H. Post-weaning *E. coli* - diagnosis, treatment, control, and its effect on subsequent growth performance. **Proceedings...** In: American Association of Swine Veterinarians, Iowa/US, p.495-499, 2004.

GUERREIRO, M.G. *Escherichia*. In: GUERREIRO, M.G.; OLIVEIRA, S.J.; SARAIVA, D. et al. (Eds.). **Bacteriologia Especial**. Porto Alegre: Ed. Sulina, p.178-183, 1984.

GUTH, B.E.C. *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC). In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. 5.ed, São Paulo: Atheneu, p.301-305, 2008.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Eds.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3.ed., Ames, Iowa: Iowa State University Press, p.193-214, 2004.

HAMPSON, D.J. Post-weaning *E. coli* diarrhea in pigs. In: GYLES, C.L. (Ed.), ***E. coli in Domestic Animals and Humans***. London: CABI, p.171-192, 1994.

HOBLET, K.H.; KOHLER, E.M.; SAIF, L.J.; THEIL, K.W.; INGALLS, W.I. Study of porcine post-weaning diarrhea involving K88(-) hemolytic *Escherichia coli*. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.1910-1912, 1986.

IMBERECHTS, H.; BERTSCHINGER, H.U.; NAGY, B.; DEPREZ, P.; POHL, P. Fimbrial colonization factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea and edema disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.412, p.175-183, 1997.

JENSEN-WAERN, M.; PETERSON, L.; LINDBERG, R. Zinc supplementation to weaned pigs: effects on uptake, storage and morphology. **Proceedings...** In: International Pig Veterinary Society Congress, Bologna/ Italy, p.690, 1996.

KELLY, D.; KING, T.P. Bacterial interactions in the gut. In: PIVA, I.; BACH KNUDSEN, K.E.; LINDBERG, J.E. (Eds.). **Gut Environment of Pigs**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, p.117-120, 2001.

LEE, C.H.; HU, S.T.; SWIATEK, P.J.; MOSELEY, S.L.; ALLEN, S.D.; SO, M. Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. **Journal of Bacteriology**, v.162, p.615-620, 1985.

LI, Y.; QIU, X.; LI, H.; ZHANG, Q. Adhesive patterns of *Escherichia coli* F4 in piglets of three breeds. **Journal of Genetics and Genomics**, v.34, n.7, p.591-599, 2007.

LOW, D.; BRAATEN, B.; VAN DER WOUDE, M. Fimbriae. In: NEIDHART, F.C.; CURTISS, R.; INGRAHAM, J.L.; et al. (Eds.). ***Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology***. Washington, DC: ASM Press, p.146-157, 1996.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.L.P.; REIS, A.; RISTOW, L.E.; LAGE, A.P.; GUEDES, R.M.C. PCR multiplex para detecção de genes de fatores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Anais...** In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Fortaleza/CE, p.13-14, 2005.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P.; RISTOW, L.E.; REIS, A.; GUEDES, R.M.C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1117-1123, 2007.

MAINIL, J.G.; JACQUEMIN, E.; POHL, P.; KAECKENBEECK, A.; BENZ, I. DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesion are localized on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.303-311, 2002.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1687-1693, 2008.

MORES, N.; BRITO, W.D. Rotavirose. In: Doenças dos Suínos. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone editorial, p.319-323, 2007.

MORÉS, N.; MORENO, A.M. Colibacilose da terceira semana & Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone editorial, p.71-77, 2007.

MORÉS, N.; BARCELLOS, D.E.S.N. Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial, p.116-122, 2012.

MORÉS, N.; MORENO, A.M. Colibacilose da terceira semana. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial, p.115-116, 2012.

NADEAU, E.; TREMBLAY, D.; FAIRBROTHER, J.M. Vaccination with Coliprotec® vaccine for the prevention of post-weaning diarrhea associated with F4(K88)- positive enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Proceedings...** In: International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver/ Canadá, p.769, 2010.

NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v.30, p.259-284, 1999.

NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v.295, p.443-454, 2005.

NAIR, G.B.; TAKEDA, Y. The heat-stable enterotoxins. **Microbial Pathogenesis**, v.24, p.123-131, 1998.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NEUMANN, E. J.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J. Swine Disease Manual. **Proceedings...** In: The American Association of Swine Veterinarians, Dallas/ US, p.73, 2009.

O'BRIEN, A.D., HOLMES, R.K. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: NEIDHART, F.C.; CURTISS, R.; INGRAHAM, J.L.; et al. (Eds.). **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**. Washington, DC: ASM Press, p.2788-2802, 1996.

OKAMOTO, K.; FUJII, Y.; AKASHI, N.; HITOTSUBASHI, S.; KURAZONO, H.; KARASAWA, T.; TAKEDA, Y. Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. **Microbiology Immunology**, v.37, n.5, p.411-414, 1993.

OLASZ, F.; FEKETE, P.Z.; BLUM-OEHLER, G.; BOLDOGKOI, Z.; NAGY, B. Characterization of an F18+ enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from post-weaning diarrhoea of swine, and of its conjugative virulence plasmid pTC. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, n.2, p.281-289, 2005.

PETERSON, J.W.; WHIPP, S.C. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.63, p.1452-1461, 1995.

POST, K.W.; BOSWORTH, B.T.; KNOTH, J.L. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea and edema disease in North Carolina. **Swine Health and Production**, v.8, n.3, p.119-120, 2000.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 512p, 2005.

QUADRI, F.; SVENNERHOLM, A.M.; FARUQUE, S.S.G.; SACK, R.B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.3, p.465-483, 2005.

RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; DOUCE, G.; DOUGAN, G. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. **Immunology Today**, v.20, n.11, p.493-500, 1999.

RICHARDS, W.P.C.; FRASER, C.M. Coliform enteritis of weaned pigs: A description of the disease and its association with haemolytic *Escherichia coli*. **Cornell Veterinarian**, v.51, p.245-257, 1961.

RITA, D.M.; WBIPP, S.C.; MAX, F.R. Resistance of Chinese Meishan, Fengjing, and Minzhu pigs to the K88ac+ strain of *Escherichia coli*. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, n.3, p.333-338, 1994.

SAVARINO, S.J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B.M.; LEVINE, M.M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings...** In: National Academy of Science, USA, v.90, p.3093-3097, 1993.

SPANGLER, B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiological Reviews**, v.56, p.622-647, 1992.

TURNER, S.M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L.M.; HENDERSON, I.R. Weapons of mass destruction: virulence factor of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.263, p.10-20, 2006.

VAANDRAGER, A.B. Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.230, p.73-83, 2002.

VAN DEN BOSCH, J.F.; EMÖDY, L.; KÉTYI, I. Virulence of haemolytic strains of *Escherichia coli* in various animal models. **FEMS Microbiology Letters**, v.13, p.427-430, 1982.

VANNUCCI, F.A.; GUEDES, R.M.C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2233-2242, 2009.

VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p.147-150, 2009.

VIDOTTO, M.C.; LIMA, N.C.S.; FRITZEN, J.T.T.; FREITAS, J.C.; VENÂNCIO, E.J.; ONO, M.A. Frequency of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea in the North Parana State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.199-204, 2009.

WILSON, R.A.; FRANCIS, D.H. Fimbriae and enterotoxins associated with *E. coli* serogroups isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.213-217, 1986.

WIMER-MACKIN, S.; HOLMES, R.K.; WOLF, A.A.; LENCER, W.I.; JOBLING, M.G. Characterization of receptor-mediated signal transduction by *Escherichia coli* type IIa heat-labile enterotoxin in the polarized human intestinal cell line T84. **Infection and Immunity**, v.69, n.12, p.7205-7212, 2001.