



DETECÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITÕES DIARREICOS

JOÃO X. DE OLIVEIRA FILHO^{1*}, SUZANA S. KUCHIISHI¹, LETICIA S. LOPES²

¹ Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal - Cedisa – Concórdia/SC, Brasil – joao@cedisa.org.br;

² Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC, Brasil.

Resumo – Avaliou-se a frequência dos genes de fímbrias (K88, K99, 987P, F18 e F41) e toxinas (Stb, STaP, LT e Stx2e) de isolados de *E. coli* de casos clínicos de diarreia em leitões de várias faixas etárias utilizando a técnica de PCR *multiplex*. Foram testadas 214 amostras de *E. coli* isoladas de leitões provenientes da região sul do Brasil, sendo 92 (43%) positivas para pelo menos um fator de virulência. Dessas, 27 (29,3%) amostras apresentaram somente genes de toxinas, 2 (2,2%) somente genes de fímbrias e 63 (68,5%) foram positivas para genes de fímbria e toxina. A atividade hemolítica foi testada em 137 isolados, sendo 48 (35,04%) hemolíticos e associada com a presença dos fatores STb, STaP, Stx2e, LT, F18 e K88 ($p \leq 0,05$). Ainda, foi avaliado o padrão de resistência das cepas patogênicas pela técnica de difusão em disco frente ao ceftiofur, ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina, norfloxacina, colistina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, florfenicol, fosfomicina, lincomicina + espectinomicina e tetraciclina. O resultado do teste de sensibilidade demonstrou que 75,5% dos isolados de *E. coli* patogênicos apresentaram multirresistência.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; suínos; PCR *multiplex*; resistência antimicrobiana.

DETECTION OF VIRULENCE FACTORS AND ANTIMICROBIAL RESISTENCE EVALUATION OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM PIGLETS WITH DIARRHOEA

Abstract – The frequency of virulence genes for fimbrial adhesions (K88, K99, 987P, F18 and F41) and toxins (Stb, STaP, LT and Stx2e) of *E. coli* strains isolated from diarrheic piglets from different ages by multiplex PCR assay was studied. Ninety two out of 214 studied samples (43%) were positive for at least one tested virulence factor. Out of these, 27 samples (29.3%) had genes for toxins only, 2 (2.2%) samples just fimbria genes and 63 (68.5%) contained fimbria and toxins genes. Out of 137 samples, 48 (35.04%) had haemolytic activity and was associated with Stb, STaP, Stx2e, LT, F18 and K88 virulence factors. Disk diffusion in vitro antimicrobial sensitivity test demonstrated that 75.5% of pathogenic *E. coli* strains were multiresistance.

Keywords: *Escherichia coli*; swine; multiplex PCR; antimicrobial resistance.

Introdução – A colibacilose é uma importante enfermidade entérica com impacto significativo na suinocultura. *Escherichia coli* enteropatogênica destaca-se por sua prevalência em leitões de diferentes faixas etárias, principalmente neonatos, cursando com diarreias e morte (WILLINGER, 1981). Wilson & Francis (1986) e Casey et al. (1992) descreveram cinco principais tipos de fímbrias: K88, K99, 987P, F18 e F41 em isolados de *E. coli* toxigênicas de origem suína. Essas possibilitam a aderência das bactérias a receptores específicos da superfície dos enterócitos, permitindo que estas secretem toxinas envolvidas no processo de diarreia. O uso indiscriminado de antimicrobianos para controle da colibacilose pode resultar na seleção de bactérias resistentes, o que acarreta na baixa eficiência dos antimicrobianos e na maior necessidade de prevenir a presença de resíduos em produtos de origem animal para o consumo humano (BARCELLOS et al., 2012). O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade hemolítica, presença de fatores de virulência (fímbrias e toxinas) e o padrão de resistência aos antimicrobianos em isolados de *E. coli* obtidas de leitões com diarreia.



Material e Métodos - Neste estudo foram utilizados 214 isolados de *E. coli* referentes a diagnósticos clínicos de diarreias em leitões nas fases de maternidade, creche e recria/terminação. Os isolados foram identificados como *E. coli* pelas características fenotípicas descritas por Quinn et al. (2011). A atividade hemolítica da bactéria foi observada ao cultivo em ágar sangue (5%). A pesquisa de genes que expressam fímbrias (F18, K88, F41 e 987P) e toxinas (STb, StaP, K99, LT e Stx2e) foi realizada pela técnica de PCR multiplex descrita por Casey & Bosworth, (2009), utilizando o Multiplex PCR kit (Qiagen®) para amplificação. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados em agar Mueller-Hinton pela técnica de difusão em disco e os critérios de interpretação foram obtidos conforme CLSI M31A2. Os antimicrobianos testados foram: ceftiofur, ciprofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina, colistina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, florfenicol, fosfomicina, lincomicina + espectinomicina e tetraciclina. Para avaliar a associação entre a atividade hemolítica bacteriana e fator de virulência, foi aplicado o teste exato de Fisher. O mesmo teste foi utilizado para avaliar a associação entre a ocorrência do fator de virulência e à multirresistência a antimicrobianos. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados e Discussão – Do total de 214 isolados, 92 (43%) apresentaram pelo menos um dos genes relacionado a fatores de virulência. Destas, 27 (29,3%) isolados apresentaram somente genes de toxinas, duas (2,2%) somente genes de fímbrias e 63 (68,5%) apresentaram genes de fímbria e toxina. No estado de Minas Gerais, Macêdo et al. (2007) encontraram índices de 16,6%, 28,6% e 54,8%, respectivamente. A frequência dos fatores de virulência por faixa etária dos leitões estão demonstrados na **Tabela 1**, na qual observa-se maior frequência do gene Stb (88%) e StaP (76%), corroborando com o estudo de Costa et al. (2006) que encontraram 74% do gene Stb. A atividade hemolítica foi testada em 137 isolados, sendo 48 (35,04%) hemolíticos e 89 (64,96%) não hemolíticos. Destas, 34 (70,83%) e 17 (19,10%) isolados apresentaram pelo menos um fator de virulência com diferença estatística ($p < 0,0001$), respectivamente. Quando discriminado cada fator de virulência, a atividade hemolítica foi associada com a presença de STb, StaP, Stx2e, LT, F18 e K88 ($p \leq 0,05$). Sato (2013) encontrou 47,4% de isolados beta hemolíticos e foram associados com F4, F18, StaP e Stx2e. Foi avaliada a sensibilidade antimicrobiana em 49 isolados, positivos para fatores de virulência, sendo 36 (80%) hemolíticos. Este teste demonstrou que o ceftiofur (87,8%), colistina (86,7%) e fosfomicina (88,4%) foram as drogas de melhor eficácia sobre cepas virulentas de *E. coli* (**Figura 1**). Observa-se também um alto índice de resistência (83,3%) ao florfenicol, diferente do encontrado por Costa et al. (2006) e Macêdo et al. (2007) que relataram sensibilidade de 81,1% e 89,47% em casos clínicos de diarreia, respectivamente. Dentre os isolados analisados neste estudo, 75,5% apresentaram resistência a pelo menos 3 classes de antibióticos, indicando multirresistência (SCHWARZ et al., 2010). Não foi observada associação ($p > 0,05$) entre a presença dos fatores de virulência com a ocorrência de isolados multirresistentes. Essa alta ocorrência de isolados de *E. coli* multirresistentes circulando nos rebanhos de suínos, independentemente da presença ou não de fatores de virulência, pode acarretar na transferência de genes entre isolados patogênicos e não patogênicos por transmissão horizontal (Roberts, 2005).

Conclusões – Com esses resultados, fica evidente a presença elevada de isolados de *E. coli* patogênicos, caracterizados pela presença de atividade hemolítica e de fatores de virulência de fímbrias e toxinas, em rebanhos de suínos com problemas de diarreias em leitões, principalmente na fase de maternidade. Ainda, foi demonstrada uma alta porcentagem de isolados resistentes e multirresistentes aos principais antimicrobianos utilizados, principalmente à tetraciclina, estreptomicina e florfenicol. Isto demonstra a necessidade de melhorar o controle desse agente com a adoção de melhores práticas de produção dando ênfase no uso racional de antimicrobianos.

Referências Bibliográficas

- BARCELLOS, D.E.S.N.; SOBESTIANSKY, J.; LINHARES, D., 2012. Uso de antimicrobianos. In: BARCELLOS, D.E.S.N. & SOBESTIANSKY, J. (2Ed.). **Doenças dos suínos**. Goiania: Canone Editorial, p.837- 884.
- CASEY, T. A.; BOSWORTH, B. T.; 2009. Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *E. coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, (21): 25-30.



CASEY, T.A.; NAGY, B.; MOON, H.W., 1992. Pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* that do not express K88, K99, F41 or 987P adhesions. **American Journal of Veterinary Research**, (53): 1488-1492.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). Performance Standards for Antimicrobial disk and dilution susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – 3rd Ed. M31-A3, vol.28, n.8, 2008.

COSTA, M.M.; SILVA, M.A.; SPRICIGO, D.A.; et al., 2006. Caracterização epidemiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, (26): 5-8.

MACÊDO, N. R.; MENEZES, C. P. L; LAGE, A. P.; et al., 2007. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *E. coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. (59): 1117–1123, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; et al., 2011. Enterobacteriaceae. In: **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2ª ed, Ames, Iowa, Wiley-Blackwell cap. 24, p. 263-286.

ROBERTS, M. C.; 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, 245(2):195–203.

SATO, J.P.H., 2013 **Frequência e associação de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões desmamados**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 55p.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; et al., 2010. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, (65): 601-604.

WILLINGER, H., 1981. *Escherichia coli*. In: BLOBEL, H. & SCHIESSER, T. (3Ed). **Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren**. Stuttgart, G.: Fischer Verlag, p.257-343.

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

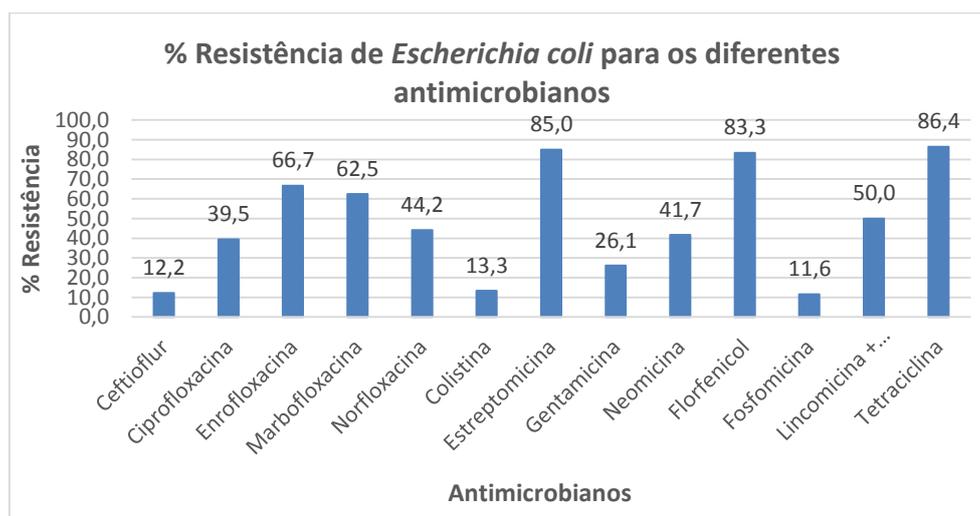


Figura 1 - Porcentagem de isolados resistentes a antimicrobianos.



Tabela 1 - Distribuição e frequência de fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de leitões com diarreias por faixa etária.

Fatores de Virulência	Maternidade	Creche	Recria/ Terminação	Sem informação
K88	13 (50%)	3 (25%)	0	15 (33,3%)
K99	1 (3,8%)	0	1 (11,1%)	1 (2,2%)
987P	0	0	0	0
F18	1 (3,8%)	3 (25%)	7 (77,8%)	20 (44,4%)
F41	0	0	2 (22,2%)	2 (4,4%)
Stb	24 (92,3%)	10 (83,3%)	6 (66,7%)	41 (91,1%)
STaP	14 (53,8)	11 (91,7%)	7 (77,8%)	38 (84,4%)
LT	12 (46,2%)	8 (66,7%)	0	19 (42,2%)
Stx2e	2 (7,7%)	3 (25%)	3 (33,3%)	12 (26,7%)
Total	26 (100%)	12 (100%)	9 (100%)	45 (100%)