

Associação entre fatores de virulência e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* enterotoxigênicas isoladas de leitões com diarreia no Brasil

Association between Virulence Factors and Antimicrobial Resistance from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Pigs with Diarrhea in Brazil

José Paulo Hiroji Sato¹, Karine Ludwig Takeuti¹, Amanda Gabrielle de Souza Daniel², Priscilla Karina Vitor Koerich³, Mari Lourdes Bernardi⁴ & David Emilio Santos Neves de Barcellos¹

ABSTRACT

Background: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the etiologic agent of post weaning colibacillosis, one of the most important diseases in pig farming. The pathogenesis of the disease is associated with two virulence factors (VF), fimbriae and enterotoxins. In veterinary medicine, the use of antibiotics can lead to the selection of resistant bacteria. The association of VF and antibiotic resistance is an important mechanism for bacterial survival under adverse conditions. This study aimed to determine the VF and antimicrobial susceptibility of ETEC isolates from piglets with diarrhea and analyze the association between these factors.

Materials, Methods & Results: A total of 185 rectal swabs were collected from weaned piglets in Brazilian farms of the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais and Goiás. The isolation of ETEC was carried out on blood and MacConkey Agar and characterization by biochemical tests and detection by PCR of fimbrial genes F4, F45, F6, F18 and F41, and toxins genes LT, STa, STb and STx2e. Antimicrobial susceptibility profiles were determined by Agar diffusion test for amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, ciprofloxacin, colistin, doxycycline, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, neomycin, norfloxacin, oxytetracycline, streptomycin, tetracycline, lincomycin + spectinomycin and sulfamethoxazole + trimethoprim. The association between VF and antimicrobials resistance results was determined by Chi-square and Fisher test ($P \leq 0.05$). A total of 376 isolates were analyzed. The frequencies of fimbriae and toxins amplified were: F4 (31.6%), F18 (18.9%), F5 (4.2%) and toxins STa (43.1%), STb (24.7%), LT (21.8%) and STx2e (5.3%). Antibiotic resistance was higher to tetracycline (96.3%), florfenicol (95.2%), oxytetracycline (93.62%) and doxycycline (90.7%). Lowest levels of resistance were to ceftiofur (2.1%), colistin (9.8%), lincomycin + spectinomycin (15.4%) and neomycin (23.1%). The association of VF and resistance was significant for fimbriae F4 and streptomycin and sulfamethoxazole + trimethoprim; F5 and enrofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin; F18 and amoxicillin, ampicillin, doxycycline, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole + trimethoprim. Among the toxins LT and tetracycline, streptomycin and florfenicol; STa and amoxicillin, ampicillin, oxytetracycline, enrofloxacin and sulfamethoxazole + trimethoprim; STb and colistin and streptomycin.

Discussion: Resistance to all antimicrobials was observed, with higher levels for tetracyclines and lower to ceftiofur and lincomycin + spectinomycin. Several studies have reported ETEC virotype variation which can be influenced by management differences in pig farms. The presence of VF and acquisition of antimicrobial resistance mechanisms might be related to evolutionary factors, infection pressure and intensive use of antibiotics. *E. coli* is considered one of the most versatile bacterial species and its diversity in adaptability is due to its genomic plasticity, influencing the capacity to colonize numerous host species. This is possible by mechanisms such as gain or loss of genes through lateral transfer of plasmids, transposons and integrons, which vary regarding the environment to which they are exposed. More studies are needed to correlate genetically the interaction of antimicrobial resistance and virulence genes to elucidate if the virulence expression is affected by chromosomal mutations that lead to specific resistance or/ and both determinants are inserted into the same mobile genetic element, such as a conjugative plasmid.

Keywords: swine, enterotoxigenic *Escherichia coli*, diarrhea.

Descritores: suíno, *Escherichia coli* enterotoxigênica, diarreia.

Received: 15 May 2015

Accepted: 12 November 2015

Published: 16 December 2015

¹Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. ³Brasil Foods (BRF), Curitiba, PR, Brazil. ⁴Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. CORRESPONDENCE: J.P.H. Sato [zpsato@hotmail.com - Tel.: +55 (51) 3308-6132]. Avenida Bento Gonçalves n. 9090. Bairro Agronomia. CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é o agente etiológico da colibacilose pós desmame em suínos, doença descrita em todo o mundo e considerada como uma das mais importantes enfermidades na suinocultura [12]. A patogênese da doença é relacionada basicamente com dois fatores de virulência: adesão, mediada por fímbrias, sendo as principais para suínos, F4, F5, F6, F7 e F18 [9] e produção das enterotoxinas termolábil (LT) e/ou termoestáveis (STa e STb) [11]. Esses fatores de virulência são necessários para auxiliar na colonização de sítios no hospedeiro e para a evasão do sistema imune [4].

Na medicina veterinária, o uso intensivo de antimicrobianos pode resultar na seleção de bactérias resistentes, tornando a ação dos princípios ativos menos eficazes [26] e permitindo que bactérias patogênicas se adaptem ao ambiente competitivo [4]. A associação de fatores de virulência e resistência a antibióticos são importantes mecanismos necessários para sobrevivência das bactérias sob condições adversas [4]. Diversos estudos analisaram a distribuição de fatores de virulência e perfil de susceptibilidade em ETEC isoladas de suínos [1,2,8]. No entanto, apesar de sua importância, são escassos os trabalhos avaliando a associação de fatores de virulência com o perfil de susceptibilidade antimicrobiana encontrado. Os objetivos deste estudo foram determinar fatores de virulência e susceptibilidade antimicrobiana de ETEC isoladas de leitões de creche com diarreia e analisar a associação entre estes fatores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas das amostras

Foram coletadas amostras de 15 granjas de suínos localizadas no Rio Grande do Sul (4), Santa Catarina (4), Paraná (4), Minas Gerais (2) e Goiás (1). As granjas pertenciam a uma mesma agroindústria com manejo, instalações, formulação da ração e protocolo de medicação similares. Os materiais consistiram de 185 suabes retais de leitões de fase de creche (21-40 dias de idade) com sinais clínicos de diarreia. Com exceção do antibiótico adicionado à ração de forma preventiva (Colistina 120 ppm), nenhum outro medicamento estava sendo utilizado. Imediatamente após coletados, os suabes foram armazenados em meio de transporte *Stuart* e transferidos sob refrigeração para processamento laboratorial.

Isolamento e caracterização do agente

Para obtenção de colônias isoladas, cada suabe foi semeado por esgotamento em meio Agar Sangue¹ (enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado) e Agar MacConkey¹, incubados por 24 h 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. Três colônias de cada placa, com características sugestivas de *E. coli* foram repicadas para posterior realização de provas bioquímicas [17].

Para extração de DNA, quatro colônias do Agar Sangue foram adicionadas a 1000 µL da solução New-Gene Prep (Tiocinato de guanidina 5 M, Tris HCl 0.1 M, EDTA 0,5 M e Triton X-100) e incubadas a 60°C, por 10 min. Após, foi centrifugada (10.000 g por 1 m), o sobrenadante foi transferido para um microtubo com 20 µL de uma suspensão sílica e incubado por 10 min em temperatura ambiente. Cada amostra foi novamente centrifugada (10.000 g por 1 min), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com 150 µL da solução de lavagem “A” (Tiocinato de guanidina 5 M, 0.1 M Tris-HCl [pH 6,4]), duas vezes com 150 µL da solução de lavagem “B” (etanol 96%) e uma vez com 150 µL da solução de lavagem “C” (etanol absoluto). A seguir, foi realizada centrifugação para eliminação do sobrenadante. Os microtubos foram incubados em termobloco (60°C por 2 min), e o DNA foi eluído com a adição de 50 µL de solução de eluição (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) seguido de centrifugação (10.000 g por 3 min). O sobrenadante contendo DNA foi coletado e armazenado a -20oC.

A qPCR *Multiplex* foi realizada com o *kit* New-Gene Amp para detecção de nove fatores de virulência (toxinas LT, STa, STb e STx2e; fímbrias F4, F5, F6, F18 e F41) e amplificadas em três reações distintas (*Multiplex1*, *Multiplex2* e *Multiplex3*), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 2 µL do DNA purificado foi adicionado a 28 µL do mix de amplificação (Master *mix* e Taq Polimerase), e submetidos à ciclos de 3 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação por 15 s a 95°C, anelamento por 1 min a 60°C. As reações foram amplificadas no termociclador StepOnePlus (Applied BiosystemsTM)² e os resultados analisados pelo Software StepOnePlusTM v2.2².

Susceptibilidade antimicrobiana

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana foram determinados pelo teste de difusão em disco. A partir

de um meio caldo Müller Hinton¹, os isolados foram padronizados na turbidez de 0,5 da escala McFarland, realizadas com auxílio de um densímetro automático (Densimat)³. A suspensão ajustada foi inoculada em placas de Agar Müller Hinton¹ e com um dispensador semiautomático⁴ foram distribuídos discos de antimicrobianos a uma distância de 24 mm entre cada. A mensuração do diâmetro dos halos ao redor dos discos foi realizada através de um medidor automático⁴ e classificados em sensível, intermediário e resistente [7]. Os princípios ativos testados encontram-se na Tabela 1.

Análise Estatística

A análise da frequência dos fatores de virulência e dos perfis de resistência, foi efetuada com o uso do procedimento FREQ do SAS (SAS, 2005). A associação entre os fatores de virulência e os antimicrobianos foi realizada pelo Teste Qui-Quadrado e pelo Teste de Fisher, nesta análise, valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A partir dos 185 suabes coletados, 67,7% apresentaram crescimento significativo de *E. coli* dentro do

critério de inclusão (>90% de colônias fenotipicamente similares). De cada placa foram repicadas três colônias para a realização de testes fenotípicos e genotípicos, totalizando 376 isolados.

Na detecção de genes de virulência, as frequências encontradas foram de 31,6% para fímbria F4, 18,9% para F18, 4,2% para F5 e nenhuma amostra positiva para as fímbrias F6 e F41. Em relação aos genes de toxinas, 43,1% das amostras foram positivas para STa, 24,7% para STb, 21,8% para LT e 5,3% para STx2e. Dessa forma, os virotipos mais frequentes foram: F18+STa (11,14%), F4+LT+STa+STb (9,75%), F18+STa+STx2e (4,52%) e F4+F5+LT+STa+STb (4,18%).

Na análise de susceptibilidade antimicrobiana, os isolados apresentaram níveis de resistência superiores a 60% para amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, enrofloxacina, estreptomicina e sulfametoxazole + trimetoprima. Sendo que os maiores índices (>90%) foram observados para tetraciclina (96,3%), seguido do florfenicol (95,2%), oxitetraciclina (93,62%) e doxiciclina (90,7%). As drogas que obtiveram menores níveis de resistência foram, ceftiofur (2,1%), colistina (9,8%), lincomicina + spectinomicina (15,4%) e neomicina (23,1%) [Tabela 1].

Tabela 1. Perfil de resistência aos antimicrobianos de ETEC isoladas de leitões da fase de creche com diarreia, coletadas nos Estados do RS, SC, PR, MG e GO.

Antimicrobiano	Intermediária % (n)	Resistente % (n)	Sensível % (n)
Amoxicilina (25 µg)	3,5 (13)	67,8 (255)	28,7 (108)
Ampicilina (10 µg)	6,1 (23)	68,1 (256)	25,8 (97)
Ceftiofur (30 µg)	2,4 (9)	2,1 (8)	95,5 (359)
Ciprofloxacina (5 µg)	9,6 (36)	66,2 (249)	24,2 (91)
Colistina (10 µg)	33,5 (126)	9,8 (37)	56,6 (213)
Doxiciclina (30 µg)	4,5 (17)	90,7 (341)	4,8 (18)
Enrofloxacina (5 µg)	13,0 (49)	73,1 (275)	13,8 (52)
Estreptomicina (10 µg)	2,9 (11)	78,5 (295)	18,6 (70)
Florfenicol (30 µg)	2,4 (9)	95,2 (358)	2,4 (9)
Gentamicina (10 µg)	12,8 (48)	28,2 (106)	59,0 (222)
Neomicina (30 UI)	13,0 (49)	23,1 (87)	63,8 (240)
Norfloxacina (10 µg)	3,5 (13)	59,8 (225)	36,7 (138)
Oxitetraciclina (30 µg)	2,7 (10)	93,62 (352)	3,7 (14)
Tetraciclina (30µg)	0,5 (2)	96,3 (362)	3,2 (12)
Lincomicina+Spectinomicina (109 µg)	-	15,4 (58)	84,6 (318)
Sulfametoxazole+Trimetoprima (1,25/23,75 µg)	1,1 (4)	73,7 (277)	25,3 (95)

A associação da presença de fatores de virulência (fímbrias e toxinas) e ocorrência de resistência foi significativa para: fímbria F4 e os princípios ativos estreptomicina e sulfametoxazole + trimetoprima; F5 e enrofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina; F18 e amoxicilina, ampicilina, doxiciclina, enrofloxacina,

norfloxacina, ciprofloxacina e sulfametoxazole + trimetoprima. Entre as toxinas LT e tetraciclina, florfenicol e estreptomicina; STa e os princípios ativos amoxicilina, ampicilina, oxitetraciclina, enrofloxacina e sulfametoxazole + trimetoprima; STb e os princípios ativos colistina e estreptomicina (Tabela 2).

Tabela 2. Associações significativas entre a presença de fímbrias e toxinas com a resistência dos antimicrobianos.

Fator de virulência	Princípio ativo	Valor de P
F4	Estreptomicina	0,0041
	Sulfametoxazole+Trimetoprima	0,0001
F5	Enrofloxacina	0,0573
	Norfloxacina	0,0211
	Ciprofloxacina	0,0123
F18	Amoxicilina	0,0055
	Ampicilina	0,0010
	Doxiciclina	0,0366
	Enrofloxacina	0,0355
	Norfloxacina	0,0106
	Ciprofloxacina	0,0123
	Sulfametoxazole+Trimetoprima	0,0093
LT	Tetraciclina	0,0465
	Florfenicol	0,0170
	Estreptomicina	0,0004
STa	Amoxicilina	<0,0001
	Ampicilina	<0,0001
	Oxitetraciclina	0,0229
	Enrofloxacina	0,0068
	Sulfametoxazole+Trimetoprima	0,0028
STb	Colistina	0,0517
	Estreptomicina	0,0005

DISCUSSÃO

Na análise de fatores de virulência, os genes fimbriais mais frequentes foram F4 e F18, corroborando outros autores [12], que relataram a maior frequência da expressão das fímbrias F4 e F18 em leitões de creche. A alta frequência de amostras F4 positivas pode estar relacionada ao fato de que leitões de todas as idades são susceptíveis à infecção pela F4, já que seus receptores são expressos nos enterócitos de suínos do nascimento à idade adulta [12]. Já a menor frequência de F18 pode ser explicada pela reduzida expressão de seus receptores em suínos a partir da terceira semana de idade [19]. Em leitões neonatos, as cepas de ETEC geralmente expres-

sam as fímbrias F4, F5, F6 ou F41 [12]. Acredita-se que em leitões com idade mais avançada, os receptores para as fímbrias F5 e F6 sejam expressos com menor intensidade no epitélio intestinal, reduzindo a prevalência de *E. coli* com essas fímbrias em leitões de creche [13]. Outro fator ligado à frequência de determinados tipos fimbriais seriam sítios de ligação que podem bloqueados por competição por receptores análogos no conteúdo do lúmen intestinal ou açúcares presentes no glicocálice, como para F6 em animais mais velhos [10].

Genes envolvidos na biossíntese de algumas fímbrias (como F4, F18) estão localizados em plasmídeos de alto peso molecular, que geralmente também albergam os genes para enterotoxinas [14]. Ambas LT

e STb e, em alguns casos, também a STa, são expressas simultaneamente com a fímbria F4 [5], como observado em 9,75% das amostras. As frequências mais elevadas encontradas neste trabalho foram para os genes de LT e STa, corroborando outros trabalhos onde ETEC frequentemente isoladas de diarreia em leitões na creche são caracterizadas pela produção das enterotoxinas LT, STa e STb ou combinações das mesmas [20].

Os virotipos encontrados com maior frequência foram F18-STa, F4-LT-STa-STb, F18-STa-STx2e e F4-F5-LA-STa-STb. Entre os trabalhos que analisaram ETEC em suínos, há uma variação dos virotipos encontrados [5,22,27], o que pode estar relacionado a diversos fatores, como microbiota presente nas diferentes granjas, manejo, dinâmica e pressão de infecção, integridade gastrointestinal, inibição competitiva, imunidade do rebanho, nutrição, uso de antimicrobianos e estresse [18].

Tem sido observado na suinocultura intensiva um aumento da pressão de infecção e dos níveis de estresse para os animais, fazendo do uso de antimicrobianos uma prática muito usada nesta forma de produção [3]. Os maiores perfis de resistência foram observados nas tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina). A resistência à tetraciclina em *E. coli* de suínos no Brasil e em outros países tem sido encontrada de forma disseminada [1,3,6,8,15,18]. Ao longo das últimas décadas, essa classe de antimicrobianos foi largamente utilizada como medicamento terapêutico e em estratégias preventivas, na medicina humana e animal, o que pode estar relacionado ao seu amplo espectro de ação, baixo custo e relativa segurança.

Outros princípios ativos com altos perfis de resistência foram amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, enrofloxacina, estreptomina, florfenicol e sulfametoxazole + trimetoprima. Trabalhos avaliando a eficácia de antimicrobianos em cepas de *E. coli* apresentam variações nos resultados [1,2,18]. Além da variabilidade observada das cepas e do crescente aumento da resistência antimicrobiana entre as enterobactérias [8], as diferenças observadas podem ser atribuídas às variações regionais ou ao método utilizado para execução do estudo. Sabe-se que a ocorrência de resistência está intimamente relacionada à pressão de seleção do agente às drogas utilizadas com maior frequência no tratamento das diarreias.

Em contraste, os maiores perfis de sensibilidade foram para ceftiofur (95,5%) e lincomicina + spectinomicina (84,6%). Estudos avaliando a sensibilidade deste princípio ativo, descrevem altos índices (84,2% a 100%) de sensibilidade [16,21,25], semelhante ao encontrado

no presente estudo. A alta sensibilidade ao ceftiofur pode estar associada ao custo elevado do antimicrobiano e, assim, à sua menor utilização a campo [2].

Tanto a aquisição de resistência ou virulência, representam mecanismos de sobrevivência dos microrganismos. E sabe-se que seus determinantes localizam-se tanto em plasmídeos, *transposons* e *integrons*, podendo ser co-mobilizados de acordo com o ambiente em que são expostos.

Poucos são os trabalhos avaliando a relação entre virulência bacteriana e resistência a antimicrobianos. Trabalhos de diversos patótipos de *E. coli* em humanos e animais, demonstraram como essa relação é complexa, uma vez que envolvem diversos fatores como, genes de resistência, fatores de virulência, além da espécie bacteriana e do hospedeiro [24].

Escherichia coli é considerada uma das espécies mais versáteis e a diversidade na capacidade de adaptação é devida à sua plasticidade genômica, com a perda ou ganho de genes através da transferência lateral [23]. Em *E. coli* isolada de suínos, é relatado que ETEC e EPEC (*E. coli* enteropatogênica) apresentam associação com a resistência à neomicina, gentamicina e sulfametoxazole + trimetoprima [21]. A variação dessa associação, pode ser devida à utilização de diferentes concentrações de antimicrobianos, principalmente quando administrados como promotores de crescimento [24].

Ainda são necessários estudos moleculares para um melhor esclarecimento sobre a relação genética entre determinantes de virulência e resistência a antimicrobianos, para compreender se a expressão de genes de virulência é afetada por mutações cromossômicas que levam à resistência específica ou se ambos determinantes são inseridos no mesmo elemento genético móvel, tal como um plasmídeo conjugativo.

CONCLUSÃO

Foram detectados os genes de virulência de ETEC para as fímbrias F4, F18 e F5 e para as toxinas STa, STb, LT e STx2e. Os resultados demonstraram resistência em maior ou menor grau a todos os antimicrobianos testados, sendo que as tetraciclinas apresentaram as maiores frequências e as maiores sensibilidades foram encontradas para o ceftiofur e lincomicina + spectinomicina. Houve associação significativa para determinados fatores de virulência e princípios ativos: estreptomina, sulfametoxazole + trimetoprima, enrofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, amoxicilina, ampicilina, doxiciclina, tetraciclina, florfenicol, oxitetraciclina e colistina.

MANUFACTURERS

¹Difco, Becton Dickinson. Le Pont de Claix, France.

²Thermo Scientific. Waltham. MA, USA.

³BioMérieux S.A. Marcy l'Étoile, France.

⁴Bio Rad Laboratories. Hercules, CA, USA.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Almeida F.S., Rigobelo E.C., Marin J.M., Maluta R.P. & Ávila F.A. 2007. Diarreia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto -SP, Brasil. *Ars Veterinária*. 23(3): 151-157.
- 2 Baccaro M.R., Moreno A.M., Corrêa A., Ferreira A.J.P. & Calderaro F.F. 2002. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arquivos do Instituto Biológico*. 69(2): 15-18.
- 3 Barcellos D.E.S.N., Sobestiansky J., Linhares D. & Sobestiansky T.B. 2012. Uso de antimicrobianos. In: Sobestiansky J. & Barcellos D.E.S.N. (Eds). *Doenças dos Suínos*. 2.ed. Goiânia: Canone Editorial, pp.837-884.
- 4 Beceiro A., Tomás M. & Bou G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical Microbiology Reviews*. 26: 185-230.
- 5 Boerlin P., Travis R., Gyles C.L., Reid-Smith R., Lim N.J.H., Nicholson V., Mcewen S.A., Friendship R. & Archambault M. 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Applied Environmental Microbiology*. 71(11): 6753-6761.
- 6 Bryan A., Shapir N. & Sadowsky M.J. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Applied Environmental Microbiology*. 70: 2503-2507.
- 7 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved Standard - 3rd edn. CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne: CLSI, 112p.
- 8 Costa M.M., Silva M.S., Spricigo D.A., Witt N.M., Marchioro S.B., Kolling L. & Vargas A.P.C. 2006. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do Sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 26(1): 5-8.
- 9 Cowart R.P. 1995. Colibacillosis. In: Cowart R.P. (Ed). *An Outline of Swine Diseases: A Handbook*. Iowa: Iowa State University Press, pp.54-56.
- 10 Dean E.A. 1990. Comparison of receptors for 987P pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the small intestine of neonatal and older pigs. *Infection and Immunity*. 58: 4030-4035.
- 11 Dubreuil J.D. 2008. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiology Letters*. 278(2): 137-145.
- 12 Fairbrother J.M. & Gyles C.L. 2012. Post-weaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. In: Zimmermann J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds). *Diseases of Swine*. 10th edn. Ames: Blackwell Publishing, pp.723-749.
- 13 Francis D.H. 2002. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *Journal Swine Health Production*. 10(4): 171-175.
- 14 Guth B.E.C. 2008. *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC). In: Trabulsi L.R. & Alterthum F. (Eds). *Microbiologia*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, pp.301-305.
- 15 Kozak G.K., Boerlin P., Janecko N., Reid-Smith R.J. & Jardine C. 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied Environmental Microbiology*. 75: 559-566.
- 16 Macêdo N.R., Menezes C.P.L., Lage A.P., Ristow L.E., Reis A. & Guedes R.M.C. 2007. 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 Zootenia*. 59(5): 1117-1123.
- 17 Markey B.K., Leonard F.C., Archambault M., Culliname A. & Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2nd edn. Edinburgh: Mosby/Elsevier, 656p.

- 18 **Menin A., Reck C., Souza D., Klein C. & Vaz E. 2008.** 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*. 38(6): 1687-1693.
- 19 **Nagy B., Casey T.A., Whipp S.C. & Moon H.W. 1992.** Susceptibility of porcine intestine to pillus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infection and Immunity*. 60: 1285-1294.
- 20 **Nagy B. & Fekete P.Z. 1999.** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research*. 30: 259-284.
- 21 **Ngeleka M., Pritchard J., Appleyard G., Middleton D.M. & Fairbrother J.M. 2003.** Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 15: 242-252.
- 22 **Post K.W., Bosworth B.T. & Knoth J.L. 2000.** Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea and edema disease in North Carolina. *Swine Health and Production*. 893: 119-120.
- 23 **Rasko D., Rosovitz M.J., Myers G.S., Mongodin E.F., Fricke W.F., Gajer P., Cabtree J., Sebaihia M., Thomson N.R., Chaudhuri R., Henderson I.R., Sperandio V. & Ravel J. 2008.** The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*. 180(920): 6881-6893.
- 24 **Silva G.J. & Mendonça N. 2015.** Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*. 3: 18-28.
- 25 **Smith M.G., Jordan D., Chapman T.A., Chin J.J.C., Bardon M.D., Do T.N., Fahy V.A., Fairbrother J.M. & Trott D.J. 2010.** Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Veterinary Microbiology*. 145: 299-307.
- 26 **Vaz E.K. 2009.** Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37: 147-150.
- 27 **Zhang W., Zhao M., Ruesch L., Omot A. & Francis D. 2007.** Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Veterinary Microbiology*. 123: 145-152.

