

Caracterização de fatores de virulência presentes em isolados de *Escherichia coli* provenientes da região Sul do Brasil

FERNANDA KIELING MOREIRA¹

YARA SILVA CASANOVA²

FABRICIA ALVES CERVEIRA^{3,4}

PRISCILLA KARINA VITOR KOERICH⁵

ANDRÉ SALVADOR KAZANTZI FONSECA⁴

VAGNER RICARDO LUNGE^{4,6}

ANA PAULA WOBETO⁴

NILO IKUTA^{4,7}

RESUMO

Foram analisados neste trabalho 42 isolados de Escherichia coli originários de 15 granjas de suínos da região Sul do Brasil. Os isolados foram obtidos a partir de fezes de suínos com suspeita de colibacilose. As amostras foram caracterizadas quanto a presença de fatores de virulência (FVs) pela reação em cadeia da polimerase (PCR), que consistiu na detecção das fímbrias F4, F5, F6, F18 e F41 e das toxinas Stb, Stx2e e LT. Dos 42 isolados, somente 15 foram confirmados como portadores dos FVs estudados, sendo que as toxinas mais frequentemente encontradas foram Stb seguida da Stx2e. Nos isolados portadores de toxinas foram encontradas as fímbrias F18, F4

¹ Acadêmica de mestrado do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA.

² Acadêmica do Curso de Biomedicina/ULBRA, Bolsista de Iniciação Científica PROICT/ULBRA.

³ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA, Bolsista de Iniciação Científica PROICT/ULBRA.

⁴ SIMBIOS Biotecnologia .

⁵ Perdigão Agroindustrial S/A - Videira SC.

⁶ Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA e PPG em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA.

⁷ Professor/Orientador do Curso de Biologia/ULBRA e PPG em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA. (ikuta@ulbra.br)

e F5, e 4 isolados toxigênicos não apresentaram as fímbrias analisadas. A utilização da PCR para detecção de toxinas e fímbrias demonstrou ser um teste prático no diagnóstico da colibacilose.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, ETEC, PCR, colibacilose, fatores de virulência.

ABSTRACT

Forty two *Escherichia coli* isolates from 15 swine farms localized in Southern Brazil were analyzed in this study. The bacterias were isolated from stool of pigs with suspicion of colibacillosis. The samples were characterized by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the presence of virulence factors consisted by fimbrial adhesin F4, F5, F6, F18, F41 and enterotoxins Stb, StaP, Stx2e, LT. Only 15 of 42 isolates were confirmed as carriers of studied virulence factors. The most frequent toxin found in these samples were Stb followed by StaP. The fimbrial adhesins F18, F4 e F5 were found in isolates that carry toxin, but studied fimbrial genes were not detected in 4 toxigenic isolates. The use of PCR to detect toxins and fimbrial adhesins showed to be a practical test on the diagnostic of colibacillosis.

Keywords: *Escherichia coli*, ETEC, PCR, colibacillosis, virulence factors.

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa predominante na microbiota normal de animais homeotérmicos. Algumas cepas produzem fatores de virulência (fímbrias e toxinas) capazes de causar doenças entéricas em seus hospedeiros (NATARO e KAPER, 1998). Segundo Saldarriaga et al. (2000) as fímbrias permitem que as bactérias se liguem às vilosidades intestinais e as toxinas estimulam o enterócito a bombear líquido no lúmen, aumentando a motilidade intestinal e induzindo a diarreia secretora com perda excessiva de fluídos e eletrólitos.

Na suinocultura industrial é muito utilizado o sistema de produção que separa os animais nas etapas de maternidade, creche e crescimento-terminação. As cepas de *E. coli* produtoras de toxinas (ETEC – Enterotoxigenic *E. coli*) estão

diretamente relacionadas ao desenvolvimento da colibacilose em suínos nas fases pré-desmame (maternidade) e pós-desmame (creche, crescimento-terminação), sendo economicamente uma das mais importantes doenças na indústria de suínos (SMITH e LINGOOD, 1971; MOON, 1978; ALEXANDER, 1994; BERBEROV et al., 2004; ZHANG et al., 2006).

Na colibacilose neonatal (pré-desmame), os leitões podem adquirir os agentes patogênicos pelo contato direto com o meio ambiente e mais comumente da própria mãe através do contato de suas fezes. Reconhece-se que a maioria das porcas é portadora assintomática de cepas patogênicas de *E. coli* em seu intestino.

A colibacilose pós-desmame pode se manifestar sob a forma da colibacilose da terceira semana e a doença do edema. A primeira ocorre em leitões com 5 - 25 dias de idade, que é um

período crítico e de grande susceptibilidade, pois além de deixarem a companhia materna, ocorre a substituição do leite para alimentação exclusiva de ração. A doença do edema por sua vez, caracteriza-se pela ocorrência de sinais de disfunção neurológica, mortes súbitas e desenvolvimento de edemas, afetando principalmente leitões entre 4 a 15 dias após o desmame, podendo ocorrer em alguns casos em animais de mais de 60 dias (HOLLAND, 1990; LUDKE e LUDKE, 2003).

As fímbrias de adesão encontradas com maior frequência em ETEC de origem suína são F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 (F107) e F41 (WILSON e FRANCIS, 1986; OJENIYI et al., 1994; BERTSCHINGER e FAIRBROTHER, 1999; NAGY e FEKETE, 1999) e podem possuir genes codificadores para toxinas denominadas termo-lábeis (LT), termo-estáveis (Sta, Stb) e toxina do tipo Shiga (Stx2e) (MOON et al., 1986; POLLARD et al., 1990; DEAN-NYSTROM et al., 1997; NATARO e KAPER, 1998; BERTSCHINGER e FAIRBROTHER, 1999; NAGY e FEKETE, 1999; CHOI et al., 2001). A partir da aderência, essas bactérias colonizam a superfície celular e secretam as toxinas envolvidas no processo de diarreia.

Atualmente, o diagnóstico de colibacilose é baseado em sinais clínicos e no isolamento bacteriano a partir de amostras de fezes com diarreia (BARCELLOS et al., 1980; MACÊDO et al., 2007). Nestes casos, o isolamento da *E. coli* em altas concentrações é utilizado como um forte indicativo de que estes estejam relacionados com ETEC, permitindo um diagnóstico diferencial das cepas comensais encontradas na microbiota intestinal. Além deste parâmetro, diversos estudos utilizam a atividade hemolítica em ágar sangue como método de triagem de *E. coli* patogênicas

(LUDWIG e GOEBEL, 1997; BRITO et al., 1999; KUHNERT et al., 2000).

A detecção dos FVs é o teste definitivo para diferenciar os isolados *E. coli* patogênicas das comensais, e tem contado com métodos de diagnóstico fenotípicos ou moleculares. Apesar disto, a utilização destas técnicas não é uma prática rotineira nas agroindústrias do país. O uso de tecnologias baseadas na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar genes de fatores virulência já é bem descrito e tem sido recomendado por vários autores para confirmação de isolados relacionados com ETEC (FRANKLIN et al., 1996; BOSWORTH e CASEY, 1997; KWON et al., 1999; OSEK, 2002; VIDAL et al., 2004; OLASZ et al., 2005; WEST et al., 2007; MACÊDO et al., 2007).

Com base na coleta de 42 amostras provenientes de 15 propriedades localizadas nos Estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), este trabalho procurou caracterizar cepas de *E. coli* com fatores de virulência, isoladas de suínos com diarreia previamente diagnosticados com colibacilose. A técnica de PCR multiplex foi aplicada como teste confirmatório para detecção de ETEC, utilizando *primers* específicos para os genes de fímbrias e toxinas (OJENIYI et al., 1994; STACY-PHIPPS et al., 1995; BLANCO et al., 1997; OSEK et al., 1999). Também foram comparadas as relações entre a idade dos animais e presença dos genes de toxina, e a idade dos animais infectados e presença dos genes de fímbrias.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidos 42 isolados de campo a partir de amostras de fezes de suínos, no período de março a agosto de 2006, coletadas em granjas com

suspeitas de colibacilose de 15 propriedades localizadas na região Sul do Brasil (RS, SC e PR) incluindo 7 casos na fase de maternidade, 28 casos de creche e 7 casos na fase de terminação.

Cepas de referência: As quatro amostras de referência, 2568 (Stb, StaP, F18 e Stx2e), 2569 (Stb, LT e F4), 2570 (987P e StaP) e 2571 (StaP, F5 e F41), foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Patologia da empresa Perdigão Agroindustrial (Videira - SC) e utilizados como controles positivos para a técnica de PCR.

Procedimentos Microbiológicos

Isolamento bacteriano: Para a obtenção de colônias isoladas, cada amostra foi semeada em meio de cultura contendo Ágar Sangue ou MacConkey incubada a 37°C durante 24h. Colônias com características sugestivas de *E. coli* foram repicadas por esgotamento, e posteriormente identificadas por provas bioquímicas (OLIVEIRA, 2000).

Atividade hemolítica: amostras de *E. coli* foram inicialmente semeadas em meio ágar sangue (enriquecida com 5% de sangue carneiro desfibrinado) a 37°C por 18h e a atividade hemolítica foi determinada visualmente. Foram consideradas positivas as amostras capazes de induzir halo de hemólise.

Procedimentos Moleculares

Os procedimentos moleculares foram realizados conforme as instruções do fabricante. A

extração do DNA foi realizado utilizando os kits para NewGene Prep e NewGene Preamp, e a amplificação de DNA utilizando o kits NewGene Amp fornecidos pela Simbios Biotecnologia, descritos resumidamente abaixo:

Extração de DNA: Uma suspensão bacteriana de 100 μL foi adicionado em 400 μL da solução NewGeneprep e incubado a 60°C por 10 min. Após centrifugação (10.000 x g, 1 min.), o sobrenadante foi transferido num tubo contendo 20 μL de uma suspensão de sílica (fornecido no kit NewGene Preamp). Após agitação e centrifugação (10 000 x g, 1 min.), o pellet foi lavado 2 vezes com 150 μL solução de lavagem A (5 M tiocianato de guanidina, 0.1 M Tris-HCl [pH 6.4]), 2 vezes com solução de lavagem B (etanol 80%) e 1 vez com solução de lavagem C (etanol 96%). Após a secagem da sílica o DNA foi separado com 50 μL solução de eluição (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA).

Deteccção dos fatores de virulência: O kit NewGene Amp consiste de um PCR multiplex, onde 2 μL do DNA extraído é adicionado em 28 μL de uma mistura pronta dos reagentes de amplificação. Os genes dos 9 fatores de virulência foram amplificados em 3 reações multiplex distintas (Multiplex1, Multiplex2 e Multiplex3) no termociclador Applied Biosystems 9700, e 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 1 minuto a 60°C. Os produtos de deteção foram avaliados em gel de poliacrilamida (10%) corados com nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994). A Tabela 1 apresenta os *primers* utilizados neste estudo para deteção dos genes que codificam as toxinas StaP, Stb, STx2e, LT e das fímbrias de adesão F4, F5, F6, F18 e F41.

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

PCR	FV	SEQÜÊNCIA	Amplicon (pb)
		Primers	
Multiplex 1 Stb, F18, StaP	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'	
	StaP	5' - CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT - 3'	158
		5' - TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG - 3'	
Multiplex 2 CMPAmp LT, F41, Stx2e	LT	5' - GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT - 3'	272
		5' - TGG TCT CGG TCA GAT ATG 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'	
Multiplex 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'	

Análise Estatística

A análise estatística foi feita através das relações entre (i) idade dos animais e presença dos genes de toxina, (ii) idade dos animais infectados e presença dos genes de fímbrias, e posteriormente comparadas pelo teste t de Student.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suinocultura da região Sul do Brasil, composta pelos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul

e Santa Catarina, pode ser considerada como a mais tecnicada da América do Sul, atingindo bons índices de produtividade (ABIPECS, 2006). Uma das principais causas de perdas econômicas na produção comercial de suínos, consiste na ocorrência de diarreia em leitões na fase de creche, causando redução no desempenho de crescimento e mortalidade (CUNHA et al., 2007). Geralmente, a infecção apresenta evolução aguda e sintomas caracterizados por diarreia severa, desidratação e algumas vezes morte (SOJKA, 1971).

No presente trabalho, o procedimento molecular adotado para detecção dos FVs, mostrou ser de fácil execução e interpretação. A

Figura 1 apresenta um exemplo dos resultados laboratoriais obtidos com a amplificação do multiplex PCR-1. No gel de poliacrilamida podemos avaliar amostras como a cepa de referên-

cia 2568, que apresenta as toxinas StaP, Stb e a fímbria F18, e os isolados (canaletas 3-8) com os diferentes padrões encontrados. Resultados semelhantes foram obtidos com os multiplex 2 e 3.

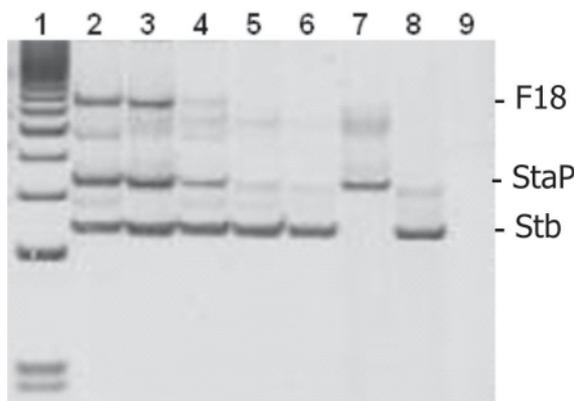


Figura 1 - Multiplex PCR-1 avaliado em gel de eletroforese em poliacrilamida. Os produtos de amplificação referem-se aos alvos Stb (113 bp), StaP (158 bp) e F18 (313 bp). As amostras estão distribuídas da seguinte forma: canaleta 1 com marcador de peso molecular 50 bp, canaleta 2 com o controle positivo 2568, canaletas 3 – 8 isolados de campo e canaleta 9, controle negativo.

São poucos os estudos brasileiros sobre a prevalência e importância de diferentes cepas patogênicas de *E. coli*. Frequentemente o diagnóstico de colibacilose é realizado somente pelo isolamento bacteriano, sem nenhuma caracterização dos fatores de virulência (Baccaro et al., 1999; Baccaro et al., 2000; Calderaro et al., 2001).

A análise dos 42 isolados de *E. coli* deste trabalho demonstrou a presença de toxinas em 15 amostras (Tabela 2), confirmando que estes estavam relacionados com ETEC. Foram encontrados isolados com 1 a 3 toxinas. Respectivamente, 3 isolados com apenas 1 toxina, 8 isolados com 2 e os 4 restantes com 3 (Tabela 3). As toxinas mais frequentemente encontradas foram Stb (14/15) e StaP (10/15), e em menor frequência Stx2e (4/15) e LT (3/15).

Na análise do perfil dos suínos deste estudo não se observou diferenças significativas entre a idade média dos animais infectados por isolados com ($47,5 \pm 40,1$ dias) e sem toxinas ($44,7 \pm 38,1$ dias). Na análise por etapa de produção, não foram encontradas toxinas nos 7 isolados da maternidade. Entre os isolados dos animais de terminação (7), detectou-se 2 isolados com toxinas, ambas com a toxina StaP e uma destas com Stb. A maioria dos isolados relacionados com ETEC foram encontrados na fase de creche (13/28). Calderaro et al. (2001) observaram nos dados coletados de sistemas de produção em São Paulo uma frequência de animais positivos para ETEC semelhante a deste estudo, através da ocorrência das toxinas Sta, Stb, e LT, respectivamente em 25,7% (18/70), 21,5% (15/70) e 7,1% (5/70) dos isolados.

Apesar da casuística de Calderaro (2001) ser maior que a deste trabalho, ele não detectou a verotoxina Stx2e, encontrada em 4 casos aqui descritos. Recentemente Macêdo et al. (2007) também obtiveram uma frequência semelhante em relação à produção de verotoxinas, onde 21,4% dos isolados foram positivos para Stx2e.

Costa et al. (2006) e Macêdo et al. (2007) também observaram com maior prevalência os genes das toxinas Stb, presentes em 50% e 40,5% dos isolados, seguidos de Sta (35%) e StaP (33,3%) respectivamente. Resultados semelhantes para a prevalência das toxinas foram obtidos por Moon et al. (2004).

Tabela 2 - Caracterização dos fatores de virulência (toxinas e fímbrias) de *Escherichia coli* em 42 isolados a partir de amostras de fezes com diarreia em diferentes etapas de produção de suínos.

Etapa	<i>E. coli</i>	Toxina	Fímbria
Maternidade	7	0	0
Creche	28	13	11
Terminação	7	2	0
Total	42	15	11

Na análise das fímbrias, não foram detectadas F6 e F41 em nenhum dos isolados deste estudo (Tabela 3). Considerando as amostras positivas para as fímbrias foram encontradas F18, F4 e F5 em 11 isolados (todos na creche), respectivamente nas proporções de 7/15, 3/15 e 1/15. Em todos estes casos, foram detectados apenas uma fímbria por isolado. Costa et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes aos deste estudo, onde os genes de fímbrias com maior prevalência foram F18, com 27,5%, seguido por F4 e F5 com 22,5%. Moon et al. (2004) também encontraram a fímbria F4 em maior frequência, seguida pela F18. Entretanto, Macêdo et al. (2007), em estudo realizado no Estado de Minas Gerais encontraram resultados que diferem de nossos achados, onde as fímbrias F5, F18, F6, F4 e F41 apresentaram respectivamente as frequências de 33,3%, 19,0%, 14,3%, 14,3% e 9,5% dos isolados.

Nos isolados com toxinas na idade de creche (13), dois não apresentaram as fímbrias

investigadas, como também os 2 isolados toxigênicos de terminação. Quando as médias das idades dos animais infectados isolados toxigênicos com fímbrias ($31,2 \pm 3,4$ dias) foram comparadas com isolados sem fímbrias ($50,8 \pm 43,6$ dias), estas apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0.018$). Nestes casos as fímbrias de adesão estavam presentes em 84,6% dos isolados toxigênicos presentes nos animais da fase de creche, onde concentram-se a maior parte de nossas amostras. Esta é uma fase extremamente delicada para a suinocultura devido aos vários fatores estressantes que ocorrem simultaneamente por ocasião do desmame, principalmente relacionados com a separação dos leitões da matriz, mudança de ambiente e mudança brusca na alimentação. Conseqüentemente, alguns problemas sanitários como diarreia pós-desmame e doença do edema podem surgir, ocasionando perdas econômicas pela elevação da taxa de mortalidade e pela redução no ganho de peso dos leitões (McALLISTER et al., 1979; SANTOS et al., 2003).

Tabela 3 - Caracterização do número de isolados quanto à presença de fímbrias e toxinas de *E. coli*.

Fímbrias	Enterotoxinas				
	Stb	StaP	Stb+StaP	Stb+LT	Stb+Stx2e+StaP
F18			3		4
F4				3	
F5			1		
F-	2	1	1		

Apesar de a literatura sugerir que a presença de atividade hemolítica em cepas de *E. coli* é um indicativo da presença de fatores de virulência (LUDWIG & GOEBEL, 1997; BRITO et al., 1999; KUHNERT et al., 2000), os dados deste trabalho demonstram que este parâmetro não é um teste confirmatório eficiente. Todas as amostras deste estudo (42) apresentaram atividade hemolítica e foram confirmados somente 15 casos como portadoras dos FVs mais importantes. Este estudo corrobora os dados de Macêdo et al. (2007) que sugere que utilização da característica hemolítica não é satisfatória para se identificar amostras diarreicogênicas de *E. coli*.

No presente trabalho, foi realizada uma análise retrospectiva a partir de isolados de fezes de suínos com diarreia obtidas em granjas comerciais localizadas no Sul do Brasil. Todas as amostras apresentaram um forte indicativo de estarem relacionadas com colibacilose (presença de altas concentrações de *E. coli* hemolíticas em fezes com diarreia), e em todos estes casos, os animais foram tratados com antibióticos. Porém, os testes moleculares realizados confirmaram somente um pequeno número de casos (15/42), indicando que parte dos lotes tratados pode não estar relacionada com ETEC. Apesar do presente

trabalho ter pesquisado as toxinas e fímbrias mais importantes descritas na literatura, já existem descrições de novos fatores de virulência que poderiam estar relacionados com alguns casos deste estudo (NATARO et al., 1998; OSEK et al., 1999; BRITO et al., 2003; WEST et al., 2007; WU et al., 2007; ZHANG et al., 2007).

A frequência de cepas patogênicas varia muito, dependendo da fase de produção dos animais estudados, das técnicas utilizadas, da região geográfica e da presença ou não de diarreia. Este fato demonstra a importância da execução de estudos de detecção rápida e fidedigna de fatores virulência em cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia, para determinar regionalmente as mais frequentes e também poder caracterizar a sensibilidade a diferentes agentes antimicrobianos (MACÊDO et al., 2007). Este estudo demonstrou que o diagnóstico laboratorial de colibacilose, baseado exclusivamente no isolamento de *E. coli* a partir de amostras de fezes com diarreia, é um método pouco fidedigno, com alta incidência de resultados falso-positivos. A utilização da PCR para detecção de fatores de virulência (toxinas e fímbrias) demonstrou sua eficiência como teste complementar ao isolamento bacteriano no diagnóstico da colibacilose.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA. **Relatório 2006**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/relatorios/ABIPECS_relatorio_2006_pt.pdf>. Acesso em 16 fevereiro de 2008.

ALEXANDER, T.J.L. Neonatal diarrhoea in pigs. In: GYLES, C. L. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Oxon: CAB International, 1994. p.151-170.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; BRONZONI, P.V.M. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas e verotoxinas através da PCR em amostras de *E. coli* isoladas de leitões lactentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P. Occurrence of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates piglets in Brazil. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne, 2000. p.52.

BARCELLOS, D.E.S.N.; GUIZZARDI, I.I. ; FALLAVENA, L.C.B. Frequência e causa de diarréias bacterianas em suínos nas zonas criatórias do Vale do Taquari e Missões, Rio Grande do Sul, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, v.7, n.1, p.27-37, 1980.

BERBEROV, E.M. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severer

diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *E. coli* that produces multiple enterotoxins. **Infection and Immunity**, v.72, p.3914-3924, 2004.

BERTSCHINGER, H.U.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW B.E. et al. (Eds.) **Diseases of swine**. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.431-468.

BLANCO, M. et al. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K O:H serotypes: relationship with toxigenic phenotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2958-2963, 1997.

BOSWORTH, B.T.; CASEY, T.A. Identification of toxin and pilus genes in porcine *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) with multiple primer pairs. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 97., 1997, Miami. **Abstracts...** Washigton: ASM Press, 1997. Abstract B 509.

BRITO, B.G. et al. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.65, p.123-132, 1999.

BRITO, B.G. et al. Produção de enterotoxina termoestável, hemolisinas, colicina e fatores de colonização de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarréia no sudoeste do Paraná. **Scientia Agraria**, v.4, n1/2, p.15-20, 2003.

CALDERARO, F.F. et al. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo.

Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo, v.68, n.1, p.29-34, 2001.

CHOI, C. et al. Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. **Veterinary Microbiology**, v.81, p.65-71, 2001.

COSTA, M.M. et al. Caracterização epidemiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, p.5-8, 2006.

CUNHA, M.L. et al. Diarréia em leitões da maternidade e creche em uma Unidade Produtora de Leitões (UPL) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Veterinária em Foco**, v.4, n.2, p.177-184, 2007.

DEAN-NYSTROM, E.A. et al. Presence of F18ac (2134 P) fimbriae on 4 P-E.coli isolates from weaned pigs with diarrhea. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.9, p.77-79, 1997.

FRANKLIN, M.A. et al. A PCR-based method of detection and differentiation of K88+ adhesive *Escherichia coli*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.460-463, 1996.

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

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.107-117, 2000.

KWON, D.; KIM, O.; CHAE, C. Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.146-151, 1999.

LUDKE, J.V.; LUDKE, M.C.M. Produção de suínos com ênfase na preservação do ambiente. 2003. Disponível em: www.cnpso.embrapa.br/?artigos/2003/artigo-2003-n21.html. Acesso em 12 fevereiro de 2008.

LUDWIG, A. ; GOEBEL, W. Haemolysins of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli mechanisms of virulence**. Cambridge: Cambridge University, 1997, p.281-329.

MACÊDO, N.R. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1117-1123, 2007.

MCALLISTER, J.S.; KURTZ, H.J.; SHORT JR., E.C. Changes in the intestinal flora of young pigs with postweaning diarrhea or edema disease. **Journal of Animal Science**, v.49, n.3, p.868-887, 1979.

MOON, H.W. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.172, p.443-448, 1978.

MOON, H.W. et al. Prevalence of virulence factors among *Escherichia coli*. Ames: Iowa State University Press, 2004. Disponível em: <http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1601.pdf>. Acesso em 14 de fevereiro 2008.

- MOON, H.W.; SCHNEIDER, R.A.; MOSELEY, S.L. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.210-212, 1986.
- NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v.30, p.259-284, 1999.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142-201, 1998.
- NATARO, J.P.; STEINER, T.; GUERRANT, R.L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.251-261, 1998.
- OJENIYI, B.; AHRENS, P.; MEYLING, A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assays, polymerase chain reaction and phenotypic assays. **Zentralblatt für Veterinärmedizin B**, v.41, p.49-59, 1994.
- OLASZ, F. et al. Characterization of an F18+ enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from post weaning diarrhoea of swine, and of its conjugate virulence plasmid pTC. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, p.281-289, 2005.
- OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia Veterinária - Guia Bacteriológico Prático**. 2.ed. Canoas, Ed. ULBRA, 2000. 235p.
- OSEK, J. Rapid and specific identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.304-310, 2002.
- OSEK, J. et al. The use of polymerase chain reaction for determination of virulence factors of *Escherichia coli* strains from pigs in Poland. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.22, p.163-174, 1999.
- POLLARD, D.R. et al. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.540-545, 1990.
- SALDARRIAGA, F.T.; CALLE, S.E.; CAMACHO, C.S. Resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* provenientes de lechones lactantes criados en una granja tecnificada de Lima. **Revista de Investigaciones Veterinárias del Perú**, Lima, v.11, n.2, p.195-200, 2000.
- SANGUINETTI, C.J.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.915-919, 1994.
- SANTOS, W.G. et al. Manose na alimentação de leitões na fase de creche (Desempenho, pH do trato gastrointestinal e peso dos órgãos). **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.3, p.696-702, 2003.
- SMITH, H.W.; LINGOOD, M.A. Observations of the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v.4, p.467-685, 1971.
- SOJKA, W.J. Enteric diseases in newborn piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. **Veterinary Bulletin**, v. 41, p.509-522, 1971.

STACY-PHIPPS, S.; MECCA, J.J.; WEISS, J.B. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during the course of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.1054-1059, 1995.

VIDAL, R. et al. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.1787-1789, 2004.

ZHANG, W. et al. Significance of heat stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity study. **Infection and Immunity**, v.76, p.3107-3114, 2006.

ZHANG, W. et al. 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.

WEST, D.M. et al. Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan PCR assays. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.323-331, 2007.

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

WU, X. et al. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.1, p.83-91, 2007.