



**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIAGNÓSTICO**  
**GENÉTICO E MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS E DETECÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA  
DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE SUÍNOS DA REGIÃO SUL DO  
BRASIL**

*Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Diagnóstico Genético e Molecular da  
Universidade Luterana do Brasil, para  
a obtenção do Grau de Mestre em  
Diagnóstico Genético e Molecular*

**FERNANDA KIELING MOREIRA**

**ORIENTADOR: DR. NILO IKUTA**

**CANOAS**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Diagnóstico Molecular vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular (PPGDGM) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), sendo financiado pela Simbios Biotecnologia.

Dedico esta conquista à minha Mãezinha e Mana Luci, meus grandes  
exemplos de perseverança e dedicação.

## Agradecimentos

À Ulbra, pelo apoio financeiro, viabilizando o cumprimento de mais esta meta.

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, por contribuírem de forma tão significativa para o aperfeiçoamento de meus estudos.

Ao Dr. Nilo Ikuta, pelo conhecimento compartilhado e por me fazer compreender qual o verdadeiro papel de um pesquisador. És o Agrônomo mais multidisciplinar que já conheci!

À Símbios Biotecnologia, por financiar esta pesquisa e às funcionárias Ana Paula Wobeto, Fabrícia Cerveira, Thaís Boeira e Yara Casanova, pelo auxílio laboratorial.

À Perdigão Agroindustrial, pelo fornecimento das amostras e principalmente à Msc. Priscilla Köerich pela contribuição científica para o desenvolvimento deste estudo.

Aos colegas e amigos da Ulbra: Ana Carolina, Ana Letícia, Bruno, Cíntia, Janaina, Judite, Juliana, Letícia, Maria Luiza (Biba), Meridiana, Rafael, Ronaldo, Samantha e Silvana, que no decorrer de mais esta etapa compreenderam meu jeito acelerado e exigente... Muito obrigada pelos momentos de descontração!

À Elisa e Renatinha, colegas e amigas que compartilharam comigo o conhecimento, os estudos as sextas à noite e as experiências de vida, mas principalmente pelos momentos de muitas risadas nos intermináveis sábados de aula!

À Helô, amiga e "chefe", que sempre me apoiou nos momentos difíceis, deixando de lado as questões profissionais, me fazendo enxergar que valeria a pena seguir em frente!

*Ao Maurício, pela amizade, atenção e profissionalismo durante esses 5 anos de convívio! Hoje, agradeço-te pelo Amor, dedicação e compreensão incondicional, que me incentivam a seguir em frente superando todas as dificuldades. Tu sabes o significado que tens em minha vida. **TE AMO!***

*À Mãezinha e Mana Luci, minhas fiéis escudeiras, amigas de todas as horas! O laço que nos une transcende as Leis da Genética! Graças ao Amor, incentivo e paciência que sempre têm comigo, hoje sinto-me extasiada em poder agradecer e dedicar essa conquista **à Vocês!** Obrigada por estarem sempre ao meu lado e nunca deixarem eu desistir! Vencemos mais uma etapa! **Amo Vocês!!***

## SUMÁRIO

RESUMO .....	07
ABSTRACT .....	08
1. INTRODUÇÃO .....	09
1.1 Suinocultura Industrial .....	09
1.2 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC) .....	11
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
3.1 Procedimentos Microbiológicos .....	17
3.2 Procedimentos Moleculares .....	18
3.3 Análise Estatística .....	20
4. RESULTADOS .....	21
5. DISCUSSÃO .....	28
6. PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES .....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## RESUMO

A colibacilose é uma forma específica de infecção por *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigênica (ETEC) que afeta leitões nos períodos de pré- e pós-desmame. Atualmente, uma das formas mais práticas utilizadas no diagnóstico laboratorial da colibacilose é o isolamento de *E. coli* a partir de amostras de fezes com diarreia, permitindo diferenciar cepas comensais das patogênicas encontradas na microbiota intestinal. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada como teste confirmatório para detecção de fatores de virulência (FV) em ETEC. Neste trabalho foram analisados 42 isolados de *E. coli* originários de 15 granjas de suínos da região Sul do Brasil. Todos os isolados possuíam atividade hemolítica e foram obtidos a partir de fezes de suínos com suspeita de colibacilose. As amostras foram caracterizadas quanto a presença de FV pela PCR, que consistiu na detecção dos genes das fímbrias F4, F5, F6, F18 e F41 e das toxinas Stb, StaP, Stx2e e LT. Somente 35,7% dos isolados apresentaram os FV estudados. As toxinas mais frequentemente encontradas foram Stb e StaP. Nos isolados portadores de toxinas foram encontradas as fímbrias F18, F4 e F5. Quatro isolados toxigênicos não apresentaram as fímbrias analisadas. A determinação do perfil de sensibilidade a antibióticos demonstrou que a colistina (95,2%) seguida de ceftiofur (90,5%) foram os antimicrobianos com maior número de isolados sensíveis. Por outro lado, um menor número de isolados foram sensíveis à tetraciclina (4,8%) e amoxicilina (9,5%). 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 eficiente, apresentando um grande número de resultados falso-positivos (64,3%). Por outro lado, a utilização da PCR para detecção de FV de *E. coli* demonstrou ser um teste prático e eficiente no diagnóstico confirmatório da colibacilose.

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

## ABSTRACT

Colibacillosis is a specific form of infection by Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) that affects pigs during periods of pre- and post-weaning. Currently, one of the most practices used in laboratory diagnosis of colibacillosis is the isolation of *E. coli* from samples of stool with diarrhea, allowing to differentiate commensal from pathogenic strains in the intestinal microbiota. The Polymerase Chain Reaction (PCR) can be used as a confirmatory test to detect virulence factors in ETEC. Forty two *Escherichia coli* isolates from 15 swine farms localized in Southern Brazil were analyzed in this study. All isolates showed hemolytic activity and were obtained from stool of pigs with suspicion of colibacillosis. The samples were characterized by PCR for the presence of virulence factors consisted by fimbrial adhesin F4, F5, F6, F18, F41 and enterotoxins Stb, StaP, Stx2e, LT. Only 35.7% of isolates were confirmed as carriers of studied virulence factors. The most frequent toxin found in these samples was Stb and 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. Determination of antibiotic sensitivity pattern showed that the highest rate of sensitivity was obtained by colistine (95.2%) followed by ceftiofur (90.5%). The worst rate was obtained by tetracycline (4.8%) and amoxiline (9.5%). This study demonstrated that isolation of *E. coli* from faces samples with diarrhea is an inefficient method for colibacillosis diagnosis with high proportion of false positive results (64.3%). In the other hand PCR for *E. coli* virulence factors detection showed to be a practical and efficient test for confirmatory diagnosis of colibacillosis.

**Key-words:** *Escherichia coli*, ETEC, PCR, colibacillosis, virulence factors, antimicrobial resistance.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Suinocultura Industrial**

A suinocultura industrial está inserida no mercado globalizado no qual o Brasil destaca-se como grande fornecedor internacional (Katayama, 2007). Nosso país possui grande potencial de expansão, e atualmente só 20% de sua produção é destinada à exportação para países como Argentina, Cingapura, Hong Kong, Rússia, Ucrânia, entre outros (Agência Safras, 2008).

A região Sul do Brasil é considerada a mais tecnificada da América do Sul neste ramo de atividade, detendo 58% da produção do país. A região Sudeste tem uma participação de 18% e a região Centro Oeste, considerada a nova fronteira de produção de carnes e grãos no Brasil, continua sua expansão, participando atualmente com 14%. Em estudo divulgado pela EMBRAPA e pela Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Suínos, a suinocultura industrial em 2007 apresentou um crescimento de 4,7% em comparação com 2006 (ABIPECS, 2007).

Na suinocultura industrial é muito utilizado o sistema de produção que separa os animais nas etapas de maternidade, creche e crescimento-terminação (Holland, 1990; Ludke & Ludke, 2003). As patologias encontradas com maior frequência podem estar sob a forma de doenças respiratórias, entéricas, sistêmicas e doenças de pele. Além disto, patologias imunossupressoras podem causar quadros sindrômicos

onde muitas bactérias acentuam seu potencial patogênico (Morés & Amaral, 2001).

Na fase de maternidade, após o nascimento, os leitões adquirem patógenos entéricos do contato com o meio ambiente e mais comumente da própria mãe através das fezes. As diarreias decorrentes da coccidiose e da colibacilose neonatal são importantes patologias que prejudicam o desenvolvimento e, eventualmente, provocam mortes dos leitões (Morés et al., 1991).

A saída da maternidade para a creche é um período crítico, pois os leitões deixam a companhia materna e, em substituição ao leite, passam a se alimentar exclusivamente de ração. Por essa razão, os cuidados dedicados, principalmente nos primeiros dias de creche, são de suma importância para evitar perdas de desempenho (McAllister et al., 1979). Nesta fase as diarreias, a doença do edema e a infecção por estreptococos são os principais problemas (Morés et al., 1998). Além disso, problemas imunológicos também afetam o desempenho pós-desmame, visto que a sua imunidade ainda não é completamente efetiva (Svensmark et al., 1989).

A fase de crescimento-terminação é menos preocupante, desde que os leitões apresentem peso compatível com a idade e boas condições sanitárias, que estão diretamente relacionados ao bom desempenho nas fases de maternidade e creche. Os problemas sanitários mais importantes nessa fase são as doenças respiratórias (rinite atrófica e pneumonias) e as infecções por estreptococos, porém, as diarreias também merecem atenção (Dalla Costa et al., 2000).

## **1.2 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)**

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa predominante na microbiota normal de animais homeotérmicos (Nataro & Kaper, 1998). Apresenta-se sob a forma de bastonete e é negativa pela coloração de Gram (Bier, 1985). Algumas cepas produzem fatores de virulência – FV (fímbrias e toxinas) capazes de causar doenças entéricas em seus hospedeiros. O desenvolvimento da infecção depende da adesão, colonização e produção de enterotoxinas no intestino delgado (Nataro & Kaper, 1998; Bertschinger & Fairbrother, 1999). Segundo Saldarriaga et al. (2000), a bactéria se liga às vilosidades intestinais através de estruturas superficiais denominadas fímbrias ou adesinas, e as cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC – *Enterotoxigenic E. coli*) produzem toxinas que estimulam o enterócito a bombear líquido no lúmen, aumentando a motilidade intestinal e induzindo a diarreia por hipersecreção com perda excessiva de fluídos e eletrólitos. A ETEC é considerada a causa mais importante de diarreia em animais neonatos (Saldarriaga et al., 2000).

Os nove FV encontrados com maior frequência em ETEC de origem suína são as fímbrias de adesão F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 (F107) e F41 (Wilson & Francis, 1986; Ojeniyi et al., 1994; Bertschinger & Fairbrother, 1999; Nagy & Fekete, 1999), as toxinas denominadas termo-lábeis (LT), termo-estáveis (StxP, Stx) e a toxina do tipo Shiga (Stx2e) (Moon et al., 1986; Pollard et al., 1990; Dean-Nystrom et al., 1997; Nataro & Kaper, 1998; Bertschinger & Fairbrother, 1999; Nagy & Fekete, 1999; Choi et al., 2001).

As cepas de ETEC estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento da colibacilose nas fases de pré e pós-desmame, sendo economicamente uma das mais importantes doenças na suinocultura industrial. Cerca de 41% das causas de morte deve-se à diarreia, a qual contribui significativamente também para o decréscimo do desempenho e da saúde de suínos (Smith & Lingood, 1971; Moon, 1978; Alexander, 1994; Berberov et al., 2004; Zhang et al., 2006). A ETEC pode manifestar-se através de doenças como a Colibacilose Neonatal, Síndrome da Diarreia Pós-Desmame e Doença do Edema.

A Colibacilose Neonatal (CN) caracteriza-se por ser uma infecção intestinal que afeta leitões logo após o nascimento (maternidade), onde por ação das toxinas da *E. coli* ocorre a troca de líquidos e eletrólitos entre as células das vilosidades e a luz intestinal, e em função do predomínio das atividades secretoras sobre as de absorção, ocorre diarreia severa, desidratação e morte do leitão em 4 a 24 horas. Não são detectadas lesões no intestino delgado e apenas através de necropsia pode se observar leite coagulado no estômago (Frydendahl, 2002).

A Síndrome da Diarreia Pós-Desmame (SDPD) caracteriza-se por ser uma doença multifatorial e de etiologia múltipla, que afeta suínos nas duas primeiras semanas após o desmame (creche). Possui grande importância econômica, em virtude das perdas por mortalidade e pelos gastos com medicamentos no seu controle. As ETEC produtoras da toxina LT e o *rotavírus*, são alguns dos principais agentes infecciosos envolvidos na SDPD, mas também podem ocorrer eventualmente outros agentes como o *Cryptosporidium sp.* e *Clostridium perfringes* tipos A e

C. As principais amostras de *E. coli* associadas à SDPD possuem as fímbrias F4 e F18, e podem produzir uma ou mais enterotoxinas, associadas ou não com Stx2e, responsável pela doença do edema (Nagy et al., 1992; Dean-Nystrom et al., 1993; Zhu et al., 1994).

A Doença do Edema (DE) caracteriza-se por ser uma toxi-infecção pela ocorrência de sinais de disfunção neurológica, mortes súbitas e desenvolvimento de edemas, afetando principalmente leitões entre 4 a 15 dias após o desmame e, alguns casos, podendo ocorrer em animais de mais de 60 dias. Cepas de *E. coli* produtoras da toxina Stx2e aderem-se e proliferam-se na circulação sistêmica, onde ocorre a inativação da síntese protéica do endotélio vascular do intestino delgado, tecidos subcutâneos e encéfalo. Esta lesão nas células endoteliais induz ao aparecimento do edema e sinais nervosos (Marques et al., 1987; Imberechts et al., 1992; Bosworth et al., 1996; Aarestrup et al., 1997).

No Brasil, com frequência, o diagnóstico de colibacilose em suínos é baseado em sinais clínicos, idade e no isolamento bacteriano a partir de amostras de fezes com diarreia, sem nenhuma caracterização de patogenicidade (Barcellos et al., 1980; Macêdo et al., 2007). Desta forma, a *E. coli* quando encontrada em altas concentrações representa um forte indicativo de que estes isolados estejam relacionados com ETEC, permitindo um diagnóstico diferencial em relação às cepas comensais encontradas na microbiota intestinal.

A hemolisina também é frequentemente encontrada nas amostras isoladas de *E. coli* de suínos com infecções entéricas (Brito et al., 1999; Kuhnert et al., 2000). Diversos estudos recomendam a utilização da

atividade hemolítica como método de triagem para a expressão de fímbrias (Ludwig & Goebel, 1997; Brito et al., 1999; Kuhnert et al., 2000), pois o gene responsável pela expressão da fímbria F4 geralmente está localizado no mesmo plasmídeo que carrega o gene determinante da hemólise (Sellwood et al., 1975).

São poucos os estudos brasileiros sobre a prevalência e importância de diferentes cepas patogênicas de *E. coli* (Baccaro et al., 1999; 2000; Calderaro et al., 2001; Macêdo et al., 2007). Além disto, a identificação dos FV não é realizada rotineiramente nos laboratórios de diagnóstico. A identificação dos FV tem contado com métodos de diagnóstico fenotípicos, que permitem que as espécies patogênicas sejam distinguidas daquelas presentes na microbiota intestinal normal. O uso de tecnologias baseadas na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar genes de FV também já é bem descrito e tem sido recomendado por vários autores para confirmação de isolados relacionados com ETEC (Franklin et al., 1996; Bosworth & Casey, 1997; Kwon et al., 1999; Osek, 2002; Vidal et al., 2004; Olasz et al., 2005; West et al., 2007; Macêdo et al., 2007).

Após o isolamento bacteriano, normalmente é realizada a caracterização do perfil de resistência a antibióticos, possibilitando a definição do medicamento adequado para o tratamento da enfermidade (Sayah et al., 2005). A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético e para diversas cepas de *E. coli* o problema agrava-se em face do curto intervalo entre gerações. A capacidade de troca de informações genéticas entre as bactérias ocorre principalmente pela presença de

elementos móveis como os plasmídeos (Saldarriaga et al., 2000; Costa, 2007).

Por sua vez, consumidores e autoridades estão cada vez mais exigentes, em busca de produtos desenvolvidos sob rigorosos critérios de qualidade, sendo crescente a preocupação com o risco à saúde humana pelo consumo de carne contendo resíduos de aditivos alimentares e pela disseminação de fatores de resistência causados pelo uso indiscriminado de antibióticos (Fuller, 1989). A utilização de antibióticos no controle da colibacilose tem apresentado resultados muito variáveis (Visek, 1978; Dunlop, 1998; Sayah et al., 2005). Assim, o controle de doenças entéricas através de manejos como a vacinação e melhorias na biossegurança têm permitido a minimização de surtos e diminuindo a disseminação dos agentes patogênicos, facilitando a produção em larga escala (Visek, 1978; Fávero, 2003).

## **2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS**

As infecções entéricas possuem influência direta nos índices de produtividade da suinocultura, sendo responsáveis por grandes prejuízos econômicos. Desta forma, os suinocultores vêm procurando alternativas para o controle da diarreia, comum após a transferência de leitões para a creche (Choct, 2001; Reid & Friendship, 2002; Verstegen & Williams, 2002). A disseminação desses patógenos nas diferentes etapas de produção tem estimulado o uso de drogas antimicrobianas. Por outro lado, os mercados internacionais têm se tornado cada vez mais exigentes quanto à redução da utilização de antimicrobianos, o que tem gerado a necessidade de manejos mais racionais nos processos de produção. O crescente desenvolvimento de tecnologias moleculares voltadas para a caracterização de cepas patogênicas tem contribuído para obtenção de um diagnóstico rápido e preciso de doenças (Vidal et al., 2004; Olasz et al., 2005; West et al., 2007; Macêdo et al., 2007).

Este trabalho procurou (i) avaliar a eficiência da metodologia utilizada atualmente – procedimentos microbiológicos – para o diagnóstico de suínos com suspeita de colibacilose, (ii) caracterizar os fatores de virulência presentes em *E. coli* isolados de suínos previamente diagnosticados com colibacilose e (iii) determinar o perfil de sensibilidade a antibióticos destas bactérias.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

**Cepas de Referência:** Quatro amostras de referência, 2568 (F18, Stb, StaP e Stx2e), 2569 (F4, Stb e LT), 2570 (F6 e StaP) e 2571 (F5 e F41 e StaP) (Macêdo et al., 2007) foram cedidas pelo Laboratório de Patologia Animal - Perdigão Agroindustrial S.A. e utilizadas como controles positivos para a técnica de PCR multiplex.

**Isolados de Campo:** 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 na fase de creche e 7 casos na fase de terminação.

#### 3.1 Procedimentos Microbiológicos

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

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

**Antibiograma:** o teste de resistência aos antimicrobianos foi realizado através da técnica de difusão do antibiótico impregnado em discos de papel filtro (Brito & Tagliari, 2000). Após a semeadura e a secagem das placas, os seguintes discos de antimicrobianos foram usados: . As placas foram incubadas a 37°C durante 24h, os resultados foram determinados medindo-se os halos de inibição de crescimento e comparando-os com os valores apresentados nas tabelas padrões.

### **3.2 Procedimentos Moleculares**

Os procedimentos moleculares foram realizados conforme as instruções do fabricante. A extração do DNA foi realizado utilizando os kits NewGene Prep e NewGene Preamp, e a amplificação de DNA utilizando o kit NewGeneAmp fornecidos pela Simbios Biotecnologia, descritos resumidamente abaixo:

**Extração de DNA:** Uma suspensão bacteriana de 100 µL foi adicionada em 400 µL da solução NewGene Prep 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. Após agitação e centrifugação (10.000 x g, 1 min.), o "pellet" foi lavado duas vezes com 150 µL solução de lavagem A (5 M tiocianato de guanidina, 0.1 M Tris-HCl [pH 6.4]), duas vezes com solução de lavagem B (etanol 80%) e uma 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).

**Detecção dos fatores de virulência:** Os nove fatores de virulência foram amplificados em três reações multiplex PCR (Multiplex 1, Multiplex 2 e Multiplex 3) fornecidos no kit NewGene Amp. A Tabela 1 apresenta a composição de alvos de cada multiplex utilizados neste estudo para detecção dos genes que codificam as toxinas StaP, Stb, Stx2e, LT e das fímbrias de adesão F4, F5, F6, F18 e F41. Foram adicionados 2 µL do DNA extraído em 28 µL para cada reação de PCR multiplex e as reações foram realizadas no termociclador *Applied Biosystems 9700*. 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 detecção foram avaliados em gel de poliacrilamida (10%) corados com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994).

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

PCR	FV	Amplicon (pb)
Multiplex 1	Stb	113
	F18	313
	StaP	158
Multiplex 2	LT	272
	F41	612
	Stx2e	733
Multiplex 3	F6	409
	F4	499
	F5	230

### **3.3 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.

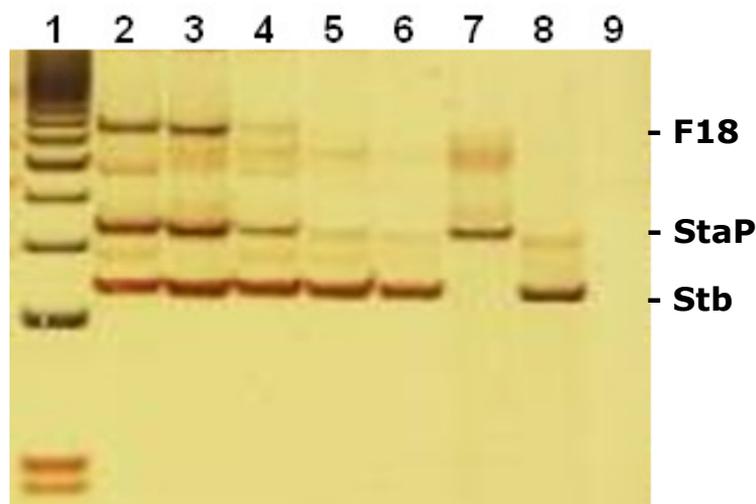
Também foi investigado o perfil de sensibilidade dos isolados de *Escherichia coli* a antimicrobianos através da análise de (i) amostras positivas e negativas para fatores de virulência, (ii) amostras nas idades de maternidade, creche e crescimento-terminação, (iii) amostras coletadas de suínos com suspeita de colibacilose nos Estados do PR, RS e SC, e logo após, comparadas pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

## **4. RESULTADOS**

### ***Implementação do kit NewGene para detecção dos fatores de virulência (FV) de Escherichia coli***

Previamente à avaliação dos isolados de campo, analisou-se a eficiência do kit NewGene através da detecção de fatores de virulência (FV) presentes em 4 cepas de referência (2568, 2569, 2570 e 2571). Estas cepas foram escolhidas por apresentarem todas as cinco fímbrias (F4, F5, F6, F18 e F41) e as 4 toxinas (Stb, StaP, LT e Stx2e) detectáveis no kit. O kit também foi testado em alguns isolados de campo para verificar se o padrão era semelhante com o observado com a análise das cepas de referência.

A Figura 1 apresenta um exemplo dos resultados laboratoriais obtidos com a amplificação do multiplex PCR-1. No gel de poliacrilamida foi possível avaliar amostras da cepa de referência 2568, que apresenta as toxinas StaP, Stb e a fímbria F18, e os isolados de campo com os diferentes padrões encontrados. Resultados semelhantes foram obtidos com os multiplex 2 e 3. A avaliação da eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando as três PCR multiplex demonstrou total coincidência entre os padrões esperados nas 4 cepas de referência e os encontrados experimentalmente. Os dados prévios demonstraram também que o kit possibilitou a análise de isolados de campo (canaletas 3-8) com a mesma eficiência de detecção que o visualizado com as cepas de referência.



**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.

### ***Deteção dos FV em amostras de campo***

A análise dos 42 isolados de *E. coli* deste trabalho demonstrou a presença dos genes de toxinas em 15 amostras, confirmando que estes isolados estavam relacionados com ETEC. As toxinas mais freqüentemente encontradas foram Stb (14/15) e StaP (10/15), e em menor freqüência Stx2e (4/15) e LT (3/15).

Quanto à análise por idade (Tabela 2), não foram encontradas toxinas nos 7 isolados da maternidade. Entre os isolados dos animais de terminação (7), detectou-se 2 isolados com toxinas, ambos com a toxina StaP e um destes com Stb. A maior parte dos isolados relacionados com ETEC foi encontrada na fase de creche (13/28). Na

análise do perfil dos suínos deste estudo não foi possível observar diferenças significativas entre a idade média dos animais com infecção por isolados com ( $47,5 \pm 40,1$  dias) e sem toxinas ( $44,7 \pm 38,1$  dias).

**Tabela 2.** Caracterização dos fatores de virulência de *E. coli* em 42 isolados a partir de amostras de fezes com diarreia em diferentes etapas de produção de suínos.

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

Na análise das fímbrias, dentre os isolados positivos para toxinas na idade de creche (13), dois não apresentaram as fímbrias investigadas e nenhum dos isolados toxigênicos de terminação (2) apresentaram fímbrias de adesão (Tabela 2). Considerando as 15 amostras positivas para toxinas, foram detectadas as fímbrias F18, F4 e F5 em 11 isolados de creche, respectivamente nas proporções de 7/15, 3/15 e 1/15, e não foram detectadas as fímbrias F6 e F41 em nenhuma das amostras testadas (Tabela 3).

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 concentra-se a maior parte de nossas amostras.

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

Fímbrias	Toxinas				
	Stb	StaP	Stb+StaP	Stb+LT	Stb+Stx2e+StaP
F18	-	-	3	-	4
F4	-	-	-	3	-
F5	-	-	1	-	-
<sup>1</sup> F-	2	1	1	-	-

<sup>1</sup> Negativo para as fímbrias investigadas.

### ***Procedimentos Microbiológicos***

O isolamento de colônias bacterianas sugestivas de *E. coli* foram re-isoladas por esgotamento e, posteriormente, confirmadas por provas bioquímicas. Quarenta e dois isolados confirmados foram utilizados nas demais etapas deste estudo. Todos os isolados apresentaram atividade hemolítica quando semeadas em ágar sangue.

### ***Antibiograma dos isolados de campo***

Todos os 42 isolados de campo foram submetidos a técnica de difusão em disco para determinação de sensibilidade às drogas amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, lincomicina+espectinomicina, colistina e tetraciclina. Observou-se que lincomicina+espectinomicina, ceftiofur e colistina foram as drogas de melhor eficácia sobre cepas de *E. coli* positivas e negativas para FV. Conforme dados da Tabela 4, os isolados positivos para FV (15) foram sensíveis aos antibióticos nas proporções 15/15 de lincomicina+espectinomicina e 14/15 de ceftiofur e colistina.

Estes resultados não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados aos isolados negativos para FV (27), onde o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi semelhante, ocorrendo em 26/27 para colistina, 24/27 para ceftiofur e 21/27 para lincomicina+espectinomicina. Os demais antibióticos também apresentaram perfis de sensibilidade semelhantes entre os isolados FV+ e FV-. Porém, neste estudo, os demais antibióticos não seriam recomendáveis para o tratamento da colibacilose, visto que as bactérias mostraram-se mais resistentes no teste de difusão em disco.

**Tabela 4.** Sensibilidade dos isolados de *E. coli* a antimicrobianos positivos e negativos para FV.

<b>Antibiótico</b>	<b>FV (+)</b> 15	<b>FV (-)</b> 27	<b>Total</b> 42
Amoxicilina	1	3	4
Ampicilina	3	4	7
Ceftiofur	14	24	38
Lincomicina+espectinomicina	15	21	36
Colistina	14	26	40
Tetraciclina	2	0	2

Observando a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos nas diferentes etapas de produção, verificou-se maior eficácia da colistina, lincomicina+espectinomicina e ceftiofur e que os demais antimicrobianos apresentam um grande número de isolados com baixa sensibilidade (Tabela 5). Por exemplo, nenhum dos isolados de maternidade foram sensíveis às drogas amoxicilina, ampicilina e tetraciclina. Na fase de creche, a sensibilidade dos isolados às drogas apareceram nas proporções 6/28 (ampicilina), 4/28 (amoxicilina) e

1/28 (tetraciclina). Na fase de crescimento-terminação, nenhum isolado foi sensível ao uso de amoxicilina, enquanto as drogas ampicilina e tetraciclina apresentaram a proporção de 1/7 isolado sensível. A análise estatística indicou que não foram observadas diferenças significativas nos perfis de sensibilidade a antimicrobianos nas 3 etapas de produção de suínos.

**Tabela 5.** Perfil de sensibilidade a antimicrobianos dos 42 isolados com diagnóstico de colibacilose em cada etapa de produção.

Antibiótico	Etapa de Produção			Total (42)
	Maternidade (7)	Creche (28)	Crescimento Terminação (7)	
Amoxicilina	0	4	0	4
Ampicilina	0	6	1	7
Ceftiofur	5	26	7	38
Lincomicina+espectinomicina	7	26	3	36
Colistina	6	27	7	40
Tetraciclina	0	1	1	2

Na Tabela 6, está sumarizado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por região. Nos isolados do Paraná (8) a sensibilidade foi de 8/8 (colistina), 7/8 (ceftiofur) e 4/8 (lincomicina+espectinomicina). No Rio Grande do Sul (14) o perfil de sensibilidade encontrado foi de 13/14 para colistina e ceftiofur, e de 12/14 à lincomicina+espectinomicina. Em Santa Catarina (20) as proporções encontradas foram de 20/20 (lincomicina+espectinomicina), 19/20 (colistina) e 18/20 (ceftiofur). Estes resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa no perfil de sensibilidade à

lincomicina+espectinomicina ( $P>0.002$ ) nas amostras do Paraná, quando comparadas com os isolados do RS e SC.

**Tabela 6.** Perfil de sensibilidade a antimicrobianos nas 42 amostras coletadas nos Estados do PR, RS e SC.

<b>Antibiótico</b>	<b>PR (8)</b>	<b>RS (14)</b>	<b>SC (20)</b>
Amoxicilina	1	2	1
Ampicilina	1	4	2
Ceftiofur	7	13	18
Lincomicina+espectinomicina	4	12	20
Colistina	8	13	19
Tetraciclina	1	0	1

Na análise comparativa das amostras coletadas nos três Estados da região Sul, os demais antimicrobianos demonstraram baixa eficácia para o tratamento de suínos com suspeita de colibacilose. No PR o perfil de sensibilidade dos isolados às drogas amoxicilina, ampicilina e tetraciclina apresentaram a proporção de 1/7. No RS as proporções de sensibilidade foram de 4/14 (ampicilina) e 2/14 (amoxicilina), enquanto que nenhum isolado foi sensível à tetraciclina. Já em SC dois isolados foram sensíveis à ampicilina, enquanto que às drogas amoxicilina e tetraciclina apresentaram a proporção de 1/20.

## **5. DISCUSSÃO**

### ***Fatores de virulência***

A ETEC está relacionada com distintas patologias manifestando-se através de doenças como a Colibacilose Neonatal (CN), Síndrome da Diarréia Pós-Desmame (SDPD) e Doença do Edema (DE). Neste estudo, foram analisadas as principais toxinas descritas na literatura (Moon et al., 1986; Pollard et al., 1990; Dean-Nystrom et al., 1997; Nataro & Kaper, 1998; Bertschinger & Fairbrother, 1999; Nagy & Fekete, 1999; Choi et al., 2001). Todas as 4 toxinas pesquisadas foram encontradas nos isolados da região Sul do Brasil, com variações no número do tipo de toxinas por isolado. Foram observados isolados com 1 a 3 tipos de toxinas sendo que as mais freqüentemente encontradas nas ETECs deste estudo foram: Stb, StaP e em menor freqüência Stx2e e LT. Em outros estudos realizados nos Estados Unidos e no Brasil, o Stb foi também o fator de virulência (FV) mais freqüente (Moon et al., 1999; Costa et al., 2006; Macêdo et al., 2007). Respectivamente estes autores encontraram prevalências entre as ETEC de 93%, 50% e 40,5%.

Neste estudo, foram encontrados isolados toxigênicos com Stx2e em apenas 26,7%. Esta toxina está relacionada com a doença do edema (DE) (Bertschinger & Fairbrother, 1999) e afeta suínos na fase de creche, sendo responsável por perdas econômicas a nível mundial. Apesar da freqüência encontrada não ser tão elevada quando comparada com Stb, este resultado é importante, pois todos os isolados foram detectados no período em que os animais estavam susceptíveis a

esta doença (creche). Outros estudos realizados em nosso país encontraram frequências baixas ou ausência desta toxina em amostras de ETEC. No estudo de Calderaro et al. (2001), não foi detectada esta toxina em amostras coletadas no estado de São Paulo. Foram detectadas Stx2e nos estudos de Macêdo et al. (2007) analisando granjas localizadas no estado de Minas Gerais (21,4%) e de Costa et al. (2006), analisando amostras provenientes da região Sul do Brasil (7,5%).

A toxina LT está geralmente presente em animais no período de creche em casos de Síndrome da Diarréia Pós-Desmame (SDPD). Neste estudo, a LT apresentou a frequência de 20% das amostras positivas para FV, sempre em associação com a toxina Stb. Porcentagem semelhante foi obtida por Costa et al. (2006) onde a toxina LT esteve presente em 35% das amostras isoladas de suínos com diarréia. Martins et al. (2000), em estudo com amostras coletadas em São Paulo, Minas Gerais e Paraná, encontraram LT em apenas 2,2% de amostras FV positivas, e estas associadas a Sta e Stx2e.

Na análise da presença de fímbrias, a F18 foi detectada com maior frequência (27,5%). Nos estudos de Moon et al. (1999 - EUA) e Costa et al. (2006 - Sul Brasil) esta fímbria também se mostrou presente em alta frequência (respectivamente 80% e 27,5%). Em nosso estudo as fímbrias F4 e F5 foram detectadas, respectivamente, em 20% e 6,6% casos com FV. Costa et al. (2006), que analisaram amostras da região Sul, encontraram dados semelhantes para a frequência de F4 (22,5%), e uma frequência mais elevada de isolados positivos para F5 (22,5%). Já Martins et al. (2000) identificaram apenas

1,2% de isolados positivos para F5 (amostras de SP, MG e PR), taxa um pouco inferior ao deste trabalho. Estudos recentes demonstraram que isolados de ETEC com a fímbria F4 associada às enterotoxinas LT ou Stb são suficientemente virulentos para causar diarreia em suínos (Berberov et al., 2004; Zhang et al., 2006). Todas as amostras de nosso estudo com fímbria F4 apresentaram associação com as toxinas Stb e LT.

Por outro lado, não foram detectados isolados com as fímbrias F6 e F41 em nosso estudo. Estas fímbrias foram detectadas por outros autores em nosso país. Macêdo et al. (2007) detectaram as fímbrias F6 e F41 respectivamente, em 14,3% e 9,5% dos ETECs. Martins et al. (2000) detectaram F6 em 35,7% das amostras de ETEC estudadas. O fato de nosso estudo não ter detectado estas fímbrias pode ser atribuído ao pequeno número de amostras e às diferenças nas populações analisadas.

No que se refere à faixa etária, *a priori* a identificação de FV pode ocorrer durante todas as etapas de produção. No nosso estudo, não foram encontrados FV nas amostras de maternidade e a maior parte dos isolados relacionados com ETEC foi encontrada na fase de creche, representando 86,6% dos isolados. Vários estudos corroboram a grande incidência de ETEC na fase de creche, entre eles Macêdo et al. (2007), que encontraram 45,23% e Fairbrother et al. (2000), que detectaram 65,6% nesta fase.

Foi realizada, neste estudo, uma análise comparando a idade dos suínos infectados por isolados de *E. coli* que apresentavam toxinas (ETEC) com os sem toxinas (comensais). Não foi possível observar diferenças significativas entre a idade média dos animais com infecção

isolados com ETEC e isolados comensais. Porém, quando se comparou as médias das idades dos animais em isolados toxigênicos com fímbrias com isolados sem fímbrias, verificou-se que estas apresentaram diferença estatisticamente significativa. 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, são freqüentes problemas sanitários como diarréia pós-desmame e doença do edema, 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).

### ***Antibiograma***

É comum o uso de antibióticos no controle de colibacilose pelas agroindústrias do país. Entretanto, a resistência aos antimicrobianos dificulta a escolha do antibiótico adequado ao tratamento (Hall, 1989). A cautela para evitar a resistência faz com que sejam utilizadas drogas de amplo espectro, resultando em gastos mais elevados com o tratamento (Mota et al., 2005).

Hirsh & Zee (1999) descreveram que isolados de *E. coli* usualmente são sensíveis à gentamicina, amicacina, trimetoprim, sulfazotrim (sulfametoxazol+trimetoprim) e ceftiofur, e resistentes à tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas, ampicilina e canamicina.

Dentre os mesmos antibióticos testados no presente trabalho, os resultados não diferiram quanto à sensibilidade à ceftiofur e resistência à tetraciclina e ampicilina. Os isolados apresentaram perfis de resistência à tetraciclina e ampicilina nas frequências de 95,2% e 83,3%. O ceftiofur, por sua vez, apresentou uma das maiores taxas de sensibilidade, com 90,4% dos isolados. Outros estudos corroboram a sensibilidade dos isolados ao antibiótico ceftiofur: Cunha et al. (2007), Baccaro et al. (2002), Hariharan et al. (2004) e Fairbrother et al. (2000) constataram, respectivamente, taxas de sensibilidade de 100%, 99,8%, 99% e 82%.

Outros antibióticos foram testados neste estudo, como colistina e lincomicina+espectinomicina e demonstraram grande eficácia. Respectivamente, 95,2% e 85,7% dos isolados mostraram-se sensíveis a estes antimicrobianos. Estes dados corroboram os resultados obtidos no país por Macêdo et al. (2007) e Cunha et al. (2007), onde 55,3% e 84,6% dos isolados demonstraram sensibilidade à colistina.

Os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos considerando os isolados que possuíam FV (ETEC) e os sem FV (comensais), não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre estes grupos. Estes resultados eram esperados, já que o antibiograma e o respectivo tratamento com antibióticos ocorre de forma generalizada, sem análise prévia dos isolados relacionados com ETEC. Analisando-se também o perfil de sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos nas diferentes etapas de produção, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos estes grupos. Por outro lado, analisando o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por

Estados, verificou-se diferença estatisticamente significativa no perfil de sensibilidade à lincomicina+espectinomicina nas amostras do Paraná, quando comparadas com os isolados do RS e SC.

### ***Avaliação dos testes para diagnóstico de ETEC***

A detecção de FV contribui para estabelecer o tratamento adequado e para instituir medidas de controle e prevenção da diarreia em suínos (Calderaro et al., 2001). Das 42 amostras de campo deste estudo (todas hemolíticas), somente 35,7% foram positivas para FV, indicando que uma grande proporção das amostras previamente diagnosticadas como colibacilose (64,7%) não estavam relacionadas com ETEC. Deve-se considerar, porém, que apesar do presente trabalho ter detectado as toxinas e fímbrias mais importantes descritas na literatura, já existem descrições de novos fatores de virulência (Nataro et al., 1998; Osek et al., 1999; Brito et al., 2003; West et al., 2007; Wu et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Apesar de a literatura sugerir que a presença de atividade hemolítica em cepas de *E. coli* seja um bom indicativo da presença de fatores de virulência, os dados deste trabalho demonstram que o mesmo não se aplica como teste confirmatório para ETEC, uma vez que 100% dos isolados deste estudo apresentaram atividade hemolítica, independentemente da presença dos FV. Estes dados corroboram os estudos de Macêdo et al. (2007) que indicaram também que utilização da característica hemolítica não é suficiente para se identificar amostras diarreicogênicas de *E. coli*.

No Estado de São Paulo, Calderaro et al. (2001) analisaram 174 amostras de fezes de leitões com diarreia em sistemas de produção de suínos, e no isolamento de um único agente, a ETEC apresentou incidência de 24,7%. Este resultado é semelhante quando comparado a este estudo, onde 35,7% das amostras analisadas apresentaram FV de ETEC. Calderaro et al. (2001) também verificaram que as demais amostras estavam relacionadas com infecções de *Isospora suis* (20,1%), rotavírus (5,7%) e *Cryptosporidium parvum* (0,6%). No isolamento de 2 ou mais agentes, ocorreram associações entre *E. coli* ETEC, *I. suis*, rotavírus e *C. parvum* em 16,1% das amostras. Foram negativos para qualquer agente estudado 32,8% das amostras. Estes resultados são muito importantes para que, em casos de suspeita de colibacilose, seja feita a investigação de outros patógenos além de ETEC em animais com histórico de diarreia nas fases de maternidade, creche e crescimento-terminação.

## 6. PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES

Metodologias moleculares têm permitido que fatores de virulência sejam identificados e espécies patogênicas distinguidas daquelas presentes na microbiota intestinal normal. No presente trabalho, realizou-se 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). Em todos estes casos, os animais foram tratados com antibióticos para controle de *E. coli*. Porém, este trabalho confirmou que somente em um pequeno número destes casos a *E. coli* apresentou fatores de virulência, sugerindo que a maior parte dos lotes tratados não estavam relacionadas com colibacilose. Este estudo indica que a detecção prévia dos FV pode reduzir a utilização desnecessária de agentes antimicrobianos, que pode repercutir na diminuição dos custos de produção.

A frequência de cepas patogênicas pode variar dependendo da fase de produção dos animais estudados, da região geográfica e da presença ou não de diarreia. Este fato demonstra a importância da execução de estudos de detecção de fatores de virulência em cepas de *E. coli* isoladas de suínos, para determinar regionalmente as toxinas e fímbrias mais frequentes e possibilitar a recomendação de cepas vacinais com os respectivos FV, como ferramenta alternativa para controle desta enfermidade.

Este estudo demonstrou também, que o diagnóstico laboratorial de colibacilose, baseado no isolamento de *E. coli* a partir de amostras

de fezes com diarreia, em conjunto com a determinação da característica hemolítica dos isolados, é um método pouco fidedigno e com alta incidência de resultados falso-positivos. Em contrapartida, a utilização da PCR para detecção de FV (toxinas e fímbrias) demonstrou sua eficiência como teste complementar ao isolamento bacteriano no diagnóstico da colibacilose. Espera-se assim, que com a disponibilidade e implementação em nosso país de um kit comercial para detecção dos fatores de virulência de *E. coli*, como o testado neste estudo (NewGene - Simbios Biotecnologia), possa contribuir para o melhor manejo da colibacilose em nosso país.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M., JORSAL, S.E., AHRENS, P., JENSEN, N.E., MEYLING, A. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 20-24, 1997.

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora da Carne Suína. Brasil: características do 4º maior produtor e exportador mundial de carne suína. 2007. Disponível em: <http://www.porkexpo.com.br/index.php/pasta/18/> Acesso em 22 fevereiro de 2008.

AGÊNCIA SAFRAS - Suínos: RS exporta 295,391 mil toneladas em 2007. 2008. Disponível em: <http://www.porkworld.com.br/index.php?documento=2220> Acesso em 28 janeiro de 2008.

ALEXANDER, T.J.L. Neonatal diarrhoea in pigs. In: *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*. CAB International, Wallingford, England. Ed. Gyles CL, p. 151-170, 1994.

BACCARO, M.R., MORENO, A.M., BRONZONI, P.V.M., CAMPOS, D.F.S., FERREIRA, A.J. P., CALDERARO, F.F. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas e verotoxinas através da PCR em amostras de *E. coli* isoladas de leitões lactentes. In: IX Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Belo Horizonte. Anais do IX Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. Concórdia: EMBRAPA-CNPISA, v. 9, 1999.

BACCARO, M.R., MORENO, A.M., CORRÊA, A., FERREIRA, A.J.P., CALDERARO, F.F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarréia. *Arquivos do Instituto Biológico* (São Paulo), v. 69, p. 15-18, 2002.

BACCARO, M.R., MORENO, A.M., FERREIRA, A.J.P. Occurrence of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates piglets in Brazil. *Annals of the International Pig Veterinary Society Congress*, p. 52, 2000.

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, p. 27-37, 1980.

BERBEROV, E.M., ZHOU, Y., FRANCIS, D.H., SCOTT, M.A., KACHMAN, S.D., MOXLEY, R.A. 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., D'ALLAIRE S., MENGELING W.L., TAYLOR, D.J. (Ed.) *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, p. 431-468, 1999.

BIER, O. Microbiologia e Imunologia. *Melhoramentos*, São Paulo 24ª (Ed.), 1234p., 1985.

BOSWORTH, B.T., SAMUEL, J.E., MOON, H.W., O'BRIEN, A.D., GORDON, V.M., WHIPP, S.C. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infection and Immunity*. v. 64, p. 55-60, 1996.

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. *General Meeting of the American Society for Microbiology B*, v. 509, 1997.

BRITO, B.G., LEITE, D.S., LINHARES, R.E., VIDOTTO, M.C. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 65, p. 123-132, 1999.

BRITO, B.G. de, TAGLIARI, K.C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia após o desmame. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 43, p. 133-137, 2000.

BRITO, B.G., TAGLIARI, K.C., BERBEL, M.M., FREIRE, R.L. Produção de enterotoxina termoestável, hemolisinas, colicina e fatores de colonização de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia no sudoeste do Paraná. *Scientia Agraria*, v. 4, p. 15-20, 2003.

CALDERARO, F.F, BACCARO, M.R., MORENO, A.M., FERREIRA, A.J.P., JEREZ, A.J., PENA, H.J.F. 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, p. 29-34, 2001.

CHOCT., M. Enzyme supplementation of poultry diets based on viscous cereals. In: *Enzymes in farm animal nutrition*. BEDFORD, M.R., PARTRIDGE, G.G., (Eds). CABI Publishing, New York, NY, 2001.

CHOI, C., CHO, W., CHUNG, H., JUNG, T., KIM, J., CHAE, C. 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. *Caracterização patotípica de isolados de Escherichia coli obtidos de suínos: presença de plasmídeos e perfil de resistência aos antimicrobianos*. Porto Alegre, 2007. 141p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

COSTA, M.M., SILVA, M.A., SPRICIGO, D.A., WITT, N.M., MARCHIORO, S.B., KOLLING, L., VARGAS, A.P.C. 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., COELHO, C.F., ABILEIRA, F.S., NASCIMENTO, L.G.G., HINNAH, E.G., OLIVEIRA, S.J. 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, p. 177-184, 2007.

DALLA COSTA, O.A., MORÉS, N., SOBESTIANSKY, J., BARIONI JUNIOR, W., PIFFER, I.A., PAIVA, D.P. de, AMARAL, A.L. do, GUZZO, R., LIMA, G.J.M.M., PERDOMO, C.C. Fatores de risco associados à rinite atrófica progressiva e pneumonias crônicas nas fases de crescimento e terminação. *Concórdia: Embrapa Suínos e Aves*, (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 267). 5 p., 2000.

DEAN-NYSTROM, E.A., CASEY T.A., SCHNEIDER, R.A., NAGY, B. A monoclonal antibody identifies 2134P fimbriae as adhesins on enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 37, p. 101-114, 1993.

DEAN-NYSTROM, E.A., BURKHARDT, D., BOSWORTH, B.T., WELTER M.W. 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.

DUNLOP, R.H., MCEWEN, S.A., MEEK, A.H., FRIENDSHIP, R.A., CLARKE, R.C., BLACK, W.D. Antimicrobial drug use and related management practices among Ontario swine producers. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 39, p. 87-96, 1998.

FAIRBROTHER, J.M.; HIGGINS, R.; DESAUTELS, C. Trends in path types and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Quebec. In: *International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne. International Pig Veterinary Society, p. 17, 2000.

FÁVERO, J.A. Produção Suínos. *Concórdia: Embrapa Suínos e Aves: Sistemas de Produção 2*, 53 p., 2003.

FRANKLIN, M.A, FRANCIS, D.H., BAKER, D., MATHEW, A.G. A PCR-based method of detection and differentiation of K88+ adhesive *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 8, p. 460-463, 1996.

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

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.66, p. 365-378, 1989.

HARIHARAN, H.; COLES, M., POOLE, D., PAGE, R. Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 45, p. 605-606, 2004.

HALL, W. A review of colibacillosis in neonatal swine. *Veterinary Medicine*. v. 84, n. 4, p. 428-431, 1989.

HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. Veterinary Microbiology. *Blackwell Science, Malden*, p. 69-74, 1999.

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

IMBERECHTS, H., DE GREVE, H., SCHLICKER, C., BOUCHET, H., POHL, P., CHARLIER, G., BERTSCHINGER, H., WILD, P., VANDEKERCKHOVE, J., VAN DAMME, J., VAN MONTAGU, M., LINTERMANS, P. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes oedema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene *fedA*. *Infection and Immunity*, v. 5, p. 1963-1971, 1992.

KATAYAMA, A. Avicultura e suinocultura: perspectivas 2007. *Porkworld*, v. 36, p. 70-72, 2007.

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: [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_artigos/artigos\\_d0j94t4h.html](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_d0j94t4h.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, p. 281-329, 1997.

MACÊDO, N.R., MENEZES, C.L.P., 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 diarréicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p. 1117-1123, 2007.

MARQUES, L.R.M., PEIRIS, J.S.M., CRYZ, S.J., O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *Microbiology Letters*, v. 44, p. 33-38, 1987.

MARTINS, M.F., MARTINEZ-ROSSI, N.M., FERREIRA, A., BROCCHI, M., YANO, T., CASTRO, A.F., SILVEIRA, W.D. Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 76, p. 51-59, 2000.

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, p. 868-87, 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., HOFFMAN, L.J., CORNICK, N.A., BOOHER, S.L., BOSWORTH, B.T. Prevalences of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates from swine presented to a diagnostic laboratory in Iowa. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, p. 557-560, 1999.

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.

MORÉS, N., AMARAL, A.L. do. Patologias Associadas ao Desmame. *Anais do X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*, p. 215-224, 2001.

MORÉS, N., SOBESTIANSKY, J., DALLA COSTA, O.A., BARIONI JUNIOR, W., PAIVA, D.P. de, LIMA, G.J.M.M. de, PERDOMO, C.C., AMARAL, A.L. do, COIMBRA, J.B.S. Fatores de risco associados aos problemas dos leitões no período pós-desmame. *Concórdia: Embrapa Suínos e Aves* (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 226). 11p., 1998.

MORÉS, N., SOBESTIANSKY, J., CIACCI, J. R., AMARAL, A. L. do, BARIONI JUNIOR, W. Fatores de risco na maternidade associados a diarréia, mortalidade e baixo desempenho dos leitões. *Concórdia: EMBRAPA - CNPSA*, (EMBRAPA - CNPSA. Comunicado Técnico, 178). 4p., 1991.

MOTA, R.A., SILVA, K.P.C., FREITAS, M.F.L., PORTO, W.J.N., SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 42, p. 465-470, 2005.

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

NAGY, B., ARP, L.H., MOON, H.W., CASEY, T.A. Colonization of the small intestine of weaned pigs by enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack known colonization factors. *Veterinary Pathology*, v. 29, p. 239-246, 1992.

NATARO, J.P., KAPER, J.B. Diarrheagenic *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. *Zentralbl Veterinarmed B*, v. 41, p. 49–59, 1994.

OLASZ, F., FEKETE, P.Z., BLUM-OEHLER, G., BOLDOGKŐI, 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, p. 281-289, 2005.

OLIVEIRA, S.J. Microbiologia Veterinária. *Guia Bacteriológico Prático*, Canoas, Ed. ULBRA, 2.ed, p. 240, 2000.

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., GALLIEN, P., TRUSZCZYNSKI, M., PROTZ, D. 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., JOHNSON, W.M., LIOR, H., TYLER, S.D., ROZEE, K.R. 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.

REID, G., FRIENDSHIP, R. Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Animal Biotechnology*, v. 13, p. 97–112, 2002.

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, 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., FILGUEIRAS, E.P., BERTECHINI, A.G., FIALHO, E.T., LIMA, J.A.F., PAIVA-BRITO, M.A.V. Manose na alimentação de leitões na fase de creche (Desempenho, pH do trato gastrintestinal e peso dos órgãos). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, p. 696-702, 2003.

SAYAH, R.S., KANEENE, J.B., JOHNSON, Y., MILLER, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1394-1404, 2005.

SELLWOOD, R., GIBBONS, R.A., JONES, G.W., RUTTER, J.M. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. *Journal of Medical Microbiology*. v. 8, p. 405-411, 1975.

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.

SVENSMARK, B., NIELSEN, K., DALSGAARD, K., WILLEBERG, P. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. III. Rotavirus infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 30, p. 63-70, 1989.

VERSTEGEN, M.W., WILLIAMS, B.A., Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals, *Animal Biotechnology*, v. 13, p. 113-127, 2002.

VIDAL, R., VIDAL, M., LAGOS, R., LEVINE, M., PRADO, V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 1787-1789, 2004.

WISEK, W.J. The mode of growth promotion by antibiotics. *Journal of Animal Science*, v. 46, p. 1447-1469, 1978.

WEST, D.M., SPRIGINGS, K.A., CASSAR, C., WAKELEY, P.R., SAWYER, J., DAVIES, R.H. 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., CHAPMAN, T., TROTT, D.J., BETTELHEIM, K., DO, T.N., DRIESEN, S., WALKER, M.J., CHIN, J. 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, p. 83-91, 2007.

ZHANG, W., BERBEROV, E., FREELING, J., HE, D., MOXLEY, R., FRANCIS, D.H. 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., 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.

ZHU, C., HAREL, J., JACQUES, M., DESAUTELS, C., DONNENBERG, M.S., BEAUDRY, M., FAIRBROTHER, J.M. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infection and Immunity*, v. 62, p. 4153-4159, 1994.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)