



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS,
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia
coli* ISOLADAS DE SUÍNOS HÍGIDOS DO DISTRITO
FEDERAL.**

VINICIUS OLIVEIRA DRUMMOND

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2011**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS,
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia
coli* ISOLADAS DE SUÍNOS HÍGIDOS DO DISTRITO
FEDERAL.**

VINICIUS OLIVEIRA DRUMMOND

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a SIMONE PERECMANIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: DM 040/11

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO 2011**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE SUÍNOS HÍGIDOS DO DISTRITO FEDERAL.

VINICIUS OLIVEIRA DRUMMOND

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

SIMONE PERECMANIS, PROF.^a DR.^a (Universidade de Brasília)
(ORIENTADORA)

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, PROF.^a DR.^a (Universidade de Brasília)
(EXAMINADORA INTERNA)

GINO CHAVES DA ROCHA, PROF. DR. (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 22 DE FEVEREIRO DE 2011

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DRUMMOND, V. O. **Detecção de genes de enterotoxinas, caracterização bioquímica e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos do Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 75 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Drummond, Vinicius Oliveira

Detecção de genes de enterotoxinas, caracterização bioquímica e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos do Distrito Federal. / Vinicius Oliveira Drummond orientação de Simone Perecmanis – Brasília, 2011. 75 p.: Il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011

1. Suíno. 2. *Escherichia coli*. 3. Enterotoxinas. 4. Resistência antimicrobiana. I. Perecmanis, S. II. Título

CDD ou CDU
Agris / FAO

“Desde o primeiro dia em que nos foi facultado admirar o panorama encantador que se divisa quando se colloca os olhos na ocular dum microscopio; desde que vimos com o auxílio desse instrumento maravilhoso os numerosos seres vivos que povoam uma gotta d’água; desde que aprendemos a lidar, a manejar com o microscopio, enraizou-se em nosso espírito a ideia de que os nossos esforços intellectuaes d’ora em diante convergiram para que nos instruissemos, nos especialisássemos numa sciencia que se apoiasse na microscopia...”

Oswaldo Cruz em sua tese “A veiculação Microbiana pela Água”



AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe e meu pai, por estarem do meu lado sempre.

Agradeço à minha orientadora, Simone Perecmanis, por ter me acolhido desde a época da residência e ter acreditado em mim. Agradeço pela ajuda, paciência e compreensão durante toda a jornada, mesmo com as “pedras no meio do caminho”, como diria Drummond (1928), que apareceram no decorrer deste trabalho, principalmente no final.

Agradeço à professora Ângela Patrícia Santana e ao professor Gino Chaves da Rocha por terem aceitado participar da minha banca para darem as suas contribuições que serão muito válidas.

Agradeço ao professor Marcos Bryan Heinemann, pela disponibilização das cepas de *E. coli* utilizadas nesse trabalho, ao professor Ricardo Titze de Almeida, por ter permitido a utilização do MMB, ao professor Rafael Veríssimo Monteiro pela troca de ideias a respeito da estatística e aos demais professores da UnB.

Agradeço à Pri, por ser essa menina linda que está sempre ao meu lado, nas horas boas e ruins, me apoiando em tudo o que faço e constantemente sorridente mesmo quando eu ficava “pensativo”. Agradeço imensamente pela enorme ajuda que ela deu, tendo sido uma das primeiras pessoas a ler minha dissertação e tendo contribuído na construção dela, através de sugestões, comentários e correções. “Estranho é gostar tanto do seu all star azul...” (REIS, N.; ELLER, C., 2000).

Agradeço à Kelly e ao Deusdete por terem tido paciência de me “aturar” nas minhas idas à secretaria, tirando as minhas dúvidas sobre o mestrado e pelas dicas e conversas.

Agradeço à EMATER, na pessoa do Médico Veterinário Edson Cytrangulo, que foi o nosso contato com os escritórios regionais ou mesmo direto com os proprietários nas saídas a campo para as coletas realizadas nesse trabalho e às pessoas que me ajudaram nessas coletas: Rosana (Zana), Michelle, Bárbara, Rafael Magnum e Rafael Lourinho.

Agradeço à galera da Micro Médica: Hudson, Anne Daianne (com dois “n”), Manu, Rafael Lourinho e Rafael Magnum, pela importante ajuda que deram na

execução do meu projeto e pelas horas de risadas, conversas, piadas, debates, brincadeiras, imitações e tudo mais que me fazem levantar todo dia para ir trabalhar com mais vontade.

Agradeço aos “agregados” da Micro e amigos das horas boas e ruins: Vanessa, Mirna, Anahí, Tati, Patão, Ana Paula, Karla, Gabi, Stefânia e Cleilson, por estarem sempre aparecendo por lá pra conversar, fazer brincadeiras, pedir e dar conselhos, se informar sobre resultados, etc. E aos amigos que estavam fora da UnB, mas sempre nos encontrávamos: Renato II, Elen, Marcelo, Bulcão, Crusoé e André. Cada tempo junto de vocês foi único.

Agradeço também aos meus (ex) alunos do Unidesc e aos colegas professores do ônibus do Zé, que muitas vezes compartilhavam, mesmo sem saber, os ônus e os bônus do meu mestrado, e mesmo assim sempre davam apoio. Eles me ensinaram que “*Não existe ninguém tão sábio que não tenha o que aprender e nem tão ignorante que não tenha o que ensinar*” (PASCAL, B. et al., 1653). E aos colegas do Saúde Animal, que muitas vezes estavam ao meu lado, dando dicas sobre projetos ou apoio durante as aulas.

Agradeço a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação, profissional ou pessoal, propositalmente ou por acaso.

E, finalmente, agradeço a Deus, por ter criado as bactérias (principalmente as *E. coli*) e por ter criado os microbiologistas, caso contrário eu não estaria aqui onde estou.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO	3
Classificação	3
Habitat.....	4
Características morfológicas e bioquímicas.....	4
Cultivo e identificação	4
Caracterização antigênica.....	5
Patotipos de <i>E. coli</i>	5
a) <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC)	7
b) <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	9
c) <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	14
d) <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	19
e) <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	20
f) <i>Escherichia coli</i> Difusamente Aderente (DAEC)	21
Outros fatores de virulência	22
A suinocultura	23
Infecções entéricas em suínos.....	24
Infecções entéricas em suínos por <i>E. coli</i>	25
Antibiograma e resistência antimicrobiana.....	27
Identificação das <i>Escherichia coli</i> patogênicas	28
OBJETIVOS.....	31
Geral	31
Específicos.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II	36
PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS EM CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE SUÍNOS HÍGIDOS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL	36
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS	38
Obtenção das amostras	38
Isolamento e identificação bioquímica	39
Perfil antimicrobiano.....	39
Detecção de genes de toxinas	40
RESULTADOS	41
Isolamento e identificação bioquímica	41

Avaliação de sensibilidade a antimicrobianos	44
Genes codificadores de enterotoxinas	45
DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO III	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

		Página
Tabela 1	Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons	40
Tabela 2	Tabela de temperaturas e tempos utilizados na PCR	41
Tabela 3	Dados dos testes bioquímicos realizados com as <i>E. coli</i>	43
Tabela 4	Porcentagens de resistência aos antimicrobianos testados	44
Gráfico 1	Perfil de resistência de <i>E. coli</i> isoladas	45
Tabela 5	Número da cepa de <i>E. coli</i> com o gene identificado, presença de hemólise e perfil de resistência antimicrobiana	47

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Diagrama dos patotipos de <i>Escherichia coli</i> patogênicas	6
Figura 2	Patogenia de EPEC	8
Figura 3	Ação da toxina de Shiga (Stx)	12
Figura 4	Patogenia da EHEC na doença do edema dos suínos	13
Figura 5	Ação das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST)	16
Figura 6	Patogenia da ETEC	18
Figura 7	O Distrito Federal e em destaque os locais de coleta	38
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose, representativa dos resultados de amplificação dos genes	46

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

A/E	Lesão de ligação e esfacelamento
AAF	Fímbria de aderência agregativa
aEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica
AIDA-I	Adesinas Envolvidas na Adesão Difusa
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
AMPc	Adenosina-monofosfato cíclico
BFP	<i>Bundle-forming pilus</i>
BHI	Infuso cérebro-coração
bp	Pares de base
CFA	Antígenos de fator de colonização
CFE	Cefalexina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNF	Fator citotóxico necrosante
CRGC	Vasculopatia renal glomerular e cutânea
DA	Aderência difusa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DAF	<i>Decay-acceleration factor</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DOX	Doxiciclina
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	<i>EPEC adherence factor</i>
EAST-1	Toxina termoestável 1 de <i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
EMB	Eosina Azul de Metileno
ENO	Enrofloxacina
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EST	Estreptomicina
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
GEN	Gentamicina
GMPc	Guanosina-monofosfato cíclico
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
Hly	Alfa-hemolisina
HUS	Síndrome hemolítica urêmica
IF	Imunofluorescência
IMViC	Testes do Indol, VM, VP e Citrato
kDa	Kilodaltons

LA	Aderência localizada
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
LIN	Lincomicina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Toxina termolábil
LT-I	Toxina termolábil-I
LT-II	Toxina termolábil-II
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NEO	Neomicina
NOR	Norfloxacina
O/F	Oxidação e Fermentação
pAA	Plasmídeo de aderência agregativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pEPEC	EPEC em suínos
Pet	<i>Plasmid encoded toxin</i>
Pic	Proteína envolvida em colonização intestinal
pmol	picomol
PRRS	<i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome</i>
rRNA	RNA ribossômico
ShET1	Enterotoxina Shigella 1
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SLT	<i>Shiga-like toxin</i>
SMAC	MacConkey Sorbitol
ST	Toxina termoestável
STa	Toxina termoestável a
STaP	Toxina termoestável variante porcina
STb	Toxina termoestável b
Stx	Shiga toxina
Stx ₁	Shiga toxina 1
Stx ₂	Shiga toxina 2
SUL	Sulfonamidas
SUT	Sulfametoxazol + Trimetoprim
tEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica
TET	Tetraciclina
TSI	Triplo açúcar e Ferro
UFC	Unidades formadoras de colônia
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer
VT	Verotoxina

RESUMO

O crescimento da exportação brasileira de produtos de origem suína brasileira exige uma maior preocupação com a sanidade destes animais, uma vez que doenças como colites e diarreias promovem atraso no desenvolvimento e algumas vezes na morte dos animais. A *Escherichia coli* está entre os agentes mais comumente isolados como causadores dessas afecções e animais hígidos podem abrigar cepas de *E. coli* que contenham genes para a produção de fatores de virulência, como enterotoxinas. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bioquimicamente, traçar um perfil de resistência antimicrobiana e detectar genes de toxinas em cepas de *E. coli* de suínos hígidos no Distrito Federal. Foram isoladas 127 cepas de *E. coli* de 109 suínos e identificadas bioquimicamente, inclusive para presença de hemólise em ágar sangue, testadas para genes de enterotoxinas (STa, LT-I, LT-II, Stx₁ e Stx₂) e resistência a antimicrobianos. Na análise bioquímica não foram observadas grandes diferenças das tabelas de identificação de enterobactérias. Das 127 cepas isoladas, em 66,1% (84) foi verificada a presença de hemólise, e dessas, somente cinco (5,9%) apresentaram genes de virulência. Oito cepas (6,3%) possuíam genes para enterotoxinas, sendo que quatro (3,2%) foram positivas somente para LT-I, três (2,4%) foram positivas somente para STa e uma (0,8%) foi positiva para STa e LT-I. Nenhuma apresentou gene para LT-II, Stx₁ ou Stx₂. Quanto ao perfil de resistência antimicrobiano, os antibióticos com maiores porcentagens de resistência foram a Lincomicina (100%), Sulfonamidas (74,8%), Tetraciclina (70,1%), Doxiciclina (66,1%) e Ampicilina (51,2%). Os maiores índices de sensibilidade antimicrobiana foram observados na Norfloxacina (82,7%), Gentamicina (75,6%), Sulfametoxazol + Trimetoprim (63%), Enrofloxacina (58,3%), Cloranfenicol (56,7%) e Estreptomicina (53,5%). O resultado apresentado nesse estudo demonstra que mesmo um suíno hígido pode carrear cepas de *E. coli* com altas taxas de resistência antimicrobiana e que possuem genes codificadores de enterotoxinas.

Palavras-chave: suíno, *Escherichia coli*, enterotoxinas, resistência antimicrobiana

ABSTRACT

DETECTION OF GENES FOR ENTEROTOXINS, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM HEALTHY SWINES ON DISTRITO FEDERAL, BRAZIL

The growth of exports of Brazilian swine products has consequently a greater concern for the health of these animals, since diseases like diarrhea and colitis promote a developmental delay and sometimes in the animal's death. *Escherichia coli* is among the most common isolated agents causing these injuries, and healthy swines may harbor *E. coli* strains that have genes for virulence factors, like enterotoxins. The goal of this study was isolation and biochemical identification, antimicrobial resistance profile and detection of genes for enterotoxins in strains of *E. coli* from healthy swines in Distrito Federal. A total of 127 strains of *E. coli* were isolated from 109 swines and biochemically tested, observed for hemolysis on blood agar, tested for enterotoxin genes (STa, LT-I, LT-II, Stx₁ e Stx₂) and for antimicrobial resistance. In biochemical tests there were no significant differences between the results and the enterobacterial identification tables. In 84 (66.1%) strains were observed hemolysis, and from these, five (5.9%) were positive for virulence genes. Eight strains (6.3%) had genes for enterotoxins, with four (3.2%) positive only for LT-I, three (2.4%) positive only for STa and one (0.8%) positive for both toxins. There were no positives for LT-II, Stx₁ or Stx₂. When antimicrobial resistance was analyzed, the most resistant antibiotics were Lincomycin (100%), Sulfonamide (74.8%), Tetracycline (70.1%), Doxycyclin (66.1%) and Ampicillin (51.2%). The most sensitive antimicrobials were Norfloxacin (82.7%), Gentamicin (75.6%), Sulfamethoxazole + Trimethoprim (63%), Enrofloxacin (58.3%), Chloramphenicol (56.7%) and Streptomycin (53.5%). These results demonstrate that even a healthy swine could carry *E. coli* strains with high numbers of antimicrobial resistance and with genes that encode enterotoxins.

Keywords: swine, *Escherichia coli*, enterotoxins, antimicrobial resistance

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O Gênero *Escherichia*, um membro da família *Enterobacteriaceae*, é composto por várias espécies, mas somente a *E. coli* é um importante patógeno de animais. Pode ser isolado em uma grande variedade de infecções em animais, tendo um papel de agente primário ou secundário (HIRSH e ZEE, 2003; CARTER e WISE, 2004). Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, na forma de bastonete, que cresce rapidamente em meios de cultivo simples, incluindo ágar MacConkey, onde forma colônias de coloração róseo-avermelhadas (OLIVEIRA, 2000; GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

Cepas patogênicas de *E. coli* têm sido associadas a doenças gastrointestinais, como diarreia e colite hemorrágica, além de serem associadas a significantes perdas de neonatos (DEBROY & MADDOX, 2001). A colibacilose é a maior causa de morte em leitões jovens, normalmente sendo causada por cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, entretanto cepas não enterotoxigênicas também podem causar a doença (FRANCIS, 1999). Além de ser o agente da colibacilose, essa bactéria causa a diarreia pós-desmame em suínos, causando diarreia aquosa, desidratação, perda de peso e algumas vezes a morte de suínos infectados (CHEN et al., 2004).

A chave dos fatores de virulência em diarreia são as enterotoxinas e adesinas fimbriais. Bactérias com capacidade de produzir enterotoxinas irão provocar o

rompimento da homeostase fluida intestinal e causar hipersecreção fluida resultando em diarreia (ZHANG et al., 2007).

No Brasil, com frequência, o diagnóstico de colibacilose em leitões é realizado somente pelo isolamento bacteriano, sem nenhuma caracterização de patogenicidade, sendo poucos os estudos realizados sobre a prevalência e importância de diferentes cepas patogênicas de *E. coli* (MACÊDO et al., 2007). Graças à disponibilidade da sequência genômica da *E. coli*, métodos genéticos vêm sendo bastante utilizados para a detecção da presença de fatores de virulência. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido o método mais aceito de detecção desses fatores (FIALHO, 2008).

A importância das diarreias na suinocultura se deve pelo fato de haver um maior desenvolvimento dos produtores de suínos no Brasil, que buscam cada vez mais um mercado especializado (SIMIONATTO, et al., 2005). O comércio internacional de carne suína movimenta 5,4 milhões de toneladas e gera uma receita anual aproximada de 11,9 bilhões de dólares e está concentrado em cinco países importadores (Japão, Rússia, México, Coreia do Sul e Hong Kong). Os Estados Unidos, a União Europeia, o Canadá, o Brasil e a China são responsáveis por 96% das exportações mundiais (ABIPECS, 2009). Há também a preocupação com a saúde pública pelo risco de contaminação da *E. coli* na produção, principalmente por linhagens de ETEC e EHEC, sendo necessários estudos acerca dessas bactérias (STELLA, 2009).

Mesmo com a importância das diarreias na suinocultura e a tendência à especialização da produção, ainda são escassos no país os dados de prevalência dos agentes bacterianos envolvidos nos diferentes casos de diarreia em animais de produção. Tais dados epidemiológicos são essenciais para identificar e solucionar problemas sanitários, considerados uma ferramenta indispensável para a implantação dos programas de biossegurança na produção de suínos (MENIN et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi verificar a existência de genes codificadores de enterotoxinas termolábil-I (LT-I), termolábil-II (LT-II), termoestável a (STa) e toxinas de Shiga 1 (Stx₁) e 2 (Stx₂) em *E. coli* isoladas de fezes de suínos hígidos de criatórios de subsistência e de granjas comerciais do Distrito Federal, além de caracterizar bioquimicamente e avaliar o perfil fenotípico de resistência antibacteriana dessas bactérias.

REFERENCIAL TEÓRICO

Classificação

Escherichia coli é o microrganismo mais extensivamente estudado, servindo de modelo para estudos de metabolismo bacteriano, divisão celular, papel fisiológico de uma bactéria entérica por ser parte da microbiota fecal normal, entre outros. Entretanto, mesmo com o vasto conhecimento acumulado durante os anos, o estudo da sua composição genômica completa mostrou que ainda há a necessidade de estudos aprofundados sobre este microrganismo (PUENTE e FINLAY, 2001).

É uma bactéria, classificada taxonomicamente, segundo Cavalier-Smith (2004):

- Domínio *Prokaryota*
- Reino *Bacteria*
- Subreino *Negibacteria*
- Filo *Proteobacteria*
- Classe *Gammaproteobacteria*
- Ordem *Enterobacteriales*
- Família *Enterobacteriaceae*
- Gênero *Escherichia*
- Espécie *Escherichia coli*

Foi descrita pela primeira vez, sob o nome de *Bacterium coli commune* em 1885, pelo pediatra alemão Theodore Escherich, isolada a partir de fezes de indivíduos saudáveis, encontrando-as no cólon, daí derivando o nome “coli”. Recebeu o nome de *Escherichia coli* em 1919, em uma revisão de nomenclatura (LEDERBERG, 2004). Em 1983, Yensen relacionou pela primeira vez a *E. coli* com a disenteria dos bezerros, isolando-a em 175 de 271 casos estudados (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

O gênero *Escherichia* é composto de várias espécies, sendo as mais conhecidas a *E. coli*, *E. blatte*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*, mas somente a *E. coli* é um patógeno importante para os animais (HIRSH e ZEE, 2003; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Habitat

Estes microrganismos são habitantes normais do trato gastrointestinal dos homens e dos animais, sendo eliminados nas fezes destes e, desta forma, ocasionando a contaminação do ambiente. A colonização do trato intestinal de mamíferos ocorre logo após o nascimento por contato com as fontes ambientais de *E. coli*. Essa bactéria persiste como membro importante da microbiota normal do intestino por toda a vida de seu hospedeiro (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

Normalmente causam doença septicêmica em diversos animais, além de uma diarreia enterotoxigênica em neonatos e doença do edema em suínos. Pode também ser oportunista em quase todas as espécies animais, causando infecções urinárias, abscessos e pneumonias (HIRSH e ZEE, 2003).

Características morfológicas e bioquímicas

Os membros desta espécie são bastonetes classificados morfológica e bioquimicamente como Gram-negativos, além de serem fermentadores de glicose, lactose e uma ampla variedade de outros açúcares. São catalase-positivos, oxidase-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e que reduzem nitrato a nitrito. Podem ser móveis, possuindo flagelos peritríquios. Crescem bem em meios de cultivo comuns, como o ágar sangue a 37°C em 24h, formando colônias de tamanho médio (2 a 3 mm), lisas e brilhantes (QUINN et al., 1994; CARTER e WISE, 2004; QUINN et al., 2005).

Cultivo e identificação

No ágar MacConkey, devido à sua composição, as *E. coli* formam colônias de coloração róseo-avermelhada, devido à fermentação da lactose, enquanto que no meio Eosina Azul de Metileno (EMB) as colônias apresentam-se pretas e com brilho verde metálico característico devido à precipitação da combinação dos corantes eosina e azul-de-metileno. Em meio de cultivo Triplo açúcar e ferro (TSI) a cor do meio torna-se amarela totalmente, devido à fermentação de glicose, sacarose e lactose, açúcares presentes no meio (QUINN et al., 1994; OLIVEIRA, 2000; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

O teste “IMViC” (Indol [+]; VM [+]; VP [-] e Citrato [-]) é um método rápido e presuntivo de identificar *E. coli*, pois essa combinação de testes auxilia a diferenciação de outros membros da Família *Enterobacteriaceae* fermentadores de lactose (QUINN et al., 1994; OLIVEIRA, 2000; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). O teste do Indol, positivo em 99% das cepas de *E. coli*, é um dos simples e principais testes para diferenciação de outros membros da Família *Enterobacteriaceae* (NATARO e KAPER, 1998).

Caracterização antigênica

A identificação não pode ser baseada somente nas características bioquímicas, pois as *E. coli* não causadoras de diarreias normalmente encontradas nas fezes são semelhantes àquelas com capacidade de causar diarreia. Pode-se lançar mão da classificação sorológica, que utiliza anticorpos contra os antígenos da superfície bacteriana (FIALHO, 2008). Essa classificação baseia-se na presença dos antígenos O (somático), H (flagelares) e K (capsulares), sendo que os antígenos K não são mais rotineiramente determinados, baseando-se a sorotipagem apenas nos antígenos O e H (GYLES e FAIRBROTHER, 2010). Nem todas as cepas de *E. coli* apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Patotipos de *E. coli*

As cepas de *E. coli* que produzem diarreia são chamadas de diarreiogênicas, e aquelas produtoras de doenças em pessoas e animais são divididas em seis principais patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER et al., 2004; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005), sendo que as três primeiras possuem maior importância em animais (DEBROY e MADDOX, 2001). Essas categorias têm fatores de virulência que as ajudam a causar doença, por diferentes mecanismos (WEINTRAUB, 2007). Um diagrama dos patotipos e seus mecanismos de aderência resumidos podem ser visto na Figura 1.

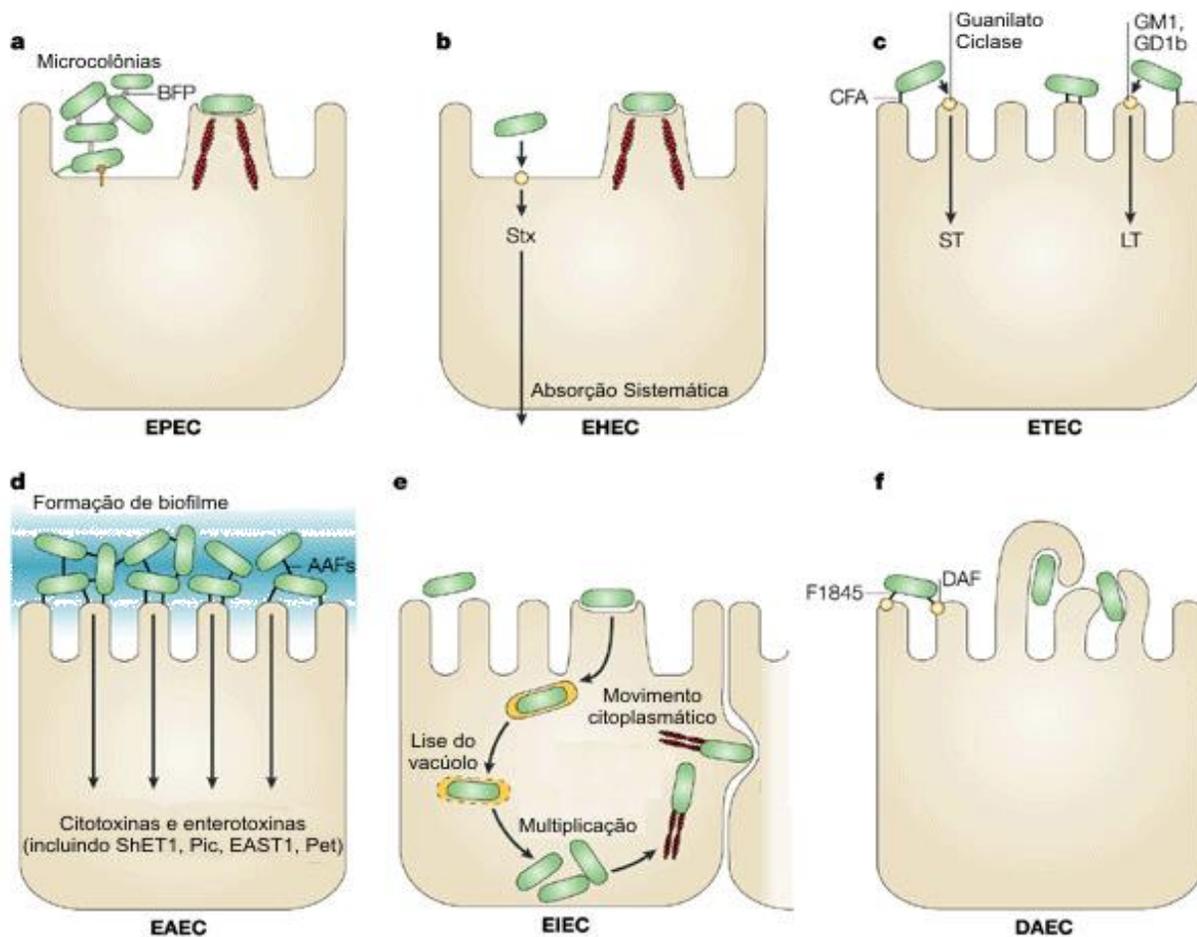


Figura 1. Diagrama dos patótipos de *Escherichia coli* patogênicas. a) *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) aderem aos enterócitos e entre si através da fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) e destroem as microvilosidades, induzindo a lesão característica de ligação e esfacelamento e a formação de pedestal. O rearranjo do citoesqueleto é acompanhado de uma resposta inflamatória e diarreia; b) *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) também induz lesões de ligação e esfacelamento, diferenciando-se pela produção da toxina de Shiga (Stx) que é absorvida pelo sistema causando lesões nos órgãos alvo; c) *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) se aderem aos enterócitos através de antígenos de fator de colonização (CFA), induzindo uma diarreia aquosa pela secreção de enterotoxinas termoestáveis (ST), que se ligam nos receptores guanilato-ciclase e termolábeis (LT), que se ligam nos receptores GM1 e GD1b; d) *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) se aderem aos enterócitos através das fímbrias de aderência agregativa (AAF) formando um fino biofilme e produz citotoxinas e enterotoxinas; e) *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC) invadem o enterócito, lisam o vacúolo e se multiplicam, inclusive indo a células adjacentes; f) *Escherichia coli* Difusamente Aderente (DAEC) se ligam ao enterócito através do receptor F1845 e estimula o crescimento de projeções celulares que envolvem a bactéria. (Fonte: Adaptado de KAPER et al., 2004)

E. coli patogênicas parecem ter evoluído de cepas não patogênicas que adquiriram novos fatores de virulência por transferência horizontal de DNA acessório, normalmente organizados em ilhas de patogenicidade (aglomerado de genes que codificam inúmeras outras características de virulência) no cromossomo ou no plasmídio. Sendo assim, a maioria das cepas patogênicas de *E. coli* não possuem uma origem evolucionária única, mas sim emergiram como resultado de diferentes eventos de transferência de DNA (PUENTE e FINLAY, 2001).

a) *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

EPEC causam diarreia em humanos e em todas as espécies animais, principalmente coelhos, suínos e cães (STELLA, 2009; GYLES e FAIRBROTHER, 2010). Foi a primeira categoria de *E. coli* diarreio gênica identificada e são divididas em típicas e atípicas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). Provocam lesão característica no trato intestinal que é descrita como lesão de fixação e esfacelamento (A/E, da sigla em inglês *Attaching and Effacing*) (HIRSH e ZEE, 2003). A principal característica da lesão A/E é a reorganização da estrutura do enterócito, incluindo a destruição da borda em escova e a formação de estruturas semelhantes a pedestais, no topo de onde a bactéria permanece em íntimo contato com as células (DEBROY e MADDOX, 2001).

A formação da lesão A/E depende da expressão de vários genes localizados em uma região de 35kb do cromossomo de EPEC denominado *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). LEE é considerada uma ilha de patogenicidade porque contém vários genes associados com virulência e não é encontrada em cepas de *E. coli* não patogênicas (KAPER et al., 2004; FIALHO, 2008). As EPEC geralmente exibem um padrão de aderência dependente da presença de um plasmídio EAF (*EPEC adherence factor*), que contém um grupamento de 13 genes que são requeridos tanto para a expressão da Intimina quanto do BFP (*bundle-forming pilus*) (NATARO e KAPER, 1998). Esses fatores fazem com que as EPEC ao invés de cobrir uniformemente as células, se liguem em determinadas áreas da superfície celular, formando grumos compactos, padrão esse conhecido como Aderência Localizada (LA) (FIALHO, 2008).

As cepas de EPEC que não possuem o plasmídio EAF são chamadas de EPEC atípicas, ou aEPEC. Cepas de aEPEC frequentemente expressam toxina termoestável-

1 de *E. coli* enteroagregativa (EAST-1) e outros potenciais fatores de virulência não codificados na região LEE. As aEPEC parecem ser menos virulentas que as EPEC típicas (tEPEC), mas mesmo assim possuem importância em diarreia de humanos (SOUSA, 2006). O plasmídio EAF não é essencial para a formação de lesões A/E, mas aumenta a eficiência da formação das mesmas (TRABULSI et al., 2002).

O mecanismo pelo qual a EPEC induz a diarreia não é bem compreendido. A perda das microvilosidades de absorção na lesão A/E pode levar à diarreia por má absorção (Figura 2) (NATARO e KAPER, 1998). Entretanto, o início rápido da diarreia sugere que um mecanismo de secreção mais ativo está envolvido e pode resultar do efeito da EPEC em mediadores intracelulares de transporte intestinal de íons, como cálcio, inositol, fosfatos e tirosina quinase (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

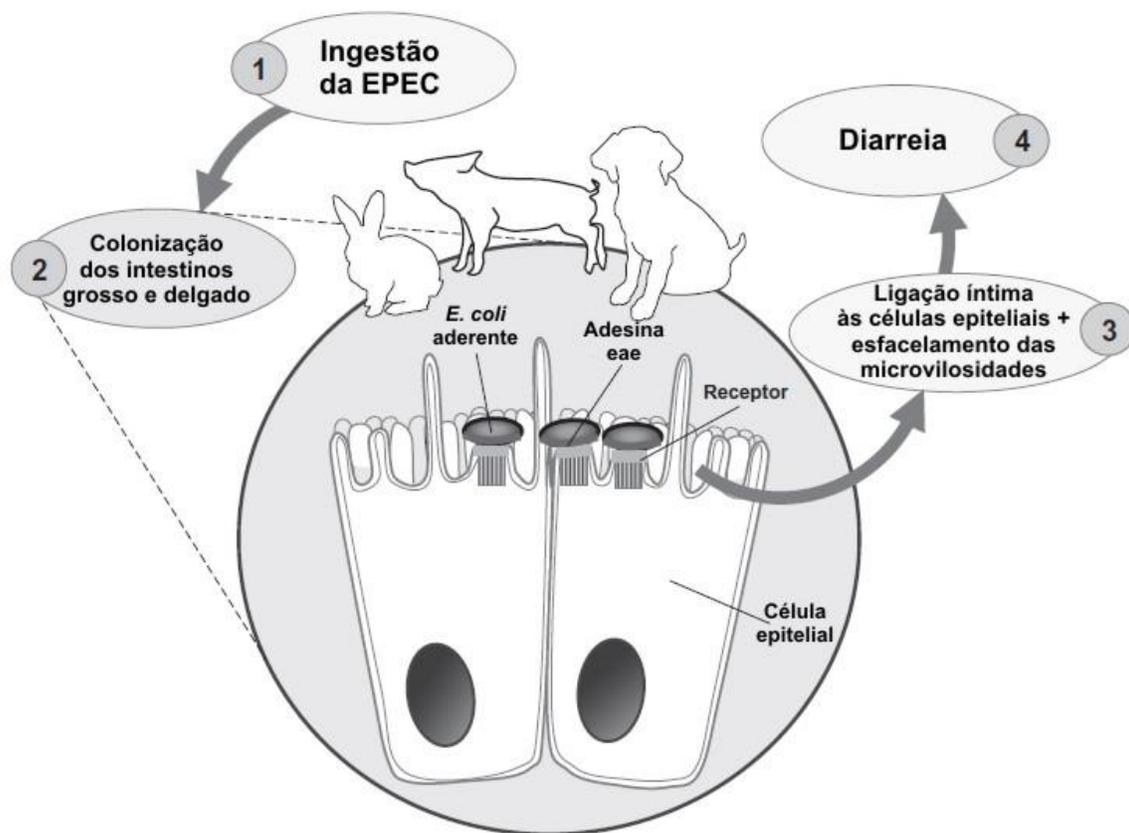


Figura 2. Patogênese de EPEC (Fonte: Adaptado de GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

Animais doentes com EPEC normalmente são descritos como refugos. Eles normalmente não se desenvolvem. A diarreia é normalmente crônica ou mucoide, diferente daquela aquosa das infecções por ETEC (DEBROY e MADDOX, 2001). As EPEC em suínos (pEPEC), são associadas à diarreia pós-desmame em leitões e, segundo Gyles e Fairbrother (2010), no Canadá elas normalmente pertencem ao sorogrupo O45 ou O103, tendo também sido descritas na Hungria 40% de isolados intestinais para o sorotipo O123:H11. Diversos fatores predisponentes, como dietas ricas em soja e ervilhas ou infecção pelo vírus PRRS pode predispor a colonização bacteriana e o desenvolvimento de lesões A/E. Assim, leitões que não mamaram o colostro são mais susceptíveis à infecção que aqueles que receberam colostro.

As EPEC podem ser isoladas através de cultura em meios seletivos e os antígenos somáticos e flagelares detectados (FIALHO, 2008). O fenótipo das lesões A/E pode ser identificado através de cultivo de células HEp-2 ou HeLa e através de análise da biópsia intestinal. Testes moleculares como PCR podem ser usados para diagnóstico de EPEC tendo como alvo a detecção do gene *eae* que codifica a intimina e marcadores do plasmídeo EAF, além de verificar a ausência de genes que codificam a toxina Shiga (NATARO e KAPER, 1998), devido ao fato de algumas EHEC também produzirem lesões A/E (DEBROY e MADDOX, 2001). A diferenciação entre aEPEC e tEPEC é realizada através da detecção do gene *bfp*, uma vez que este gene está presente somente nas cepas de tEPEC (FIALHO, 2008).

b) *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)

Em 1987 foi proposta a designação de *E. coli* Enterohemorrágica para essas bactérias, mas alguns autores têm preferido denominá-las *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC). Trabulsi e Alterthum (2005) optaram por chamá-la de EHEC, pois define melhor as cepas causadoras de colite hemorrágica e suas complicações.

EHEC são enteropatógenos emergentes que causam diarreia aquosa seguida de diarreia sanguinolenta, conhecida como colite hemorrágica. Elas também são associadas com casos severos de síndrome hemolítica urêmica (HUS) em humanos, com uma taxa de mortalidade de 5 a 10% (BAHRANI-MOUGEOT e DONNENBERG, 2004). Existem poucos relatos de HUS em cães, mas a associação com a EHEC não foi

feita. Existem evidências implicando EHEC em diarreia e disenteria em bezerros e cordeiros e vasculopatia renal glomerular e cutânea (CRGC) em cães (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

O reservatório desses organismos é o trato intestinal de bovinos e, conseqüentemente, carne mal cozida contaminada é a principal fonte de infecção para o homem. Leite contaminado, suco, alface, brotos de verdura e *fast food* também já foram identificados como causadores de surtos em humanos (DEBROY e MADDOX, 2001; BAHRANI-MOUGEOT e DONNENBERG, 2004). Outros hospedeiros da EHEC são animais silvestres e domésticos, incluindo ovinos, caprinos, suínos, felinos e cães, e possivelmente aves, pois este patógeno é capaz de colonizar o ceco de galinhas e serem eliminados pelas fezes. As EHEC tornaram-se um grande desafio à saúde pública, pois possuem um alto grau de infectividade para os seres humanos. São capazes de provocar infecção mesmo em baixa quantidade no alimento ingerido (10 UFC). O aumento gradativo da ocorrência de surtos alimentares causados por EHEC em todo o mundo tem mostrado a importância da obtenção de informações sobre a epidemiologia dessa bactéria e de seus reservatórios (PIGATTO, 2008).

Cepas de EHEC pertencem a uma ampla variedade de sorotipos, sendo a O157:H7 a mais comum e mais bem caracterizada dos mais de 50 sorotipos. Outros sorotipos também envolvidos em infecções humanas, particularmente surtos de intoxicação alimentar são o O26, O103, O111, O113 e O145 (DEBROY e MADDOX, 2001; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

A doença é comumente associada com três principais fatores de virulência: a capacidade de produzir lesões A/E, como nas EPEC, a produção de toxinas de Shiga (Stx) e a presença de um plasmídeo que codifica a hemolisina, chamado pO157 (PUENTE e FINLAY, 2001).

I. Toxinas de Shiga (Stx)

As toxinas de Shiga ou *Shiga-like toxins* (SLT), também conhecidas como verotoxinas (VT), recebem esse nome devido à sua toxicidade em células Vero. O nome *shiga-like* se deve ao fato de serem proteínas similares à toxina Shiga, produzida pela *Shigella dysenteriae*. A Stx₁ é idêntica à Stx da *S. dysenteriae*, mas a Stx₂ possui

56% de homologia com a Stx₁. (HIRSH e ZEE, 2003). Elas são compostas de uma subunidade A e cinco subunidades B. Existem dois tipos de toxinas, a Stx₁ e Stx₂. Variantes dos dois tipos de Stx têm sido identificadas, baseando-se primariamente na composição aminoácida e propriedades biológicas. Diferenças em reservatórios animais, doenças animais e severidade da doença em humanos têm sido relacionadas aos vários tipos de Stx. Stx₁ tem variantes Stx_{1c} e Stx_{1d}, enquanto a Stx₂ tem variedades como Stx_{2c}, Stx_{2d}, Stx_{2e} (PUENTE e FINLAY, 2001), Stx_{2f} e Stx_{2g}. A Stx_{2d} é frequentemente implicada em doença severa em humanos, enquanto a Stx_{2e} é encontrada quase exclusivamente em cepas causadoras de danos vasculares na doença do edema em suínos (GYLES e FAIRBROTHER, 2010). Stx₁ e Stx₂ (exceto Stx_{2e}) são codificadas por bacteriófagos, que são capazes de transmitir genes *stx* entre cepas entéricas de *E. coli*. Alguns antimicrobianos podem causar a indução do profago, que pode aumentar o número de cópias e a transcrição do gene *stx* e aumento na produção da toxina (PUENTE e FINLAY, 2001).

Stx se liga ao receptor Gb3 na superfície da célula epitelial ou endotelial do hospedeiro e é internalizado em uma endocitose mediada por receptor. É então transportada ao Complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático rugoso e liberado no citosol. Um pequeno fragmento da subunidade A retira um resíduo de adenina da molécula do rRNA 28S, o que interrompe a síntese proteica (Figura 3) e provoca morte celular e, conseqüentemente uma colite hemorrágica (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

A EHEC no ambiente é ingerida, passa através do estômago até o intestino, onde colonizam e produzem Stx. Em EHEC positivas para o LEE, a formação de lesões A/E é o principal aspecto da colonização intestinal (Figura 4). Quantidades diferentes de toxina são absorvidas na circulação e causam dano vascular em órgãos alvo (GYLES e FAIRBROTHER, 2010). A diarreia observada é mucoide, algumas vezes hemorrágica e difere daquela diarreia aquosa causada por cepas de ETEC. A diarreia é raramente fatal, mas normalmente recorrente apesar do tratamento, resultando em desidratação, fraqueza e atraso no desenvolvimento (DEBROY e MADDOX, 2001).

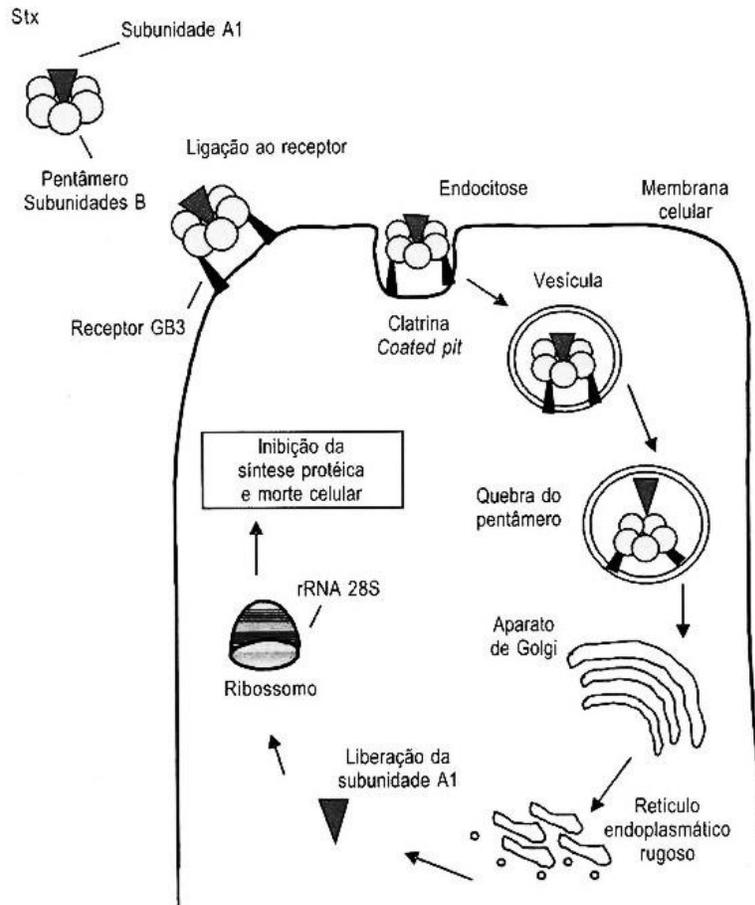


Figura 3. Ação da toxina de Shiga (Stx). Ocorre a ligação da toxina ao receptor GB3, sendo internalizada. A vesícula passa através do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso, onde a subunidade A1 é liberada. Essa subunidade irá se ligar à subunidade 28S do ribossomo e inibir a síntese proteica, ocasionando a morte celular (Fonte: TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

A doença do edema é uma toxemia que geralmente ocorre entre uma e duas semanas após o desmame em suínos de crescimento rápido. A etiologia da doença é complexa, com alterações nutricionais e ambientais e com outros fatores estressantes contribuindo para o seu desenvolvimento. Um número limitado de sorotipos de *E. coli* hemolítico tem sido isolado a partir do trato intestinal em casos da doença. Essas linhagens não-invasivas proliferam-se no trato intestinal e produzem uma verotoxina (Stx_{2e}) que é absorvida pela corrente sanguínea, lesando células endoteliais com consequente edema perivascular (QUINN et al., 2005).

Sorogrupos mais comumente incriminados na doença do edema são o O139 e menos frequentemente o O138 e O141. Outros grupos O também relacionados à doença ou possuindo o gene *stx2e* incluem os grupos O2, O9, O101, O107, O120, O121, O125, O147, O149, O154 e O157 (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

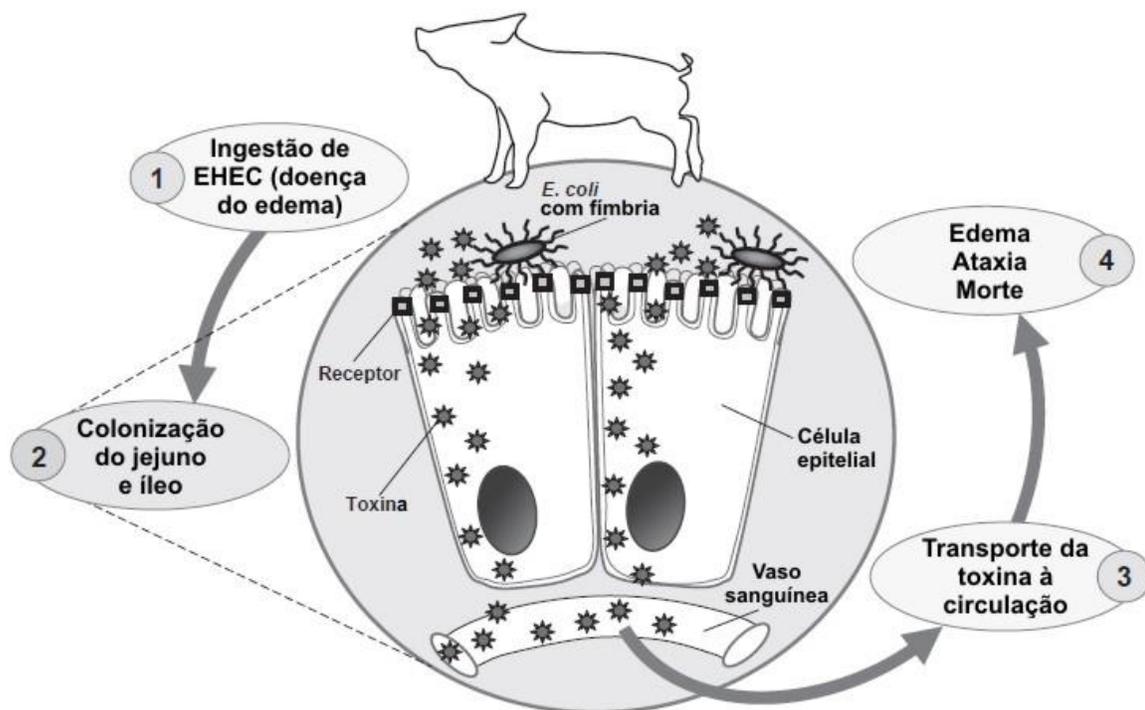


Figura 4. Patogênese da EHEC na doença do edema dos suínos (Fonte: Adaptado de GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

Um dos primeiros testes desenvolvidos para o diagnóstico de EHEC foi a utilização do MacConkey sorbitol (SMAC), baseado na inabilidade do sorotipo O157:H7 em utilizar o sorbitol, mas caindo em desuso devido a existirem outros sorotipos de EHEC que fermentam o sorbitol. O ensaio da toxicidade de células Vero para avaliar o efeito citopático da Stx é um método de referência, porém não é prático para rotina laboratorial. A PCR é a metodologia atualmente recomendada para detecção das EHEC devido à sua especificidade, sensibilidade e rapidez em comparação aos métodos tradicionais (PATON e PATON, 1998). PCR multiplex tem sido utilizada para detectar EHEC, com diversos relatos publicados na detecção de genes como *stx1*, *stx2*, *eae* e *hlyA* (DEBROY e MADDOX, 2001).

c) *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

As ETEC são as causas mais comuns de diarreia em animais de produção (GYLES e FAIRBROTHER, 2010), e a principal causadora de doença e morte em leitões recém-nascidos e no pós desmame. Leitões com aproximadamente oito semanas, são aparentemente resistentes. Essa resistência pode ser devida à diminuição de receptores para as enterotoxinas com o aumento da idade. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que animais mais velhos possuem receptores para determinadas enterotoxinas de ETEC (FRANCIS, 1999). Têm importância também na medicina humana como causadora da “diarreia dos viajantes” nas regiões subtropicais, quando pessoas oriundas de países desenvolvidos visitam países em desenvolvimento, endêmicos para ETEC (BAHRANI-MOUGEOT e DONNENBERG, 2004; STELLA, 2009). Cepas de ETEC causadoras de diarreia em suínos possuem dois tipos de fatores de virulência, enterotoxinas e adesinas, sendo cada um essencial para que a doença ocorra (FRANCIS, 1999).

I. Enterotoxinas

As enterotoxinas são proteínas codificadas por plasmídios e ocorrem sob duas formas: uma toxina estável (ST) ou termoestável, que é uma proteína pouco imunogênica e resistente a 100°C por 15 minutos, e uma toxina lábil (LT) ou termolábil, que é uma proteína altamente imunogênica, grande (aproximadamente 84 kDa), antigenicamente relacionada com a toxina colérica, sendo inativada a 60°C em 15 minutos. A toxina termoestável possui três subgrupos, STa (ou ST-I), STb (ou ST-II) e toxina termoestável 1 de *E. coli* enteroagregativa (EAST-1), enquanto a toxina termolábil possui dois subgrupos, LT-I e LT-II. As enterotoxinas não produzem lesões patológicas ou alterações morfológicas nas células epiteliais, mas promovem o acúmulo de água no lúmen intestinal, o que leva à diarreia (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

a) Toxina Termoestável (ST)

A STa é uma pequena molécula de 2 kDa, pouco imunogênica. Ela é ativa em filhotes de camundongos e leitões, mas é menos ativa em suínos mais velhos, possivelmente por uma diminuição gradual na concentração dos receptores (GYLES e

FAIRBROTHER, 2010). O receptor de STa é um guanilato ciclase ligado à membrana. Esse receptor, quando ligado, resulta na síntese de guanosina-monofosfato cíclico (GMPc) e o seu aumento intracelular provoca abertura dos canais de cloreto com consequente perda de cloreto e água para o lúmen intestinal subsequente a bloqueio de absorção de íons sódio e cloreto, e assim de água, nas células do topo das vilosidades e perda de íons cloreto nas células da cripta (Figura 5). Os efeitos da STa são reversíveis (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; QUINN et al., 2005).

A STb é um peptídeo formado por 48 aminoácidos de 5 kDa e que não está relacionado à STa na composição e atividade biológica. O receptor para STb nas células intestinais foi identificado como um sulfatídio. A STb não altera os níveis de GMPc ou de adenosina-monofosfato cíclico (AMPc) nas células mucosas, diferente da STa e LT. A ligação da STb no receptor leva a um aumento no Ca^{2+} na célula, que por sua vez a síntese de prostaglandina E_2 e 5-hidroxitriptamina, induzindo a secreção no duodeno e jejuno de água e eletrólitos, por um mecanismo ainda não conhecido. ETEC produtoras de STb são comumente associadas com suínos e a maioria das ETEC isoladas de suínos produz STb (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

A EAST-1 é um peptídeo de 38 aminoácidos de 4,1 kDa. É diferente da STa e STb, mas que compartilha 50% de homologia com STa, e aparentemente interage com o receptor da STa, guanilato ciclase, induzindo um aumento no GMPc. Propõe-se que o mecanismo da EAST-1 seja idêntico ao da STa, mas o papel da EAST-1 no desenvolvimento de diarreia ainda precisa ser definido. É codificada pelo gene *astA*, que é carregado em uma grande variedade de sorotipos de *E. coli*, mas parece ser quase sempre presente em sorogrupos O149 de ETEC de suínos (HIRSH e ZEE, 2003; GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

b) Toxina Termolábil (LT)

A LT-I é neutralizada por anticorpos antitoxina colérica, o que não ocorre com a LT-II (HIRSH e ZEE, 2003). A LT-I consiste de cinco subunidades periféricas (subunidades B) e uma central (subunidade A). As subunidades B fixam a toxina aos gangliosídeos GM1 e GD1b da superfície da célula epitelial e a subunidade A altera o metabolismo celular. Uma vez produzida pela *E. coli* e fixada ao enterócito pelas

subunidades B, a subunidade A penetra na célula, ativando a adenil-ciclase, provocando o aumento de AMPc, que por sua vez, determina o bloqueio da absorção de sódio pelas células apicais da mucosa, estimulando a secreção de potássio e carbonato pelas células da cripta (Figura 5). Em consequência dessas alterações ocorrerá aumento da quantidade de líquido na luz intestinal e conseqüentemente, diarreia (KAPER et al., 2004; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

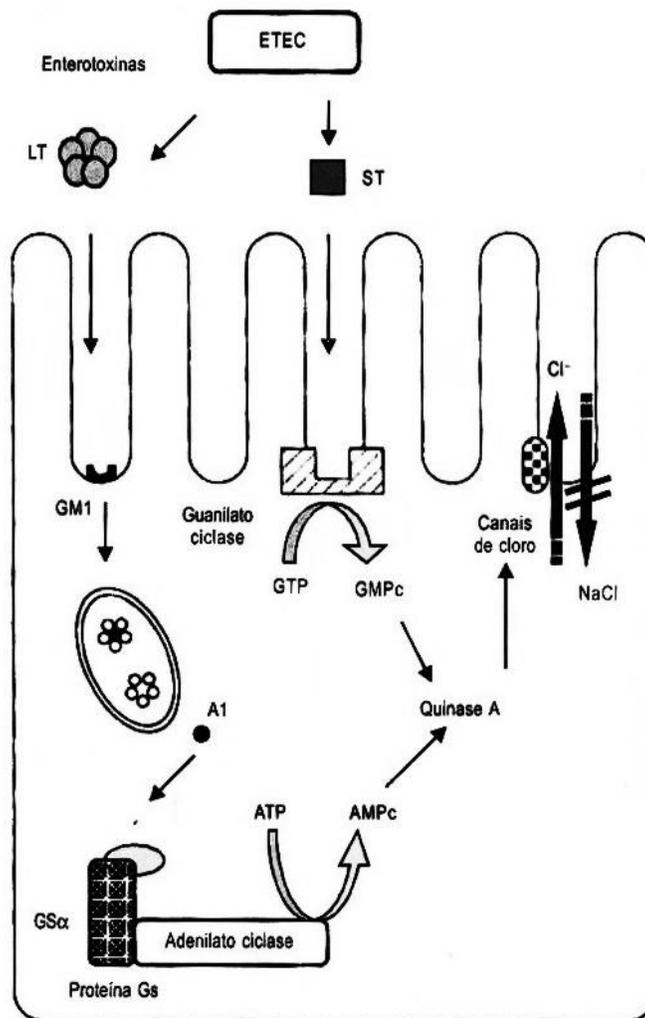


Figura 5. Ação das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). A LT se liga ao receptor GM1 e é internalizada. A subunidade A1 atua na proteína Gs ativada e promove a quebra de adenosina tri-fosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclica (AMPc), que por sua vez ativa a quinase A que irá promover uma secreção de Cl^- e diminuir a absorção de Na^+ , que irá promover perda de água para o lúmen intestinal e diarreia. A ST tem como receptor um guanilato ciclase, cuja ativação promove a quebra de guanosina tri-fosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que irá ativar a quinase A, com conseqüências semelhantes à LT. (Fonte: TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Muitas linhagens de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) de suínos produzem LT-I, enquanto a LT-II tem sido demonstrada em algumas linhagens de ETEC isoladas de bovinos e búfalos aquáticos. A maioria dos isolados de ETEC que produzem LT-I, também possuem adesinas K88 (QUINN et al., 2005).

II. Adesinas

Para causar diarreia, as cepas de ETEC devem primeiro aderir aos enterócitos do intestino delgado, o que é mediado por uma ou mais adesinas, chamadas de CFA (antígenos de fator de colonização) (KAPER et al., 2004). Os genes das CFAs normalmente são codificados em plasmídios que também codificam as enterotoxinas ST e LT (NATARO e KAPER, 1998).

As adesinas, também conhecidas como fímbrias são grandes agregados de subunidades proteicas arranjadas em filamentos que mediam a aderência à células alvo no trato gastrointestinal e são altamente imunogênicas. Devido à sua relativa hidrofobicidade, as adesinas podem também promover associação com a membrana dos macrófagos. É um importante fator de virulência, quando o microrganismo se encontra em superfícies mucosas. *E. coli* produzem diferentes tipos de adesinas, a maioria ligadas à cepas associadas com doenças específicas. A maioria das ETEC possui adesinas, que incluem a K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41, F17, F18, F42 e F165, sendo que as quatro primeiras são as de maior significado nas doenças animais, segundo Quinn et al. (2005). A K88 tem o gene responsável pela sua expressão, geralmente, localizado no mesmo plasmídio que alberga o gene determinante da hemólise, por isso grande parte das cepas que possuem essa fímbria apresentam-se hemolítica em placas de ágar sangue (SOBESTIANSKY et al., 1999). As fímbrias, assim como as enterotoxinas de amostras animais de ETEC geralmente são codificadas por plasmídios, entretanto, a F41 é cromossomal (DEBROY e MADDOX, 2001; QUINN et al., 2005).

ETEC causam uma diarreia aquosa, variando em severidade de uma diarreia branda e autolimitante até uma severa e profusa, semelhante à cólera. As fezes, na maioria das vezes, não apresentam muco, sangue, pus e a doença não produz febre nem vômito (PUENTE e FINLAY, 2001).

Normalmente causam diarreia neonatal em animais e podem levar a bacteremia terminal se não rapidamente tratada com fluidos, eletrólitos e antimicrobianos. A apresentação típica inclui fezes amarelas a branco-acinzentadas durante a primeira semana de vida. Proteção passiva com colostro tem tido sucesso na prevenção das infecções de ETEC carreadoras de tipos clássicos de fímbrias (K88, K99, 987P e F41). Cepas de ETEC normalmente causam doença em leitões com idade entre três e seis semanas após o desmame, quando a imunidade do colostro começa a diminuir (FRANCIS, 1999).

Leitões recém-nascidos ingerem ETEC do ambiente, principalmente da glândula mamária da porca ou na baia da maternidade (Figura 6). Essas ETEC se originam das fezes de outros leitões com diarreia por ETEC, leitões assintomáticos carreadores ou da matriz. Fatores que promovem o desenvolvimento de diarreia incluem pouca higiene, desinfecção inadequada, temperatura ambiente abaixo de 25°C e excessiva corrente de ar. Esses fatores levam a um aumento gradual de *E. coli* patogênicas no meio ambiente ou reduzem o peristaltismo atrasando a passagem da bactéria e anticorpos de proteção através do intestino (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

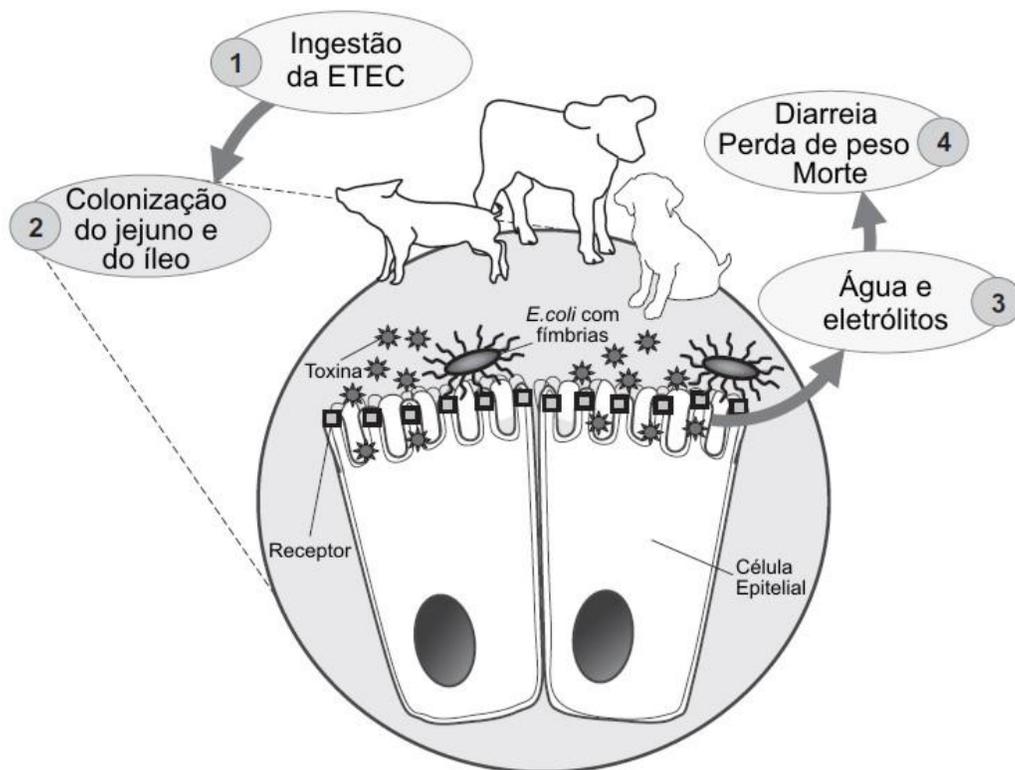


Figura 6. Patogenia da ETEC (Fonte: Adaptado de GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

O diagnóstico das infecções causadas por ETEC é diversificado. À necropsia não são observadas lesões além daquelas associadas à desidratação e algumas vezes uma leve à moderada hiperemia intestinal. Exames histológicos do intestino delgado revelam bastonetes aderentes multifocais ou difusos na superfície da vilosidade. Coloração de Gram de *imprint* do íleo revela um grande número de bastonetes Gram-negativos, com pouca presença de outros organismos presentes e uma grande quantidade de *E. coli* podendo ser cultivada desses tecidos, podendo ser hemolítica ou não hemolítica, apesar de alguns autores afirmarem que somente ETEC hemolíticas colonizam leitões desmamados (FRANCIS, 1999).

A análise genotípica pela PCR permite identificar genes para fatores de virulência de ETEC, como K88, K99, 987P, F18 e F41. É possível também identificar presença de genes para as toxinas LT-I, LT-II, STa e STb (FRANCIS, 1999). Pode ser utilizada também a técnica de PCR multiplex, que permite a pesquisa de diferentes alvos de amplificação de DNA, com a utilização de diferentes *primers* em uma mesma reação, o que reduz sensivelmente os custos do teste (MACÊDO et al., 2007).

d) *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

As EAEC são definidas como cepas de *E. coli* que não secretam toxina LT nem ST e que aderem à células HEp-2 através do padrão autoagregativo, onde as bactérias aderem uma à outra adquirindo uma configuração em tijolos empilhados (NATARO e KAPER, 1998). Essa adesão se dá em virtude de uma estrutura fimbrial conhecida como Fímbria de Aderência Agregativa (AAF) (KAPER et al., 2004).

Vários potenciais fatores de virulência foram descritos para esta categoria, mas a patogênese da diarreia causada pela EAEC ainda permanece desconhecida. Entre as toxinas descritas, as mais bem caracterizadas compreendem a EAST-1, relacionada à ST das ETEC, a *plasmid-encoded toxin* (Pet), uma serina-protease que degrada espectrina e induz rompimento do esqueleto da membrana celular, com alterações na rede de actina do citoesqueleto (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005), além da ShET1 (Enterotoxina *Shigella* 1) e a Pic (*Protein involved in intestinal colonization*), que são toxinas codificadas pelo mesmo *locus* cromossomal, mas em sentidos opostos (FIALHO, 2008).

EAEC são cada vez mais reconhecidas como causadora de diarreia aguda persistente em crianças e adultos, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (KAPER et al., 2004). A diarreia é aquosa secretória, normalmente mucoide. Causa febre baixa, mas sem vômito. Grosseiramente fezes sanguinolentas podem ocorrer, embora na maioria dos casos elas não aconteçam (PUENTE e FINLAY, 2001). Elas produzem a formação de um biofilme mucoso, que pode aglomerar e proteger a bactéria, levando à uma colonização persistente e diarreia (BAHRANI-MOUGEOT e DONNENBERG, 2004).

O diagnóstico de EAEC pode ser realizado pelo teste de aderência à células HEp-2 ou através da detecção de genes responsáveis pela aderência agregativa (NATARO e KAPER, 1998). A PCR para detectar o plasmídio de virulência pAA (plasmídio de aderência agregativa) também tem sido utilizada como método para o diagnóstico de EAEC (FIALHO, 2008).

e) *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

EIEC são relacionadas intimamente à *Shigella* spp nas características bioquímicas e sorológicas, mecanismos de patogenicidade e determinantes virulentos. São identificadas como *E. coli*, através do perfil bioquímico e diferenciadas de outras cepas de *E. coli* baseando-se nas características genotípicas e fenotípicas de *Shigella* spp (BAHRANI-MOUGEOT e DONNENBERG, 2004, KAPER et al., 2004). Quase tudo o que se sabe sobre mecanismos de virulência de EIEC é baseado na extrapolação daquilo estudado em *Shigella* (PUENTE e FINLAY, 2001).

A invasão é o principal mecanismo de virulência da EIEC, onde ocorre a penetração em células epiteliais seguida da lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento direcional no citoplasma e invasão das células adjacentes, com morte celular por apoptose, caso seja um macrófago (KAPER et al., 2004). Esta característica depende da expressão de vários genes que são ativados em resposta a sinais do microambiente e codificados por um plasmídio de invasão denominado plnv, presente em *Shigella* e EIEC (FIALHO, 2008).

Elas causam uma diarreia aquosa, indistinguível daquela causada por ETEC e outros patotipos. Somente uma minoria desenvolve uma disenteria, com muco, sangue

e pus nas fezes, junto com febre e cólicas abdominais severas. Os sintomas se assemelham à doença causada pela *Shigella* spp. a maioria dos estudos epidemiológicos relata a presença de EIEC em surtos, e estes são, usualmente transmitidos pela água e alimentos. (NATARO e KAPER, 1998; PUENTE e FINLAY, 2001).

Diferenciar EIEC de *Shigella* spp e outras cepas de *E. coli*, incluindo as não patogênicas é um dos desafios do diagnóstico. Como *Shigella* spp, a maioria das cepas de EIEC é imóvel, exceto o sorotipo O124:H30, não descarboxilam o aminoácido lisina. As poucas propriedades bioquímicas que diferenciam essas bactérias incluem a L-serina e D-xilose e/ou mucato e acetato. EIEC pode ser positiva para um ou mais desses testes, enquanto a *Shigella* geralmente é negativa. Um número reduzido de antígenos O são encontrados em EIEC, incluindo: O28, 29, 112ac, 121, 135, 136, 143, 144, 152, 159, 164, 167, 163 e O124, podendo estar associado ao antígeno H7 e H30 (O124:H7 e O124:H30). A identificação também pode ser realizada utilizando cultivo celular e verificando o padrão de invasão em células HEp-2 ou HeLa, e ainda através da detecção de genes associados com invasão tais como *ipaH* e *ial* (FIALHO, 2008).

f) *Escherichia coli* Difusamente Aderente (DAEC)

Cepas de *E. coli* que mostram um padrão difuso de aderência (DA) em cultivo de células HEp-2, no qual as bactérias se distribuem uniformemente sobre toda a superfície celular são conhecidas como *E. coli* difusamente aderentes. Com a caracterização das EAEC, DAEC acabou sendo reconhecida como uma classe separada de *E. coli*, embora pouco se saiba sobre seus mecanismos de virulência e sua associação com diarreia permanece controversa (NATARO e KAPER, 1998; PUENTE e FINLAY, 2001).

As DAEC induzem um efeito citopático caracterizado por lesões nas microvilosidades e desenvolvimento de extensões celulares longas, as quais envolvem a bactéria aderente. O padrão difuso de aderência tem sido associado com quatro diferentes adesinas, enquanto toxinas não foram descritas. A F1845 é uma das fímbrias mais importantes desses microrganismos, presente na cepa C1845 e é responsável pelo fenótipo DA das DAEC. O gene que codifica a F1845 é o *daaE* e está presente

tanto no cromossomo da bactéria quanto em plasmídio. Essa fímbria utiliza uma proteína ancorada na superfície celular chamada DAF (*decay-acceleration factor*) como receptor (PUENTE e FINLAY, 2001; FIALHO, 2008).

DAEC podem ser identificadas através de ensaios de cultivo celular, onde se observa a presença de um padrão difuso de aderência, além de PCR para detecção de genes de virulência (FIALHO, 2008).

Outros fatores de virulência

Cepas patogênicas de *E. coli* possuem ainda outros produtos de interesse médico, como a hemolisina, endotoxina, fator citotóxico necrosante, sideróforos e presença de cápsula. (HIRSH e ZEE, 2003; QUINN et al., 2005).

A alfa-hemolisina (Hly) é secretada por muitas cepas virulentas de *E. coli*, e a perda ou ganho do gene *hly* por manipulação genética produz mudanças na virulência dessas bactérias. A produção de hemolisina é frequentemente uma característica de linhagens de *E. coli* isoladas a partir de suínos com doença do edema e diarreia (HIRSH e ZEE, 2003).

Embora seu papel na patogenia não esteja muito bem definido, Puente e Finlay (2001) sugerem que a Hly pode estimular o crescimento bacteriano no intestino pela liberação da hemoglobina das hemácias, providenciando assim uma fonte de ferro. Entretanto outros autores, como Quinn et al. (2005), sugerem que embora frequentemente seja um marcador útil da virulência em certas linhagens de *E. coli*, parece não contribuir de forma direta para sua virulência, mas está estreitamente ligada à expressão de outros fatores de virulência.

A endotoxina, componente lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de microrganismos Gram-negativos é liberada quando as bactérias morrem. É composta de uma molécula de lipídeo A, núcleo polissacarídico e cadeias laterais específicas. O papel do LPS na produção da doença inclui atividade pirogênica, lesão endotelial, levando à coagulação intravascular disseminada e choque endotóxico. Esses efeitos são de grande importância na doença septicêmica (QUINN et al., 2005).

O Fator Citotóxico Necrosante (CNF, da sigla em inglês *Cytotoxin Necrotizing Factor*) é uma proteína que interage com outra proteína Rho ligada à GTP da célula

epitelial, resultando em profundas mudanças no citoesqueleto dessas células, incluindo reorganização da actina e pregueamento da membrana. Existem dois tipos de CNF, CNF1 e CNF2 que são imunologicamente relacionados e de tamanhos similares. O gene que codifica CNF1 está localizado no cromossomo, na Ilha de patogenicidade, enquanto o gene que codifica CNF2 encontra-se no plasmídio (PUENTE e FINLAY, 2001; HIRSH e ZEE, 2003).

Os sideróforos (palavra grega para “carreador de ferro”) são moléculas de ligação com o ferro, como a aerobactina e a enterobactina e são sintetizados por certas linhagens patogênicas de *E. coli*. Quando a disponibilidade de ferro é baixa nos tecidos, essas moléculas de ligação com o ferro podem contribuir para a sobrevivência bacteriana (QUINN et al., 2005).

Polissacarídeos capsulares (antígenos K) são importantes para microrganismos que entram em contato com elementos do sistema imune inato do hospedeiro. Substâncias capsulares protegem a membrana externa do complexo de ataque à membrana da cascata do sistema complemento e impede a ligação e fagocitose do microrganismo pelas células do sistema mononuclear fagocitário. A maioria das cápsulas é carregada negativamente, assim como a membrana dos macrófagos (HIRSH e ZEE, 2003).

A suinocultura

A carne suína é a proteína mais consumida no mundo, sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial de suínos (ABIPECS, 2009), com um rebanho de aproximadamente 37 milhões cabeças, ficando atrás apenas da China, União Europeia e Estados Unidos. O Centro Oeste é responsável por 11,7% do rebanho suíno brasileiro (aproximadamente 4,3 milhões de cabeças), enquanto o Distrito Federal possui 119 mil cabeças (IBGE, 2008).

A atividade suinícola tem apresentado, em nível internacional, uma tendência de concentração e especialização caracterizando-se pela produção cada vez mais eficiente, praticada por um número cada vez menor de produtores (SIMIONATTO et al., 2005).

O principal destaque dos últimos anos é o desempenho das vendas externas brasileiras, que em dez anos ampliaram sua participação nas exportações mundiais de 4% para 11%, superando as barreiras sanitárias, o aumento dos subsídios europeus e o crescimento da concorrência internacional. A produção brasileira aumentou 21,8% nos últimos cinco anos, acompanhando o comportamento da demanda interna e a crescente participação no mercado mundial. Nesse período, a produção industrial de suínos foi a que mais se ampliou (36,7%), enquanto a produção de subsistência registrou queda de 34,1%, indicando que a atividade suinícola no país está em rápido processo de profissionalização (ABIPECS, 2009).

Entre 2004 e 2009, os abates sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF) passaram de 77,7% para 83,1% dos abates totais, confirmando o avanço das garantias dadas à carne suína brasileira. No período, a produção destinada ao autoconsumo (subsistência) caiu 17,6%. Com esta redução, os riscos sanitários também se reduziram (ABIPECS, 2009).

Infecções entéricas em suínos

Infecções entéricas são causadas por uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias como *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli* enteroinvasivas, que causam infecções inflamatórias, e bactérias do gênero *Vibrio* e *E. coli* enterotoxigênicas, que causam uma infecção não-inflamatória (BAHRANI-MOUGEOT e DONNENBERG, 2004).

As infecções bacterianas entéricas em suínos têm importância crescente e são frequentemente observadas em diferentes faixas etárias, provocando um grande impacto para indústria de suínos em todo o mundo (MENIN et al., 2008). As diarreias constituem um fator limitante da produção suína, e afetam animais em todas as fases de crescimento, provocando atraso no desenvolvimento e até a morte dos animais (SIMIONATTO et al., 2005).

Em suínos, as principais bactérias associadas à patogênese das enterites são *E. coli*, *Clostridium perfringens* (Tipos A e C), *C. difficile*, *Salmonella* spp, *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, *Yersinia* spp e *Campylobacter* spp (MENIN et al., 2008).

As infecções entéricas podem levar a altas taxas de mortalidade e morbidade, entretanto, as maiores perdas estão relacionadas a sequelas no trato gastrointestinal. Estas lesões podem ser permanentes ou transitórias, resultando em expressivo atraso no crescimento, redução da eficiência alimentar e custo com tratamentos e alimentação adicionais, respondendo por 60% dos gastos com antimicrobianos na suinocultura moderna (MENIN et al., 2008).

Infecções entéricas em suínos por *E. coli*

A colibacilose é a principal causa de doença e morte em leitões recém-nascidos e pós-desmame. A doença é normalmente causada por cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, embora as não enterotoxigênicas também possam ocasionar a doença (FRANCIS, 1999). As colibaciloses suínas podem ser divididas em quatro tipos:

a) Colibacilose neonatal

A colibacilose neonatal é uma infecção intestinal que acomete leitões no período neonatal, com um quadro severo de diarreia, com curso quase sempre fatal. A manifestação e o curso da doença são muito influenciados pela higiene, manejo, condicionamento ambiental e grau imunitário da porca (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Manchas de fezes normalmente estão presentes no períneo dos leitões, e a cauda fica suja e caída devido ao tônus reduzido. A temperatura do leitão é normal ou levemente baixa e fezes diarreicas são visualizadas em toda a baia. Frequentemente a leitegada inteira está afetada e, com o progresso da doença, leitões recusam-se a mamar ou até tentam mamar, mas estão muito fracos para chegar ao úbere da porca. Eles podem se tornar progressivamente fracos e hipotérmicos, hipoglicêmicos e desidratados. Leitões podem morrer de colibacilose entérica em até 24 horas após o nascimento. (QUINN et al., 2005; JACKSON e COCKCROFT, 2007).

b) Colibacilose da terceira semana

A epidemiologia não está muito bem definida. Pode ser resultado de uma leitegada mais velha exposta a fezes diarreicas de leitões mais jovens. A imunidade dos

mais velhos pode estar baixa, ocorrendo os sinais clínicos. Várias leitegadas podem ser afetadas, e o problema persistir por algum tempo (JACKSON e COCKCROFT, 2007).

Pode estar associada a outros fatores infecciosos, de manejo e/ou nutricionais. No caso de rações de baixa digestibilidade, a ingestão pode gerar um substrato não digerido no intestino delgado funcionando como meio de cultivo para a multiplicação da *E. coli*. O fornecimento de rações em cochos sujos ou ingestão de rações fermentadas podem facilitar a multiplicação desse agente (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Normalmente caracteriza-se por um começo súbito de diarreia pastosa a cremosa de coloração amarelo-pálida a cinza, com sintomatologia mais branda que a da colibacilose neonatal, apresentando uma temperatura normal a levemente baixa. Normalmente a baia encontra-se suja com diarreia fétida, e os leitões doentes encontram-se sujos. Um número variável de leitões é afetado em cada leitegada, podendo ocorrer morte súbita, mas geralmente a mortalidade costuma ser baixa, com alguns animais desenvolvendo uma diarreia crônica ou uma doença moderada (SOBESTIANSKY et al., 1999; JACKSON e COCKCROFT, 2007).

c) Diarreia pós-desmame

A diarreia pós-desmame causada por *E. coli* é economicamente uma das mais importantes doenças na indústria de suínos (ZHANG et al., 2007). É uma doença comum, ultrapassando a doença do edema como principal causa de doenças do pós-desmame em determinados lugares (JACKSON e COCKCROFT, 2007).

A diarreia pós-desmame dos leitões ocorre dentro de uma ou duas semanas após o desmame, frequentemente após alterações no regime alimentar ou no manejo e com possível envolvimento com um rotavírus. A maioria dos surtos está associada à linhagens de ETEC e ocasionalmente EHEC. Sinais clínicos variam de uma doença afebril com inapetência até diarreia em casos severos. Diarreia e manchas avermelhadas em áreas da pele são observadas com frequência (QUINN et al., 2005). Os flancos ficam pregueados e o leitão fica desidratado e magro. Os olhos ficam severamente fundos e as fezes são aquosas, cinza-esverdeadas e com odor fétido. A cauda fica ereta, fria e suja. Alguns animais podem morrer subitamente (JACKSON e COCKCROFT, 2007).

d) Doença do edema

A doença do edema é provavelmente menos comum que a diarreia pós-desmame, mas a incidência dessa doença está em crescimento em grupos prematuramente desmamados. Fatores predisponentes incluem excesso de alimentação, mudança súbita da dieta e perda súbita do leite materno. Esses fatores favorecem o estabelecimento do agente causador no trato intestinal (JACKSON e COCKCROFT, 2007).

O início da doença do edema é rápido, com alguns animais sendo encontrados mortos e sem sinais clínicos. A doença é caracterizada por edema cutâneo e subcutâneo causado por sorotipos hemolíticos como o O139 e O141. Sinais característicos incluem paresia posterior, tremores musculares, e edema de pálpebras e da face. O grunhido pode ser rouco devido ao edema de laringe e as fezes geralmente apresentam-se firmes. Paralisia flácida normalmente precede a morte. Aqueles que se recuperam têm, com frequência, disfunção neurológica residual, justificada pelo edema perivascular no sistema nervoso central. As taxas de mortalidade variam entre 30 e 90% (CARTER e WISE, 2004; QUINN et al., 2005).

Antibiograma e resistência antimicrobiana

O antibiótico não deve ser usado no lugar de outros métodos de diminuição do risco de doença. Fatores como nutrição, ambiente, higiene, manejo e vacinação devem sempre ser levados em conta. (JACKSON e COCKCROFT, 2007).

A susceptibilidade antimicrobiana pode ser definida qualitativamente como Sensível (S), que indica que a dose padrão do antibiótico deve ser apropriada para tratar a infecção pela cepa isolada; Resistente (R), que indica que a infecção causada pela cepa testada não deverá responder ao agente antimicrobiano; e Intermediário (I), onde as cepas são moderadamente susceptíveis ou moderadamente resistentes e indica que a cepa pode ser inibida por altas doses do antibiótico ou em locais onde o agente antimicrobiano se concentra, como a urina, por exemplo (COLLINS et al., 2004).

Testes de difusão em disco, que são discos de papel contendo quantidades conhecidas de antibióticos e que são aplicados à placas inoculadas com o

microrganismo testado, ainda são os métodos mais amplamente utilizados na rotina de laboratórios clínicos. Eles são relativamente baratos, tecnicamente diretos e confiáveis se corretamente padronizados (COLLINS et al., 2004).

Todo produto de origem animal deve ser livre de resíduos de antibióticos, bactérias zoonóticas resistentes e bactérias resistentes que possam transferir essa resistência à bactérias do ser humano (JACKSON e COCKCROFT, 2007).

O uso exacerbado de antibióticos na produção animal e na medicina humana pode facilitar a disseminação de genes de resistência antimicrobiana entre a população de bactérias (FRATAMICO et al., 2008), além de aumentar a chance da presença de resíduos de antibióticos nos produtos de origem animal, e a sérios riscos à saúde pública (MENIN et al., 2008).

O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos pode ser visto como um problema global na ecologia genética microbiana. É um problema muito complexo de se resolver devido à escala geográfica, à variedade de fatores do meio ambiente e ao enorme número e diversidade de participantes microbianos. A resposta dos microrganismos à ameaça de extinção têm sido encontrar rotas evolucionárias genéticas e bioquímicas que levem ao desenvolvimento de resistência ao antimicrobiano utilizado (BAHRANI-MOUGEOT e DONNENBERG, 2004).

Quanto ao uso de antimicrobianos, cepas de *E. coli* usualmente são sensíveis à gentamicina, amicacina, trimetoprim, sulfazotrim e ceftiofur, e resistentes à tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas, ampicilina e kanamicina (HIRSH e ZEE, 2003).

Identificação das *Escherichia coli* patogênicas

A identificação de infecções por *E. coli* patogênicas é confusa, pois muitos desses organismos existem como constituintes entéricos normais e podem ser encontradas na microbiota de animais clinicamente saudáveis (GREENE, 2006).

A idade, os sinais clínicos e a duração da doença podem sugerir o tipo de infecção e a categoria da doença. Amostras adequadas para identificação de *E. coli* causadoras de diarreias incluem material fecal de animais diarreicos. Essas amostras são levadas ao laboratório e cultivadas aerobicamente em ágar sangue e ágar MacConkey por 24 a 48 horas a 37°C. Testes bioquímicos devem ser feitos para

identificação das *Escherichia coli* (QUINN et al., 1994; QUINN et al., 2005). O SMAC pode ser utilizado para diferenciação das cepas de EHEC frente à outros patotipos (FIALHO, 2008).

Entretanto, somente o isolamento de *E. coli* a partir de amostras de fezes e conteúdo intestinal não é suficiente para o diagnóstico da enfermidade. Nesse sentido, as técnicas de sorotipificação, ELISA, imunofluorescência (IF) e PCR podem ser empregadas para a biotipificação de adesinas e toxinas (COSTA et al., 2006).

A diferenciação de *E. coli* em sorotipos é importante para diferenciar cepas patogênicas das não patogênicas e para investigações epidemiológicas. O teste baseia-se na detecção dos antígenos O e dos antígenos H. Os antígenos O correspondem à parte polissacarídica do LPS das enterobactérias. Podem ser perdidos por dois tipos de mutação: uma delas afeta a enzima responsável pela síntese do antígeno e a outra afeta a enzima que fixa o antígeno ao cerne do LPS. Os antígenos H são proteínas flagelares, denominadas flagelinas e, portanto, encontrados apenas em bactérias móveis (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). Atualmente existem 174 antígenos O (O1 a O181, com os grupos O 31, 47, 67, 72, 93, 94 e 122 removidos) e 53 antígenos H (H1 a H56, com os grupos H 13, 22 e 50 removidos) (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

Uma das formas de diagnóstico de *E. coli* diarreiogênicas é o ensaio de aderência em cultivo de células HEp-2 ou HeLa. Esses testes permitem a identificação do fenótipo A/E e padrões de aderência e invasão celular (NATARO e KAPER, 1998). A grande sensibilidade das células Vero à toxina Stx e a citotoxicidade observadas no cultivo dessa linhagem celular serve como diagnóstico de cepas de *E. coli* produtoras dessas toxinas (PATON e PATON, 1998).

A confirmação da patogenicidade da cepa de *E. coli* pode ser por análises fenotípicas ou genotípicas, sendo a análise fenotípica pela avaliação da produção de fímbrias de adesão, através de ELISA ou IF, utilizando-se anticorpos monoclonais. O ELISA requer cultivo da bactéria, mas a IF pode ser feita diretamente em esfregaços do intestino ou até mesmo de esfregaços do cultivo bacteriano. Um possível problema em utilizar organismos cultivados é que esses microrganismos nem sempre podem estar expressando as fímbrias, particularmente nos casos de 987P e F18, e também devido ao fato de que *E. coli* altamente encapsuladas como frequentemente observadas em

cepas K99, podem fornecer um resultado falso-negativo no ELISA. A análise genotípica pela PCR identifica fatores de virulência como fímbrias e toxinas, contornando o problema da não expressão gênica *in vitro* (FRANCIS, 1999). Kits de ELISA estão disponíveis para detectar fatores de virulência em *E. coli*, como o K88, K99, F41 e 987P (DEBROY e MADDOX, 2001).

E. coli diarreio gênicas estão entre os primeiros patógenos para os quais foram desenvolvidos métodos diagnósticos moleculares. Tais métodos são os mais confiáveis para diferenciar as cepas diarreio gênicas dos membros não-patogênicos da microbiota intestinal e para distinguir uma categoria da outra (NATARO e KAPER, 1998). Genes que codificam para fatores de virulência de *E. coli* têm sido encontradas em amostras ambientais ou em animais sadios do Brasil, sugerindo um potencial patogênico independente de estar causando ou não a doença clínica (COSTA et al., 2006).

Entretanto, a PCR também pode apresentar dificuldades. A simples detecção do gene ou do fragmento genômico através do aparecimento de banda no gel de agarose não necessariamente indica que o gene está sendo expresso como um fator de virulência. Quando múltiplos isolados de *E. coli* foram testados de um surto em um único rebanho não foi incomum para alguns isolados apresentarem um típico padrão de gene de virulência enquanto outros perderam os genes. Isso pode sugerir que a perda de genes de virulência não é incomum em ETEC. Se essa perda ocorre durante a infecção ou durante o cultivo *in vitro* não é sabido e genes codificados por plasmídios podem ser rapidamente disseminados em uma população bacteriana (FRANCIS, 1999).

Atualmente é difícil determinar até que ponto esses organismos estão implicados nas enfermidades transmitidas por alimentos em nível mundial. Provavelmente, sua implicação está subestimada, principalmente porque as técnicas de isolamento e caracterização de *E. coli* patogênicas não são apropriadas as análises microbiológicas de rotina (RODRÍGUEZ et al., 2009).

A análise de genes de toxinas específicas ou tipificação molecular deve ser feita para diferenciação entre os diferentes isolados e em adição a estudos genéticos, pois muitos dos genes identificados podem não estar sendo expressos pelo organismo isolado (GREENE, 2006).

OBJETIVOS

Geral

Isolar e caracterizar cepas de *Escherichia coli* produtoras de enterotoxinas em amostras de fezes de suínos hígidos em granjas comerciais e criatórios de subsistência do Distrito Federal.

Específicos

- Caracterizar bioquimicamente as bactérias da Espécie *Escherichia coli* isoladas de fezes de suínos;
- Detectar nas cepas de *E. coli* isoladas, através de PCR, a presença de genes de enterotoxinas termolábil I e II (LT-I e LT-II), termoestável a (STa) e Shiga-toxina 1 e 2 (Stx₁ e Stx₂);
- Definir um perfil de sensibilidade das bactérias isoladas frente aos antimicrobianos: Amicacina, Ampicilina, Cefalexina, Cloranfenicol, Doxiciclina, Enrofloxacina, Estreptomicina, Gentamicina, Lincomicina, Neomicina, Norfloxacina, Sulfonamidas, Sulfametoxazol + Trimetoprima e Tetraciclina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína: **Relatório Anual da ABIPECS**, 2009. Disponível em < http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2009_pt.pdf >.

BAHRANI-MOUGEOT, F. K.; DONNENBERG, M. S. Enteropathogenic bacteria In: **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. Amsterdam: Elsevier, 2004. 1149 p.

CARTER, G. R.; WISE, D. J. **Essentials of veterinary microbiology**. 6. ed. Iowa: Iowa State Press, 2004. 290p.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proc. R. Soc. Lond. B** 271: 1251–1262, 2004.

CHEN, X.; GAO, S.; JIAO, X.; LIU, X. F. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Eastern China. **Veterinary Microbiology**. Vol. 103: 13-20, 2004.

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. M.; FALKINHAM III, J. O. **Collins & Lyne's Microbiological Methods**. 8. ed. London: Arnold, 2004. 456p.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2a ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. 843 p.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras**. Vol. 26, No. 1: 5-8, 2006.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Review**. Vol. 1, No. 2: 129-140, 2001.

FIALHO, O. B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreio gênicas por PCR-multiplex**. Curitiba: UFPR, Setor de Ciências da Saúde, 2008. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

FRANCIS, D. H. Colibacillosis in pigs and its diagnosis. **Swine Health and Production**. Vol. 7, No. 5: 241-244, 1999.

FRATAMICO, P. M.; BHAGWAT, A. A.; INJAIAN, L.; FEDORKA-CRAY, P. J. Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from swine feces. **Foodborne Pathogens and Disease**. Vol. 5, No. 6: 827-838, 2008.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2006. 1387p.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2010. 643 p.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 464p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: **Produção da Pecuária Municipal**. Vol. 36. 51p. 2008.

JACKSON, P. G. G.; COCKCROFT, P. D. **Handbook of Pig Medicine**. Philadelphia: Saunders, 2007. 296p.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews: Microbiology**. Vol. 2: 123-140, 2004.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5. ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

LEDERBERG, J. E. *E. coli* K-12. **Microbiology Today**. Vol. 31: 116, 2004.

MACÊDO, N. R.; MENEZES, C. P. L.; LAGE, A. P.; RISTOW, L. E.; REIS, A.; GUEDES, R. M. C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Vol. 59, No. 5: 1117-1123, 2007.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, Vol. 38, No. 6: 1687-1693, 2008.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 11, No. 1: 142-201, 1998.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático**. 2.ed. Canoas: Ulbra, 2000. 237p.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 11, No. 3: 450-479, 1998.

PIGATTO, C. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) isoladas de bovinos de corte do estado do Paraná**. Jaboticabal: Unesp, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).

PUENTE, J. L.; FINLAY, B. B. Pathogenic *Escherichia coli*. In: **Principles of Bacterial Pathogenesis**. San Diego: Academic Press, 2001. 826 p.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe-Mosby, 1994. 648p.

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

RODRÍGUEZ, J. A. S.; JIMÉNEZ, S. S.; NAVARRO, R. M.; VILLAREJO, M. L. J. **Patógenos Emergentes en la Línea de Sacrificio de Porcino: Fundamentos de Seguridad Alimentaria**. Madrid: Diaz de Santos, 2009. 210p.

SIMIONATO, S.; VAZ, E. K.; MICHELON, A.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A. Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína. **Pesquisa Veterinária Brasileira** Vol. 25 No. 2: 84-90, 2005.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O.; MORENO, A. M.; ROEHE, P. M. **Clínica e Patologia Suína**. 2 ed. Goiânia, 1999. 464p.

SOUSA, C. P. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, Vol. 12, No. 3: 363-373, 2006.

STELLA, A. E. **Fatores de Virulência em Isolados de *Escherichia coli* Provenientes de Amostras de Água, Leite e Fezes de Bovinos Leiteiros da**

Região de Ribeirão Preto – SP, Brasil. Jaboticabal: Unesp, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009. 85 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária).

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 8, No. 5: 508-513, 2002.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 679p.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, Vol. 56: 4-8, 2007.

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**, Vol. 123: 145-152, 2007.

CAPÍTULO II

PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS EM CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE SUÍNOS HÍGIDOS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL

ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND DETECTION OF GENES FOR ENTEROTOXINS IN STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM HEALTHY SWINES ON DISTRITO FEDERAL, BRAZIL

Vinicius Oliveira Drummond¹; Simone Perecmanis²

¹ Mestrando em Saúde Animal, Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – DF

² Professor adjunto III da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – DF

INTRODUÇÃO

As doenças entéricas de etiologia bacteriana têm uma crescente importância nas diversas faixas etárias da suinocultura e possuem um grande impacto na indústria de produtos de origem suína em todo o mundo. Dentre essas bactérias, a *Escherichia coli* destaca-se como grande causadora de perdas na suinocultura (MENIN et al., 2008).

A *E. coli* está entre os microrganismos mais predominantes na microbiota do trato intestinal dos animais, podendo ser isolada de fezes de animais hígidos ou doentes. Enquanto a maioria não é patogênica, algumas adquiriram genes que podem ter importância na sua virulência frente aos animais (DEBROY e MADDOX, 2001).

Essas bactérias têm grande importância na suinocultura, podendo causar enterites e diarreias, resultando em mortalidades infecciosas em leitões. As *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) estão entre os agentes comumente isolados nesses casos (ALMEIDA et al., 2007).

Uma das estratégias mais adotadas na produção animal para prevenir e controlar as enterites e diarreias é a utilização de antimicrobianos. Entretanto, a utilização indiscriminada destes fármacos na medicina veterinária e humana tem determinado o aumento no aparecimento de bactérias multirresistentes. Isso acaba interferindo no tratamento efetivo das infecções por estes agentes e se tornando um risco à saúde pública (BACCARO et al., 2002).

Alguns pesquisadores vêm estudando cepas de *E. coli* isoladas a partir de fezes de suínos doentes à procura de fatores de virulência como fímbrias e toxinas (PARMA et al., 2000; VU-KHAC et al., 2004; MADOROBA et al., 2009) e de taxas de resistências a antibacterianos (HARADA et al., 2005; BOERLIN et al., 2005; WANG et al., 2010). No Brasil, poucos são os estudos realizados nesta linha de pesquisa (COSTA et al., 2006; MACÊDO et al., 2007; MENIN et al., 2008), e muito poucos estudos enfocam na frequência de fatores de virulência de *E. coli* isoladas a partir de suínos hígidos.

Dados sobre a prevalência de diarreias bacterianas em animais de produção no Distrito Federal são bastante escassos. Esses dados têm grande importância quando se pretende identificar e solucionar problemas sanitários e implantar nas unidades de produção suína programas de biossegurança (MENIN et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi verificar a existência de genes codificadores de enterotoxinas termolábil-I (LT-I), termolábil-II (LT-II), termoestável a (STa) e verotoxinas 1 (Stx₁) e 2 (Stx₂) em *Escherichia coli* isoladas de fezes de suínos hígidos de criatórios de subsistência e granjas comerciais do Distrito Federal, além de caracterizar bioquimicamente e avaliar o perfil fenotípico de resistência antibacteriana dessas bactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram obtidas amostras fecais de 109 suínos de ambos os sexos, diversas raças e com idades variando de 21 dias a um ano. As amostras foram obtidas de seis diferentes locais do Distrito Federal (Ceilândia, Gama, Paranoá, Planaltina, Recanto das Emas e São Sebastião), destacados na Figura 7. Todas foram obtidas diretamente da ampola retal dos animais, através de “swabs” estéreis e acondicionados em tubos contendo meios de transporte de Stuart, previamente identificados e concomitantemente à coleta de dados do animal. As amostras foram armazenadas em bolsa refrigerada até o transporte ao Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), onde foram processadas.

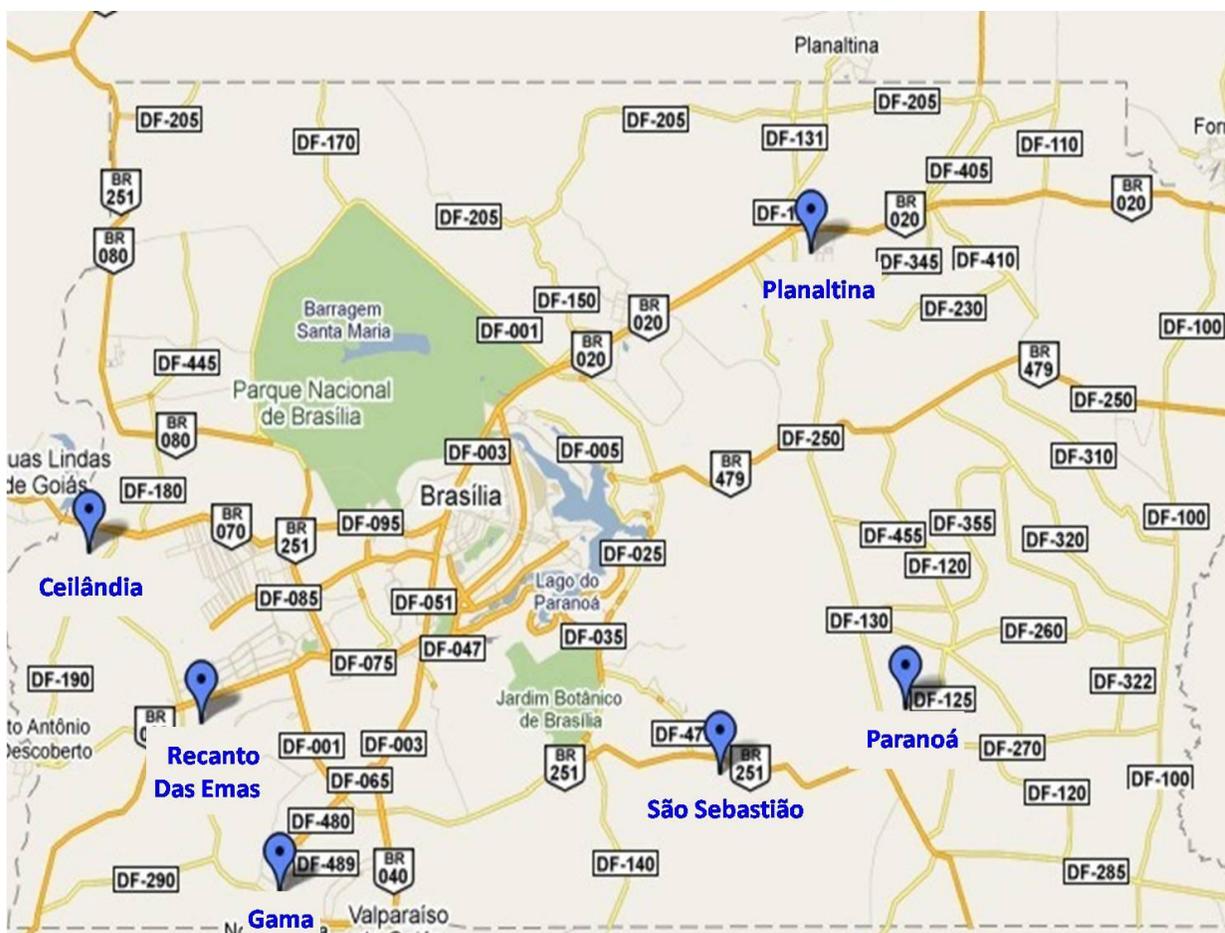


Figura 7 – O Distrito Federal e em destaque os locais de coleta deste trabalho (Fonte: Adaptado de Google Maps)

Isolamento e identificação bioquímica

Os “swabs” foram estriados em Placas de Petri contendo ágar MacConkey (Merck®), e incubados a 37°C por 24h. Após o período de incubação, as amostras que se apresentavam com coloração rósea, típica de fermentação de lactose nesse meio, foram repicadas em ágar sangue ovino 5% para verificação da presença de hemólise e identificação bioquímica. Cada colônia fermentadora recebia uma numeração sequencial de acordo com o número do animal (EC001, EC002,...) e, caso uma amostra apresentasse mais de uma colônia fermentadora, caracteristicamente distinta na mesma placa de Petri, cada uma das colônias recebia uma letra, além da numeração (A, B, C,...).

Todas as colônias foram testadas para os testes de Oxidação e Fermentação da glicose (O/F glicose), Indol, Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP), Citrato, Motilidade, Fenilalanina, Esculina, Nitrato, Gelatina, Triplo Açúcar e Ferro (TSI), Malonato, Descarboxilação de Ornitina, Lisina e Arginina e fermentação de Glicose (com pesquisa de produção de gás), Sacarose, Lactose, Ramnose, Rafinose, Xilose, Arabinose, Maltose, Manitol, Trealose, Salicina, Dulcitol e Sorbitol. Das cepas que foram identificadas como *Escherichia coli* foram feitos o antibiograma, para verificação do perfil antimicrobiano, e a extração do DNA, para pesquisa de genes de enterotoxina.

Perfil antimicrobiano

As colônias de *E. coli* foram inoculadas em caldo Müller-Hinton (Himedia®) e incubadas a 37°C até apresentar turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Foram então passadas em ágar Müller-Hinton (Bio-Rad®), segundo o método de Kirby-Bauer modificado, em recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). As cepas foram testadas para os seguintes antibióticos: Amicacina 30µg, Ampicilina 10µg, Cefalexina 30µg, Cloranfenicol 30µg, Doxiciclina 30µg, Enrofloxacina 5µg, Estreptomicina 10µg, Gentamicina 10µg, Lincomicina 2µg, Neomicina 30µg, Norfloxacina 10µg, Sulfazotrim (Sulfametoxazol + Trimetoprim) 25µg, Sulfonamidas 300µg e Tetraciclina 30µg. As placas foram incubadas a 37°C por 18h, sendo interpretado o halo de inibição após esse tempo, conforme tabela do CLSI (2010).

Detecção de genes de toxinas

As bactérias foram cultivadas em caldo infuso cérebro-coração (BHI) (Himedia®) a 37°C por 24h, e, após esse período, foram colocados 300µl do caldo em tubos Eppendorf® e levados à centrífuga (SIGMA® 2K15) por 15 minutos, a 13.000g, numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso em água destilada esterilizada e homogeneizado em vórtex. Os tubos foram levados ao banho-maria, 100°C por 10 minutos, para rompimento das células e liberação do DNA, e levados novamente à centrífuga por 15 minutos, 13.000g, 4°C. Após este processo o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta para utilização na PCR, segundo protocolo citado por Blanco et al. (1997).

As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 5µl do DNA extraído; 2,5µl de solução tampão (10X, pht®); 0,75µl de MgCl₂ (50mM, pht®); 1,25µl de dNTP (10 mM, Invitrogen®); 0,5µl de Taq DNA polimerase (5U/µl, pht®) e 0,5µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*) específico para enterotoxina (10 pmol/µl). A sequência de nucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplicons estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons

Toxina	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon (bp)
STa	5- TCCGTGAAACAACATGACGG -3 5- ATAACATCCAGCACAGGCAG -3	244
LT-I	5- TATCCTCTCTATATGCACAG -3 5- CTGTAGTGGAAAGCTGTTATA -3	480
LT-II	5- AGATATAATGATGGATATGTATC -3 5- TAACCCTCGAAATAAATCTC -3	300
Stx ₁	5- AGGTTGCAGCTCTCTTTCAATA -3 5- TGCAAACAATTATCCCCTGAG -3	364
Stx ₂	5- GGGCAGTTATTTTGCTGTGGA -3 5- GTATCTGCCTGAAGCGTAA -3	386

STa = toxina termoestável A; LT-I = toxina termoestável-I; LT-II = toxina termoestável-II; Stx₁ = toxina de Shiga 1; Stx₂ = toxina de Shiga 2; bp = pares de bases. **Fonte: Salvadori et al., 2004**

Esse mix foi colocado em um termociclador da marca BIO-RAD®, com cada enterotoxina sendo rodada em um ciclo específico, onde as etapas de desnaturação e extensão possuíam tempo e temperaturas comuns a todos os ciclos, com variações

apenas na etapa de anelamento, variando de acordo com a temperatura de anelamento de cada *primer*, conforme pode ser observado na Tabela 2 abaixo. Para cada reação, eram feitos testes com controles negativos, com água Mili-Q no lugar do DNA no preparado, e positivos, utilizando-se uma cepa sabidamente positiva para as enterotoxinas testadas, cedidas pelo professor Marcos Bryan Heinemann da Escola de Veterinária da UFMG.

Tabela 2 – Tabela de temperaturas e tempos utilizados na PCR

	Toxina	Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Comum a todos	Todas	Desnaturação	94°C	4 minutos	1 ciclo
	Todas	Desnaturação	94°C	1 minuto	30 ciclos
Individual (por toxina)	STa	Anelamento	59°C	2 minutos	30 ciclos
	LT-I	Anelamento	48°C	2 minutos	30 ciclos
	LT-II	Anelamento	48°C	2 minutos	30 ciclos
	Stx1	Anelamento	57°C	2 minutos	30 ciclos
	Stx2	Anelamento	59°C	2 minutos	30 ciclos
Comum a todos	Todas	Extensão	72°C	1 minuto	30 ciclos
	Todas	Extensão	72°C	10 minutos	1 ciclo

STa = toxina termoestável A; LT-I = toxina termoestável-I; LT-II = toxina termoestável-II; Stx₁ = toxina de Shiga 1; Stx₂ = toxina de Shiga 2.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese (Biotech[®]) em gel de agarose a 1%, pré-acrescido de Brometo de Etídio (5mg/ml) numa proporção de 1µl para cada 10 ml de agarose, testados junto a um padrão de peso molecular (*ladder*) Invitrogen[®] e visualizado em transiluminador de ultravioleta (UVP[®]), à procura das bandas com tamanhos conforme tabela vista acima.

RESULTADOS

Isolamento e identificação bioquímica

Do total de 109 amostras de fezes suínas foram isolados um total de 127 cepas de *E. coli*, pois algumas cepas apresentavam mais de uma colônia morfologicamente distinta, que foram identificadas com a numeração referente ao animal e com uma letra (A, B, C...). Todas as cepas foram testadas para identificação bioquímica e os

resultados foram condizentes com bactérias da Espécie *Escherichia coli*, seguindo-se tabelas de identificação de autores como Quinn et al. (1994), Oliveira (2000), Koneman et al. (2001) e Brooks et al. (2007).

Dentre as 127 cepas avaliadas para hemólise em ágar sangue, 66,1% (84/127) foram hemolíticas. Dessas hemolíticas, 5,9% (5/84) possuíam genes de enterotoxinas. Do total de oito cepas identificadas como possuidoras de genes de enterotoxinas, a hemólise foi notada em 62,5% (5/8).

As 127 cepas (100%) apresentaram-se fermentativas no teste de O/F glicose, positivas para as provas bioquímicas do Indol e VM e negativas para os testes de VP, Citrato, Fenilalanina, Ureia e Malonato.

Todas as cepas apresentaram-se no teste do TSI com o padrão a seguir: amarelas (fermentadoras) tanto na superfície quanto no fundo do ágar TSI e sem produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), mas quanto à produção de gás nesse teste, 44,1% das cepas produziram gás enquanto 55,9% não produziram.

Três cepas (2,4%) foram positivas para Esculina e na prova do Nitrato, quatro (3,1%) cepas foram negativas. No teste da gelatina foram obtidas 85% de cepas positivas para esse teste e no teste da motilidade apenas 47 das 127 (37%) cepas foram positivas.

Nos testes de descarboxilação de aminoácidos, verificou-se um resultado de 75,6% de positivos para arginina, 92,9% de positivos para lisina e 64,6% de positivos para ornitina, sendo que 60 cepas (47,2%) descarboxilaram os três aminoácidos e 100% descarboxilou pelo menos um aminoácido.

Quando foram analisados os testes de fermentação de açúcares, nove cepas (7,1%) utilizaram todos os açúcares testados. Ao serem avaliados individualmente, notou-se que todas as cepas (100%) foram capazes de fermentar Arabinose, Glicose, Lactose, Maltose, Manitol e Trealose. A maioria das cepas fermentou Ramnose (96,9%), Xilose (99,2%) e Sorbitol (91,3%). Para os demais açúcares testados, verificou-se que 59,8% das cepas foram positivas para Dulcitol, 44,1% das cepas foram positivas para Rafinose, 37,8% das cepas foram positivas para Sacarose e 37% das cepas foram positivas para Salicina. Todos os dados referentes à identificação bioquímica podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados dos testes bioquímicos realizados com as *E. coli*

Testes Bioquímicos	N° de cepas	Positivos	Negativos
Indol	127	100,0%	0,0%
Vermelho de Metila	127	100,0%	0,0%
Voges-Proskauer	127	0,0%	100,0%
Utilização de Citrato	127	0,0%	100,0%
Hemólise	127	66,1%	39,9%
Produção de H ₂ S no TSI	127	0,0%	100,0%
Produção de gás no TSI	127	44,1%	55,9%
Fenilalanina	127	0,0%	100,0%
Hidrólise de Uréia	127	0,0%	100,0%
Hidrólise de Esculina	127	2,4%	97,6%
Motilidade	127	37,0%	63,0%
Gelatinase	127	15,0%	85,0%
Redução de Nitrato	127	96,9%	3,1%
Malonato	127	0,0%	100,0%
Descarboxilação de Arginina	127	75,6%	24,4%
Descarboxilação de Lisina	127	92,9%	7,1%
Descarboxilação de Ornitina	127	64,6%	35,4%
Fermentação de Arabinose	127	100,0%	0,0%
Fermentação de Dulcitol	127	59,8%	40,2%
Fermentação de Glicose	127	100,0%	0,0%
Produção de gás na Glicose	127	89,0%	11,0%
Fermentação de Lactose	127	100,0%	0,0%
Fermentação de Maltose	127	100,0%	0,0%
Fermentação de Manitol	127	100,0%	0,0%
Fermentação de Rafinose	127	44,1%	55,9%
Fermentação de Ramnose	127	96,9%	3,1%
Fermentação de Sacarose	127	37,8%	62,2%
Fermentação de Salicina	127	37,0%	63,0%
Fermentação de Sorbitol	127	91,3%	8,7%
Fermentação de Trealose	127	100,0%	0,0%
Fermentação de Xilose	127	99,2%	0,8%
Oxidação/Fermentação (O/F)	127	100,0% fermentativos	

Avaliação de sensibilidade a antimicrobianos

Com o antibiograma foi possível traçar um perfil de sensibilidade das *E. coli*. Os antibióticos que tiveram uma maior porcentagem de *E. coli* sensíveis neste estudo foram a Norfloxacin (82,7%), Gentamicina (75,6%), e Sulfazotrim (63%). Outros antibióticos que apresentaram sensibilidade elevada foram a Enrofloxacin (58,3%), Cloranfenicol (56,7%), Estreptomicina (53,5%), Amicacina (46,5%) e Neomicina (39,4%).

Ao avaliar a resistência das bactérias aos antibióticos, pôde-se observar que os que apresentaram uma maior resistência foram Lincomicina, com 100% de resistentes, Sulfonamidas, com 74,8% de resistentes, Tetraciclina, com 70,1% de resistência, Doxiciclina, com 66,1% e Ampicilina, com 51,2%. A Cefalexina teve a mesma porcentagem de cepas resistentes e sensíveis (33,9%)

Ao avaliar cada cepa, pôde-se observar que todas foram resistentes a pelo menos um antibiótico, 47 (37,0%) apresentaram resistência a mais da metade dos antibióticos testados e quatro (3,2%) não apresentaram sensibilidade a nenhum dos antibióticos testados. Destas quatro, apenas uma cepa (EC108) apresentou o gene para STa.

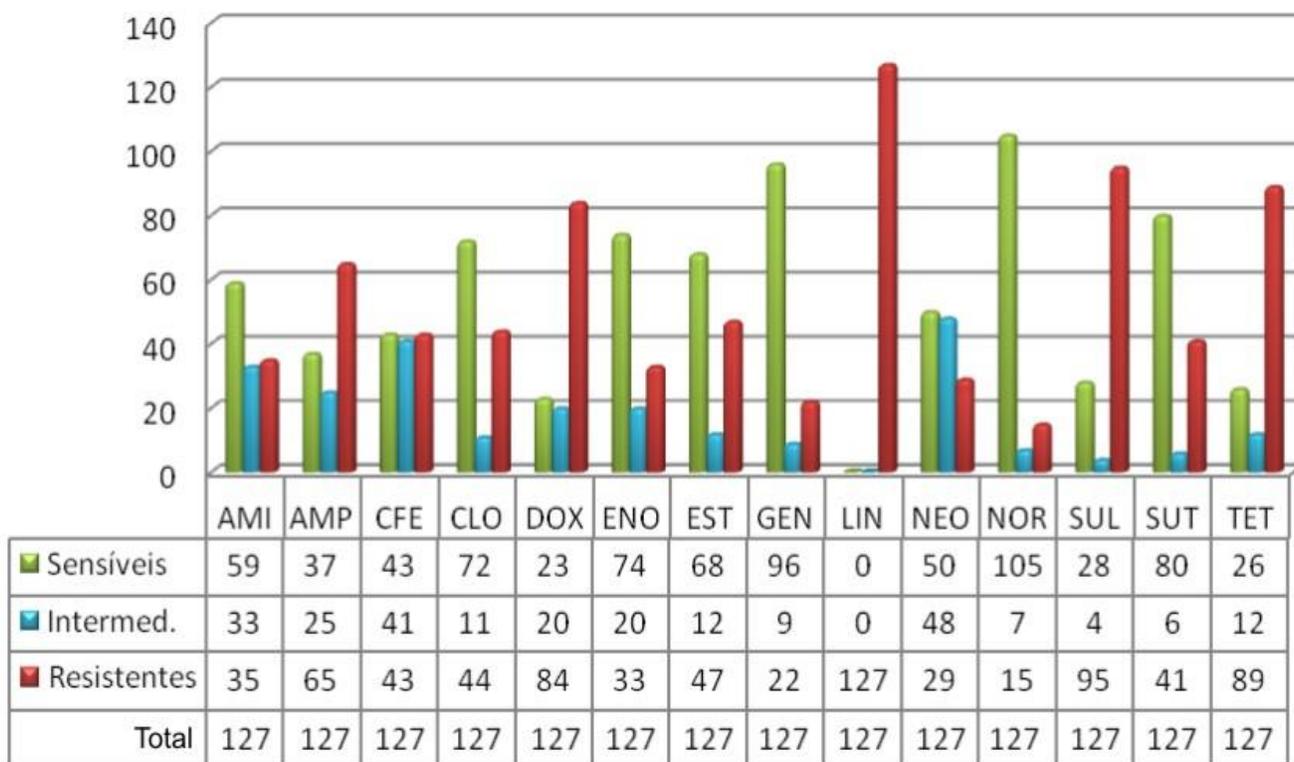
As porcentagens aos antibióticos podem ser vistas na Tabela 4, e no Gráfico 1

Tabela 4 – Porcentagens de resistência aos antimicrobianos testados

Antibiótico	Resistentes*	Intermediários*	Sensíveis*
Amicacina (30µg)	27,6%	25,9%	46,5%
Ampicilina (10 µg)	51,2%	19,7%	29,1%
Cefalexina (30 µg)	33,9%	32,2%	33,9%
Cloranfenicol (30 µg)	34,6%	8,7%	56,7%
Doxiciclina (30 µg)	66,1%	15,8%	18,1%
Enrofloxacin (5 µg)	26,0%	15,7%	58,3%
Estreptomicina (10 µg)	37,0%	9,5%	53,5%
Gentamicina (10 µg)	17,3%	7,1%	75,6%
Lincomicina (2 µg)	100,0%	0,0%	0,0%
Neomicina (30 µg)	22,8%	37,8%	39,4%
Norfloxacin (10 µg)	11,8%	5,5%	82,7%
Sulfonamidas (300 µg)	74,8%	3,2%	22,0%
Sulfazotrim (25 µg)	32,3%	4,7%	63,0%
Tetraciclina (30 µg)	70,1%	9,4%	20,5%

* A porcentagem está calculada em cima do total de 127 cepas testadas

Gráfico 1 – Perfil de resistência de *E. coli* isoladas



AMI (Amicacina); AMP (Ampicilina); CFE (Cefalexina); CLO (Cloranfenicol); DOX (Doxiciclina); ENO (Enrofloxacina); EST (Estreptomicina); GEN (Gentamicina); LIN (Lincomicina); NEO (Neomicina); NOR (Norfloxacina); SUL (Sulfonamidas); SUT (Sulfametoxazol + trimetoprim); TET (Tetraciclina).

Genes codificadores de enterotoxinas

Todas as cepas foram testadas para presença de genes de enterotoxinas, através de PCR, observando-se um total de 6,3% (8/127) de bactérias possuindo genes para enterotoxinas. Os genes detectados foram o STa e o LT-I, com três cepas positivas somente para STa (2,4%) e quatro cepas possuindo apenas o gene para LT-I (3,2%). Uma cepa (0,8%), a EC029A, possuía genes para essas duas toxinas. Esse resultado pode ser visto na Figura 8, que mostra a eletroforese em gel de agarose com as bandas referentes à amplificação de genes de enterotoxinas. Nenhuma cepa foi positiva para as demais toxinas testadas (LT-II, Stx₁ e Stx₂).

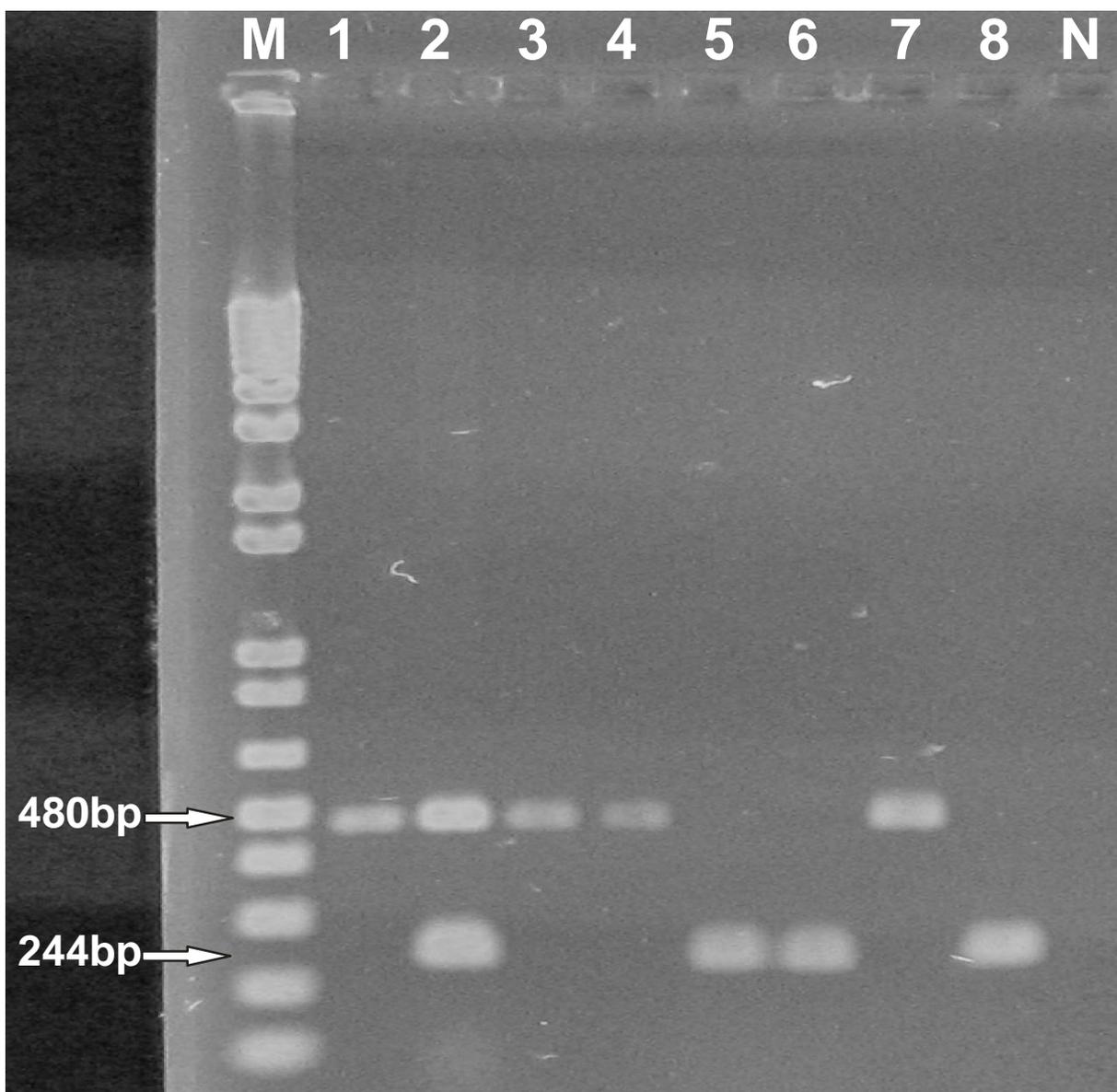


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação dos genes. M (Marcador de peso molecular); 1 (EC027); 2 (EC029A); 3 (EC030); 4 (EC040); 5 (EC051A); 6 (EC076); 7 (EC099); 8 (EC108); N (Controle negativo); bp (Pares de bases).

A Tabela 5 informa o número da cepa, qual o gene identificado, a presença ou não de hemólise e o perfil de resistência aos antibióticos testados a cada uma das cepas que foram positivas para genes de enterotoxina.

Tabela 5 – Número da cepa de *E. coli* com o gene identificado, presença de hemólise e perfil de resistência antimicrobiana

Cepa	Gene	Hem.	AMI	AMP	CFE	CLO	DOX	ENO	EST	GEN	LIN	NEO	NOR	SUL	SUT	TET
EC027	LT-I	Neg	R	S	I	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S
EC029A	STa/LT-I	Pos	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S
EC030	LT-I	Neg	S	R	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
EC040	LT-I	Neg	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
EC051A	STa	Pos	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R
EC076	STa	Pos	S	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
EC099	LT-I	Pos	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
EC108	STa	Pos	I	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R

Hem. (Hemólise); Pos (Positiva); Neg (Negativa); STa (Toxina termoestável A); LT-I (Toxina termolábil-I); R (Resistente); S (Sensível); I (Intermediário); AMI (Amicacina); AMP (Ampicilina); CFE (Cefalexina); CLO (Cloranfenicol); DOX (Doxiciclina); ENO (Enrofloxacina); EST (Estreptomicina); GEN (Gentamicina); LIN (Lincomicina); NEO (Neomicina); NOR (Norfloxacina); SUL (Sulfonamidas); SUT (Sulfametoxazol + Trimetoprim); TET (Tetraciclina)

Observou-se que todas as cepas que possuíam genes foram resistentes a pelo menos dois antibióticos e que 50% foram resistentes a mais da metade dos antimicrobianos testados. Das quatro cepas com gene e multirresistentes, três foram isoladas da mesma propriedade, uma suinocultura industrial. Das cepas isoladas que continham genes para enterotoxinas, três foram isoladas de três animais da mesma propriedade, um produtor com poucos recursos, que cria animais para subsistência em situação precária.

DISCUSSÃO

Cepas clínicas e comensais de *E. coli* isoladas de espécies animais, com ou sem sinais clínicos de doença, têm sido demonstradas como possuidoras de extrema diversidade na composição genética (CHAPMAN et al., 2006), o que pode ser observado também neste trabalho.

Quando se compara os resultados obtidos no presente trabalho no que se refere à identificação bioquímica das cepas de *E. coli*, não foram observadas grandes discrepâncias em relação às tabelas de identificações encontradas em livros de identificação laboratorial, como Quinn et al. (1994), Oliveira (2000), Koneman et al. (2001) e Brooks et al. (2007).

Madoroba et al. (2009) testando e identificando bioquimicamente cepas de *E. coli* isoladas de suínos no Zimbábue afirmaram que todas as suas cepas foram positivas para o Indol e VM e negativas para o Citrato, Ureia e produção de H₂S, dados confirmados nesse estudo. Entretanto estes autores observaram que as cepas de *E. coli* isoladas foram positivas para Lisina e Motilidade, o que diferiu um pouco deste trabalho, que encontrou cepas negativas em 7,1% e 63%, respectivamente.

A baixa quantidade de cepas positivas para o teste da motilidade neste estudo demonstra uma quantidade baixa de *E. coli* possuidoras de flagelos, estrutura que pode favorecer a invasão da bactéria nos organismos (QUINN et al., 2005). Resultados como os vistos nos testes da Esculina e do Nitrato, que tiveram poucas cepas divergindo dos resultados comumente observados na literatura (QUINN et al., 1994; OLIVEIRA, 2000; BROOKS et al., 2007) atentam para o fato de que os resultados vistos em tabelas de identificação trabalham em cima de porcentagens, devendo o microbiologista ficar atento à esses resultados diferentes na hora de identificar microrganismos.

Alguns estudos têm relatado que plasmídios podem conferir um fenótipo citrato-positivo em *E. coli* (HARNETT et al., 1996). Neste estudo nenhuma cepa mostrou-se capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono, diferentemente do encontrado por Moreira (2007) que obteve duas cepas de *E. coli* Citrato positivas, oriundas de bovinos. Harnett et al. (1996) também encontraram cepas de *E. coli* produtoras de H₂S, o que não foi observado neste estudo.

Foi possível observar grandes variações na utilização de alguns aminoácidos e carboidratos, o que é comum, pois conforme citado anteriormente as tabelas de identificação trabalham sempre em cima de porcentagens, como Quinn et al. (1994), Oliveira (2000), Koneman et al. (2001) e Brooks et al. (2007).

Zhang et al. (2007) estudando *E. coli* isoladas de animais com diarreia encontraram 64,3% de cepas hemolíticas, valor semelhante ao encontrado nesse

estudo, que foi de 66,1%. Martins et al. (2000) comparando suínos doentes e hígidos não acharam cepas hemolíticas entre os animais hígidos, somente nos animais diarreicos, o que não foi visto nesse estudo, que achou cepas comensais apresentando hemólise. Alguns autores defendem que a presença de hemólise é um fator determinante na virulência da *E. coli* (PUENTE e FINLAY, 2001; HIRSH e ZEE, 2003), enquanto outros discordam, sugerindo que a hemólise parece não contribuir de forma direta para a virulência (CHEN et al., 2004; QUINN et al., 2005). Isto pôde ser observado neste estudo, pois nem todas as cepas que foram hemolíticas possuíam genes de enterotoxinas e vice-versa. Como não foram testados outros fatores de virulência neste estudo, essas cepas hemolíticas não possuidoras de genes para enterotoxinas podem apresentar genes que codificavam algum outro fator de virulência, sendo necessário um aprofundamento no estudo das cepas isoladas.

A totalidade de cepas resistentes à Lincomicina encontrada neste estudo foi relatada em um estudo com *Streptococcus suis* sorotipo 2 isolados de suínos abatidos no Mato Grosso (OLIVEIRA et al., 2008). Valores próximos aos encontrados neste trabalho em trabalhos com *E. coli* foram relatados por Macêdo et al. (2007) em Minas Gerais, que acharam uma porcentagem de resistência à Lincomicina de 84,21% em suínos diarreicos e o realizado por Menin et al. (2008) que, estudando suínos com diarreia em Santa Catarina, acharam 76,1% de *E. coli* resistentes a este antibiótico.

Neste trabalho verificou-se um alto índice de bactérias com multirresistência aos antimicrobianos testados. Todas as cepas foram resistentes a pelo menos um antibiótico, que está condizente com os trabalhos de Costa et al. (2006) e Carvalho et al. (1991), que também identificaram cepas com altas taxas de resistência. Brito e Tagliari (2000) encontraram 79% de resistência à Sulfonamidas e 80% à Tetraciclina em um estudo com 66 leitões diarreicos no sudoeste do Paraná, valores próximos aos encontrados neste estudo (74,8% e 70,1%, respectivamente). Entretanto esses autores encontraram uma porcentagem de 92% de resistência ao Cloranfenicol, dado esse que difere do encontrado neste trabalho, onde se obteve 34,6% de resistência a este mesmo antibiótico. Os resultados observados neste estudo também estão de acordo com Hirsh e Zee (2003), que afirmam que cepas de *E. coli* usualmente são resistentes à Sulfonamidas, Tetraciclina, Estreptomicina, Ampicilina e Kanamicina. Essa resistência

pode estar relacionada à utilização em larga escala de antibióticos como Lincomicina, Tetraciclina e Sulfonamidas no tratamento e profilaxia de diarreias e como facilitadores de crescimento, além de poder estar relacionada à presença de plasmídios, onde se localizam genes que promovem resistência a determinados antibacterianos (BACCARO et al., 2002).

Os antibióticos que tiveram maiores índices de sensibilidade neste estudo foram a Norfloxacin (82,7%), Gentamicina (75,6%) e Sulfazotrim (63,0%). Esses dados também estão de acordo com Hirsh e Zee (2003) que afirmam que *E. coli* normalmente são sensíveis a Gentamicina, Amicacina, Trimetoprim, Sulfazotrim e Ceftiofur e de acordo com Brito e Tagliari (2000) em estudo com leitões com diarreia no Paraná também observaram taxas de sensibilidade altas para Gentamicina (94%) e Sulfazotrim (52%), mas com Neomicina (88%) e Ácido Nalidíxico (82%) entre os mais sensíveis. A Neomicina nesse estudo apresentou uma porcentagem de sensibilidade de 39,4%. Costa et al. (2006) na região sul do Brasil também encontraram a Norfloxacin entre os antibióticos mais sensíveis (79,2%), assim como a Gentamicina (54,7%), a Enrofloxacin (75,5%) e o Cloranfenicol (54,7%), dados próximos aos encontrados nesse estudo. Entretanto estes autores notaram uma taxa de sensibilidade ao Sulfazotrim de apenas 26,4%, bem aquém ao valor encontrado nesse estudo, que foi de 63%. As diferenças entre os estudos podem ser devido a variações regionais, pois a metodologia utilizada em ambos os estudos foi a mesma, a de difusão em disco.

Genes codificadores de enterotoxinas são comumente isolados em casos de suínos com diarreia, principalmente aqueles que codificam as toxinas termolábeis, termoestáveis e verotoxinas (FRATAMICO et al., 2008). Madoroba et al. (2009) encontraram genes para enterotoxinas em suínos diarreicos em estudo feito no Zimbábue, em porcentagens relativamente altas de STa (18,4%), STb (31,6%), LT (32,7%), Stx_{2e} (17,3%) e encontraram cepas com mais de um gene, como no caso de 11% de cepas que continham associação entre STa, LT e STb. Em estudo feito no Brasil, também com animais doentes, Costa et al. (2006) também acharam altas prevalências de cepas contendo genes para enterotoxinas, com 50% de cepas possuindo STb, 35% de STa, 35% de LT e 7,5% de Stx. Esses dois autores testaram as cepas para genes codificadores de outros fatores de virulência, como fímbrias, o que

não foi feito nesse estudo. Essas diferenças de prevalência observadas quando comparamos os estudos feitos com este estudo, provavelmente sejam devido ao fato deste ter sido feito com suínos hígidos, ao invés de diarreicos. Resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo, mesmo tendo sido feitos em animais com diarreia e através de identificação da toxina ao invés do gene, podem ser vistos no trabalho de Carvalho et al. (1991) que obtiveram resultados de 3% de cepas produtoras de STa e 5% produtoras de LT.

No Distrito Federal, Arruda et al. (2008) isolaram cepas de *E. coli* causando colibacilose pós desmame em suínos e encontraram uma cepa (1/15) possuidora do gene da toxina termolábil-II (LT-II), o que não foi verificado nesse trabalho, que isolou genes para a LT-I, mas não para a LT-II. Essa diferença pode ser devido ao fato de que o estudo de Arruda et al. foi realizado com animais diarreicos, enquanto neste trabalho foram testadas amostras provenientes de animais hígidos.

Comparando estudos feitos em animais hígidos à procura de fatores de virulência, Schierack et al. (2006) encontraram 68,6% de cepas contendo pelo menos um gene de virulência. Cepas contendo apenas gene para STa somaram 8,5% e somente LT-I, 3,9%. Ao contabilizar cepas contendo mais de um gene para fator de virulência, observaram 24 perfis de associações entre genes, o que aumenta a porcentagem de genes de STa e LT-I encontrados para 29,6% e 19,6%, respectivamente, no total de cepas isoladas. Schierack et al. (2007) identificando enterobactérias no trato intestinal de suínos hígidos, encontraram 53,3% de cepas de *E. coli* possuindo genes de enterotoxinas, com dois animais (13,3%) contendo *E. coli* com genes para STa, três animais (20%) para STb e um animal (6,7%) contendo *E. coli* possuidora de genes para STa e STb. Essa diferença encontrada pode ser devido à metodologia de isolamento utilizada por esses autores, onde de cada animal foram isoladas e pesquisadas individualmente dez colônias de *E. coli*, para detecção de clones que possuíssem os genes pesquisados, metodologia essa diferente da deste estudo. Entretanto a metodologia utilizada neste estudo mostrou-se eficaz na capacidade de amplificar genes presentes em *E. coli* isoladas de fezes suínas. Outro fator que pode ter contribuído para o baixo número de cepas encontradas com genes nesse estudo foi o fato de, por serem coletas em propriedades aleatórias e muitas

vezes de subsistência, não foi possível ter controle sobre a utilização de antibióticos à véspera da colheita das fezes, o que pode alterar a microbiota intestinal.

Foi observado neste estudo que todas as cepas com genes para enterotoxinas apresentaram resistência a, no mínimo, dois antibióticos e que metade apresentou resistência a mais da metade dos antibióticos. Três cepas que se apresentaram multirresistentes foram isoladas de uma mesma propriedade, uma suinocultura industrial, o que talvez possa ser justificado pelo costume da utilização comum de antimicrobianos para prevenção e favorecimento de crescimento na produção em larga escala quando comparada com a suinocultura de subsistência (WANG et al., 2010). Outras três cepas com genes de enterotoxina foram isoladas de três animais de uma mesma propriedade, um produtor com poucos recursos, que cria animais para subsistência em situação precária o que pode ser um fator de risco à saúde humana e de outros animais, pois tais cepas podem atingir comunicantes (MARTINS et al., 2000).

Wang et al. (2010) em seus estudos fizeram associações entre genes de virulência e fenótipo de resistência antimicrobiana, encontrando cepas de *E. coli* resistentes ao Ceftiofur e possuindo genes para a fímbria F4 e AIDA-I (Adesinas Envolvidas na Adesão Difusa) e observaram não existir relação entre cepas resistentes à Doxiciclina e presença de gene para toxina Stx_{2e} e entre cepas resistentes à Kanamicina e presença de genes para toxina Stx_{2e} e AIDA-I. Estes autores encontraram correlação estatística nos seus resultados, baseando-se no fato de que existem plasmídios como o pCG86 que incluem genes de resistência a Sulfadiazina, Estreptomicina e Tetraciclina e têm sido associados à expressão de toxinas ST e LT em cepas de suínos.

Resultado semelhante também foi observado por Boerlin et al. (2005), que encontraram maiores associações entre cepas de *E. coli* contendo genes para resistência à Tetraciclina e para produção da toxina STa e entre genes de resistência à Tetraciclina e genes que codificam a proteína PAA-1. Essas associações poderiam ser confirmadas pelo achado de cepas de ETEC no Canadá possuindo o plasmídio pTENT2, que aglomera genes *tetA*, *estA*, *paa-1* e *sepA-1*.

CONCLUSÕES

No presente estudo foram identificadas cepas de *E. coli* oriundas de fezes de suínos hígidos possuidoras de genes codificadores das enterotoxinas STa e LT-I, não tendo sido observada a presença de genes para LT-II, Stx₁ e Stx₂. Foi observado também um alto percentual de cepas resistentes aos antibióticos testados, principalmente à Lincomicina, onde 100% das cepas foram resistentes. O achado de genes codificadores de enterotoxinas e a multirresistência de cepas de *E. coli* em amostras de suínos que não apresentam sinais clínicos de diarreia têm importância no risco que esses animais têm de desenvolver colites e diarreias e de transmiti-las para animais mais susceptíveis. O risco de transmissão de bactérias com fatores de virulência para o homem, principalmente em casos onde a criação do suíno é de subsistência, sem muitas condições higiênico-sanitárias, como observado neste estudo, também deve ser levado em conta.

No Distrito Federal, dados que abordem genes de virulência em isolados de *E. coli* em suínos são bastantes escassos, sendo importante este estudo para a publicação de pesquisas desse tipo na região, e sua importância para a criação de suínos. Entretanto ainda são necessários mais estudos acerca do tema para uma melhor compreensão do assunto, além do fato de que devem ser realizadas pesquisas de outros fatores de virulência e identificação da sorotipificação nas cepas deste trabalho, para tentar associar estatisticamente genes de fatores de virulência e sorotipo, além de identificar possíveis sorotipos/patotipos presentes em suínos no Distrito Federal.

APROVAÇÃO POR COMITÊ DE ÉTICA

Esse trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, tendo sido aprovado sob número de UnBDOC 59523/2009.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Professor Marcos Bryan Heinemann, da Escola de Veterinária da UFMG.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. S.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; MALUTA, R. P.; ÁVILA, F. A. Diarreia suína: Estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto – SP, Brasil. **Ars Veterinaria**. Vol. 23, No. 3: 151-157, 2007.

ARRUDA, L. F. YASUNAGA, K. L.; TOCANTINS, B. B.; ARAÚJO, P. C.; SANTOS, R. S. T.; OLIVEIRA, V. H. S. de; OLIVEIRA, P. H. S. de; PERECMANIS, S. Detecção de genes de toxinas de *Escherichia coli* em surto de colibacilose em rebanho suíno em propriedade do DF. In 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet), 2008, Gramado. **Anais...**, 2008.

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 diarreia. **Arq. Inst. Biol.** Vol. 69, No. 2: 15-18, 2002.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M. P.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**. Vol. 54: 309-319, 1997.

BOERLIN, P.; TRAVIS, R.; GYLES, C. L.; REID-SMITH, R.; JANECKO, N.; LIM, H.; NICHOLSON, V.; McEWEN, S. A.; FRIENDSHIP, R.; ARCHAMBAULT, M. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **App. Environ. Microbiol.** Vol. 71, No. 11: 6753-6761, 2005.

BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia após o desmame. **Braz. Arch. Biol. Technol.** [online] Vol. 43, No. 1, 2000.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology**. 24ed. New York: McGraw-Hill, 2007. 818p.

CARVALHO, A. C. F. B.; AVILA, F. A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; QUINTANA, J. L.; ALBERTINI, P. E. G. Virulence factors in *Escherichia coli* strains

isolated from pigs in the Ribeirão Preto region, state of São Paulo, Brazil. **Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.** Vol. 44, No. 1: 49 – 52, 1991.

CHAPMAN, T. A.; WU, X.-Y.; BARCHIA, I.; BETTELHEIM, K. A.; DRIESEN, S.; TROTT, D.; WILSON, M.; CHIN, J. J.-C. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. **Applied and Environmental Microbiology.** Vol. 72, No. 7: 4782 – 4795, 2006.

CHEN, X.; GAO, S.; JIAO, X.; LIU, X.F. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Eastern China. **Veterinary Microbiology.** Vol. 103: 13-20, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI).
Disponível em <www.clsi.org>. Acesso em: 10/12/2010.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** Vol. 26, No. 1: 5-8, 2006.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Review.** Vol. 1, No. 2: 129-140, 2001.

FRATAMICO, P. M.; BHAGWAT, A. A.; INJAIAN, L.; FEDORKA-CRAY, P. J. Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from swine feces. **Foodborne Pathogens and Disease.** Vol. 5, No. 6: 827-838, 2008.

HARADA, K.; ASAI, T.; KOJIMA, A.; ODA, C.; ISHIHARA, K.; TAKAHASHI, T. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** Vol. 67, No. 10: 000-1003, 2005.

HARNETT, N.; MANGAN, L.; BROWN, S.; KRISHNAN, C. Thermosensitive transfer of antimicrobial resistances and citrate utilization and cotransfer of hydrogen sulfide production from an *Escherichia coli* isolate. **Bacteriology.** Vol. 24: 173-178, 1996.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária.** 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 464p.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5. ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

MACÊDO, N. R.; MENEZES, C. P. L.; LAGE, A. P.; RISTOW, L. E.; REIS, A.; GUEDES, R. M. C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Vol. 59, No. 5: 1117-1123, 2007.

MADOROBA, E.; VAN DRIESSCHE, E.; DE GREVE, H.; MAST, J.; NCUBE, I.; READ, J.; BEECKMANS, S. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence genes from scouring piglets in Zimbabwe. **Trop. Anim. Health Prod.** Vol. 41: 1539-1547, 2009.

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

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, Vol. 38, No. 6: 1687-1693, 2008.

MOREIRA, H. O. M. **Isolamento de *Escherichia coli* ácido-resistentes em fezes de bovinos submetidos à dieta de volumoso e concentrado**. Brasília: UnB, Depto. de Nutrição, 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana).

OLIVEIRA, J. T.; SILVA, G. F. R.; PAULA, D. A. J.; CARDOSO, R. L.; JÚNIOR, J. G. C.; COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Prevalência e sensibilidade aos antimicrobianos de *Streptococcus suis* sorotipo 2 em suínos abatidos em Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinarie**. Vol. 36, No. 2: 95 – 100, 2008.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático**. 2. ed. Canoas: Ulbra, 2000. 237p.

PARMA, A. E.; SANZ, M. E.; VIÑAS, M. R.; CICUTA, M. E.; BLANCO, J. E.; BOEHRINGER, S. I.; VENA, M. M.; ROIBON, W. R.; BENITES, M. C.; BLANCO, J.;

BLANCO M. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. **Veterinary Microbiology**. Vol. 72: 269-276, 2000.

PUENTE, J. L.; FINLAY, B. B. Pathogenic *Escherichia coli*. In: **Principles of Bacterial Pathogenesis**. San Diego: Academic Press, 2001. 826 p.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe-Mosby, 1994. 648p.

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

SALVADORI, M. R.; VALADARES, G. F.; LEITE, D. S.; BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 34: 230-235, 2003.

SCHIERACK, P.; STEINRÜCK, H.; KLETA, S.; VAHJEN, W. Virulence Factor Gene Profiles of *Escherichia coli* Isolates from Clinically Healthy Pigs. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 72, No. 10: 6680 – 6686, 2006.

SCHIERACK, P.; WALK, N.; REITER, K.; WEYRAUCH, K. D. Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs. **Microbiology**. Vol. 153: 3830 – 3837, 2007.

VU-KHAC, H.; HOLODA, E.; PILIPČINEC, E. Distribution of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets in the Slovak Republic. **J. Vet. Med.** Vol. 51: 343-347, 2004.

WANG, X.; JIANG, H.; LIAO, X.; LIU, J.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; JIANG, Z.; LÜ, D.; XIANG, R.; LIU, Y. Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from diseased pigs. **FEMS Microbiol. Lett.** Vol. 306: 15-21, 2010.

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**. Vol. 123: 145 – 152, 2007.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Casos de diarreias e enterocolites na suinocultura são frequentes e se tornam um fator limitante no desenvolvimento do animal, podendo levar à morte. Podem também servir como fonte de contaminação da carne suína na hora do abate, o que serve como risco de toxi-infecção ao homem.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a existência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes de suínos hígidos portando genes codificadores para enterotoxinas termoestável (STa) e termolábil I (LT-I). Não foram amplificados genes para a enterotoxina termolábil II (LT-II) nem para as toxinas de Shiga (Stx₁ e Stx₂). Esse resultado mostra o risco de suínos hígidos servirem como reservatórios de cepas de *E. coli* que tem potencial para se tornarem virulentas. O animal pode vir a desenvolver uma colite ou diarreia ou servir como fonte de infecção destas cepas a outros animais, comprometendo todo o rebanho. O homem pode ser também acometido por estas cepas potencialmente virulentas, o que poderia causar danos à saúde pública.

A alta taxa de resistência aos antibióticos vista nesse estudo demonstra uma tendência mundial ao isolamento de bactérias multirresistentes, o que muitas vezes se deve ao fato da utilização indiscriminada de antibióticos por produtores ou por veterinários que utilizam estes fármacos como profiláticos e como promotores de crescimento na produção ou os utilizam como tratamento, mas sem a realização de

exames para identificar o real agente da diarreia e a quais fármacos possui sensibilidade.

Apesar dos resultados positivos encontrados, é necessário um aprofundamento acerca deste tema em estudos futuros com o intuito de identificar cepas de *E. coli* que possuam genes de virulência. Um controle da resistência aos antimicrobianos também deve ser feito para monitorar bactérias multirresistentes. Outros fatores de virulência e a sorotipificação devem ser pesquisados nas cepas isoladas neste estudo para que se verifique uma possível associação entre genes de enterotoxinas, fímbrias sorotipos/patotipos observados.