

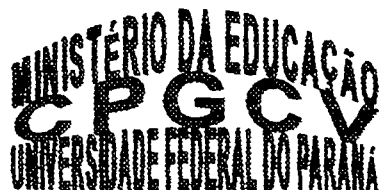
CYBELLE DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DOS ANTÍGENOS SOMÁTICOS E
PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE SUÍNOS COM DIARRÉIA
NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinária, Área de
Concentração: Patologia, Setor de Ciências
Agrárias. Universidade Federal do Paraná,.

Orientador: Prof. Dr. Waldir Hamann

CURITIBA
2000




PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **CYBELLE DE SOUZA** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada "**CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DOS ANTÍGENOS SOMÁTICOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE SUÍNOS COM DIARRÉIA NO ESTADOS DO PARANÁ**" foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito "A" concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 27 de junho de 2000.


Prof. Dr. WALDIR HAMANN
Presidente/Orientador


Prof. Dr. LUIZ MÁRIO FEDALITTO
Membro


Prof. Dr. JOÃO CAETANO FORTES
Membro

Dedico este trabalho a um grande
amigo que tenho

AGRADECIMENTOS

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR,

À Soraya Carmignam que sempre se prontificou a ajudar-me na elaboração das tabelas,

Ao Marcos Vinicius por sua participação ao elaborar gráficos que irão abrilhantar a apresentação do trabalho,

Às bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas da UFPR Izabella Fernandes e Telma Stresser de Assis pela orientação na busca de referências bibliográficas,

Ao Professor Domingos S. Leite da Unicamp pela colaboração na identificação das cepas investigadas,

À Sonia Biesdorf do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti que gentilmente me forneceu a maior parte das cepas incluídas neste trabalho,

Ao meu orientador Professor Waldir Hamann que me transmitiu tranquilidade e muito apoio durante a realização deste trabalho,

Ao Professor José Francisco G. Warth cujo entusiasmo pela busca do conhecimento tem sido o grande incentivo para minha vida profissional, e

A todos os que torceram para que este trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	vi
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
	RESUMO	vii
	ABSTRACT	viii
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	ASPECTOS GERAIS DA COLIBACILOSE SUÍNA	3
2.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DA <i>Escherichia coli</i>	4
2.3	FATORES GERAIS DE VIRULÊNCIA DA <i>Escherichia coli</i>	8
2.4	CLASSIFICAÇÃO PATOGÊNICA DE <i>Escherichia coli</i>	10
2.5	IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE <i>Escherichia coli</i>	11
2.5.1	Antígenos de superfície O-K	12
2.5.2	Antígenos flagelares	14
2.5.3	Antígenos de aderência	14
2.6	TOXINAS EM <i>Escherichia coli</i>	19
2.6.1	Enterotoxinas	19
2.6.2	Citotoxinas	21
2.7	PLASMÍDIOS DE VIRULÊNCIA	25
2.8	SOROGRUPOS O-K EM CEPAS PATOGÊNICAS SUÍNAS	27
2.9	ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA EM CEPAS PATOGÊNICAS SUÍNAS	31
2.10	PARTICIPAÇÃO DE ENTEROTOXINAS EM DIARRÉIA SUÍNA	36
2.11	SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	38
2.12	VACINAS	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	MATERIAL ANALISADO	45
3.2	METODOLOGIA EMPREGADA	46
3.2.1	Colheita de amostras de conteúdo intestinal	46
3.2.2	Preparo das amostras	46
3.2.3	Isolamento e identificação bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	46
3.2.3.1	Plaqueamento	46
3.2.3.2	Identificação presuntiva	46
3.2.3.3	Identificação definitiva	47
3.2.4	Caracterização sorológica dos antígenos somáticos O-K	47
3.2.5	Caracterização sorológica dos antígenos somáticos de aderência	47
3.2.6	Sensibilidade e resistência aos antimicrobianos	48
4	RESULTADOS	50
4.1	PRESENÇA DOS SOROGRUPOS SOMÁTICOS O-K	50
4.2	PRESENÇA DOS SOROGRUPOS SOMÁTICOS DE ADERÊNCIA	52
4.3	SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA APRESENTADA AOS ANTIMICROBIANOS	54
5	DISCUSSÃO	57
5.1	FREQÜÊNCIA DOS SOROGRUPOS SOMÁTICOS O-K	57
5.2	FREQÜÊNCIA DOS SOROGRUPOS SOMÁTICOS DE ADERÊNCIA	60
5.3	FREQÜÊNCIA DE SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	63
6	CONCLUSÃO	67

ANEXO 1 - MATERIAL DE LABORATÓRIO	68
1.1 MEIOS DE CULTURA , REAGENTES E SOLUÇÕES	68
1.1.1 Base de ágar sangue e triptose	DIFCO 0232 68
1.1.2 Ágar MacConkey	DIFCO 0075 68
1.1.3 Ágar Mueller-Hinton	MERCK 5437 68
1.1.4 Meio de Ligniéres, seg. BIER (1978)	69
1.1.5 Ágar com três açúcares e ferro	DIFCO 0265 69
1.1.6 Ágar uréia de Christensen	MERCK 8492 70
1.1.7 Água peptonada (caldo triptofano), segundo KONEMAN, 1997	70
1.1.8 Caldo VM/VP	70
1.1.9 Ágar citrato de Simmons	MERCK 2501 71
1.1.10 Caldo vermelho de fenol	MERCK 10987 71
1.1.11 Ágar fenilalanina	DIFCO 0745 72
1.1.12 Caldo base descarboxilase de Moeller	72
1.1.13 Reativo de Ehrlich para prova do indol, seg. KONEMAN et al., 1983	72
1.1.14 Reativo para a prova da fenilalanina desaminase, seg. KONEMAN et al., 1983	73
1.1.15 Indicador de pH vermelho de metila	73
1.1.16 Reativo alfa-naftol	73
1.1.17 Hidróxido de potássio (KOH)	73
ANEXO 2 - INTERPRETAGÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS	74
2.1 IMViC	74
2.1.1 Prova do indol	74
2.1.2 Prova do vermelho de metila	74
2.1.3 Prova de Voges-Proskauer	74
2.1.4 Prova do citrato	74
2.2 PROVAS COMPLEMENTARES	75
2.2.1 Prova da urease	75
2.2.2 Prova da fenilalanina desaminase	75
2.2.3 Prova da lisina descarboxilase	75
ANEXO 3 - TABELAS	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE TABELAS

1	- IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>Escherichia coli</i>	6
2	- REAÇÕES DO IMViC DE BACTÉRIAS COLIFORMES	8
3	- PROVAS COMPLEMENTARES	8
4	- CARACTERÍSTICAS DE FÍMBRIAS DE <i>Escherichia coli</i>	15
5	- PROPRIEDADES DAS HEMAGLUTINAÇÕES MANOSE-SENSÍVEL E MANOSE-RESISTENTE EM CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	17
6	- OCORRÊNCIA DE FÍMBRIAS EM RELAÇÃO AOS SOROGRUPOS O	17
7	- SOROGRUPOS ASSOCIADOS A FÍMBRIAS IMPLICADOS EM DIARRÉIA EM SUÍNOS	18
8	- ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE FÍMBRIAS FRENTE A DIFERENTES ERITRÓCITOS	18
9	- ASSOCIAÇÃO DE FÍMBRIA E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA	19
10	- ORIGEM DAS 42 AMOSTRAS DE <i>E. coli</i> ISOLADAS NO PARANÁ	45
11	- INTERPRETAÇÕES DAS ZONAS DE INIBIÇÃO	49
12	- SOROGRUPOS SOMÁTICOS O-K	50
13	- SOROGRUPOS SOMÁTICOS DE ADERÊNCIA	52
14	- SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS (%)	54
15	- PADRÃO DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA	55
16	- FREQUÊNCIAS DE ANTÍGENOS O NO BRASIL E NO MUNDO	77
17	- PREVALÊNCIA DE ANTÍGENOS FIMBRIAIS NO BRASIL E EM OUTROS PAÍSES	78
18	- CEPAS ETEC E NÃO ETEC SEM ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA	79
19	- PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA	79
20	- PORCENTAGENS DE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> RESISTENTES	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA <i>Escherichia coli</i>	7
FIGURA 2	- OCORRÊNCIA DOS SOROGRUPOS DE <i>E. coli</i> ISOLADOS DE LEITÕES COM DIARRÉIA NO ESTADO DO PARANÁ	51
FIGURA 3	- OCORRÊNCIA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE FÍMBRIAS ENCONTRADAS EM CEPAS DE <i>E. coli</i> - %	53
FIGURA 4	- SOMATÓRIO ACUMULADO DAS CEPAS DE <i>E. coli</i> QUE APRESENTARAM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS ANTIMICROBIANOS	56

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos a caracterização sorológica e o perfil de resistência aos antimicrobianos de 42 cepas de *Escherichia coli* isoladas em surtos de diarreia suína no Estado do Paraná, no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, em Curitiba, PR. Os antígenos somáticos O, K e F foram identificados através da técnica de soroaglutinação em lâmina no Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, em Guaíba, RS. A resistência aos antimicrobianos foi verificada através do método de difusão em disco. Os sorogrupos O138 : K81 e O141 : K85 ocorreram na mesma proporção em 21,4% das amostras: O139 : K82 em 9,5% e O149 : K91 em 7,1%. Os sorogrupos O35 : K"V79", O108 : K"V189", O115 : K"V165", e O119 : K"V113" foram encontrados em 2,4% das amostras. Entre as 35 cepas investigadas quanto aos antígenos de aderência, na Universidade de Campinas, a fímbria F4 foi detectada em 62,8% das amostras. O antígeno F165 ocorreu em 14,3% das cepas sendo este o primeiro relato da ocorrência deste antígeno em suínos no Brasil. Observou-se resistência múltipla em 68,7% das cepas isoladas.

ABSTRACT

The objectives of the present work were the serological characterization and the determination of the antibiotic resistance profile of 42 strains of *Escherichia coli* isolated during outbreaks of swine diarrhea in the State of Parana at the Center of Veterinary Diagnostic Marcos Enrietti, in Curitiba, PR. The somatic antigens O, K and F were identified through the method of seroglutination at Center of Veterinary Researches Desidério Finamor, in Guaíba, RS. The resistance to anti-microbial drugs was verified through the diffusion method. Serogroups O138 : K81 and O141 : K85 occurred in the same proportion in 21,4% of the samples; O139 : K82 in 9,5% and O149 : K91 in 7,1%. The serogroups O35 : K"V79", O108 : K"V189", O115 : K"V165" and O119 : K"V113" were found in 2,4% of the strains. In 35 strains were verified the fimbrial antigens at Campinas University. The antigen F4 was detected in 62,8% of strains and the F165 in 14,3%. This is the first report of the occurrence of the fimbrial antigen named F165 in Brazil. Multiple resistance was observed in 68,7% of the strains isolated.

1 INTRODUÇÃO

Em suinocultura, as maiores perdas produtivas são encontradas do nascimento ao desmame. Segundo FAHMY e BERNARD (1971) em torno de 20 a 25% dos leitões morrem antes do desmame. Apesar dos avanços tecnológicos que tentam diminuir estas perdas, as mesmas ainda continuam sendo importantes. Fatores predisponentes tais como condições ambientais, nutricionais e de manejo inadequados a que estes animais são submetidos (KERNKAMP, 1965; FAHMY e BERNARD, 1971; TZIPORI et al., 1980; MADEC e JOSSE, 1983) contribuem para estas perdas. No entanto, a ausência de anticorpos maternos e a imaturidade dos sistemas imune e digestivo dos leitões ao nascimento, tornando-os suscetíveis a agentes infecciosos, é certamente a principal causa destas mortalidades nas criações de suínos (GASKINS e KELLEY, 1995).

Dentre os agentes infecciosos, destacam-se aqueles causadores de diarreia, tais como a *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Clostridium perfringens* tipo C, *Campylobacter mucosalis*, *Salmonella* spp., *Rotavirus*, *Coronavirus* e *Isospora suis* (BARCELLOS et al., 1980; EUTIS e NELSON, 1981; FITZGERALD et al., 1988; MORILLA et al., 1991; BRITO et al., 1995).

Em leitões, a colibacilose é responsável por casos de septicemia, diarreia e doença do edema. Entretanto, os maiores prejuízos econômicos nestas criações estão envolvidos em surtos de diarreia e doença do edema (FAIRBROTHER, 1992). Em um levantamento sobre a produção suína nos Estados Unidos, foi estimado que 7% de leitões entre 0 a 4 dias de idade apresentaram diarreia, a maioria sendo causada pela *Escherichia coli* onde cerca de 50% daqueles animais morreram (USDA, 1991).

No Brasil, a diarreia induzida por cepas de *Escherichia coli*, isolada ou em associação com o *Rotavirus*, é apontada como uma das principais causas infecciosas de mortalidade em suínos na primeira e terceira semanas de vida ou imediatamente após o período de pós-desmame. No Rio Grande do Sul, BARCELLOS et al., 1980 obtiveram entre 433 amostras de fezes de suínos com diarreia, 338 (78%) isolamentos de *Escherichia coli*. Em levantamento realizado por BRITO et al. (1995) em granjas suinícolas do sudoeste do Paraná, a *E. coli* sozinha

ou em associação com o *Rotavirus* foi o agente mais freqüente nos surtos de diarreia em leitões lactentes.

Visando contribuir para um melhor esclarecimento sobre as cepas de *Escherichia coli* envolvidas em diarreias na espécie suína, no Estado do Paraná, o presente trabalho tem como objetivos principais: (1) rever extensivamente a literatura especializada no assunto; (2) determinar a freqüência de antígenos somáticos, capsulares e fimbriais em cepas isoladas de leitões nos períodos neonatal e de pós-desmame; (3) verificar a sensibilidade e resistência das cepas aos antimicrobianos indicando as drogas mais eficazes para o tratamento das colibaciloses; (4) propor a inclusão dos antígenos O-K e de aderência em vacinas comerciais a serem utilizadas em rebanhos suínos no Estado do Paraná.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA COLIBACILOSE SUÍNA

Em 1885, Theodor Escherich, um pediatra alemão trabalhando na Áustria, isolou, a partir de fezes de neonatos, bactérias Gram-negativas as quais denominou *Bacterium coli commune* (ØRSKOV e ØRSKOV, 1985), conhecida hoje como *Escherichia coli*. Desde então, a maioria das pesquisas sobre bioquímica e metabolismo bacterianos tem sido conduzidas utilizando esta bactéria como modelo experimental.

A *Escherichia coli* é um habitante normal do intestino grosso do homem e animais cuja colonização ocorre logo após o nascimento. Relativamente pouco é conhecido acerca dos fatores que promovem a colonização intestinal de recém-nascidos. Ao nascimento, o intestino é estéril e promove um meio ideal para o rápido crescimento de bactérias adquiridas do ambiente. Na maioria dos animais, os microrganismos colonizadores iniciais são: cepas de *Escherichia coli* não patogênicas, *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp. e *Lactobacillus* spp. Mais tarde, bactérias anaeróbicas facultativas removem o oxigênio, e as anaeróbicas se tornam predominantes (BARNES, 1986).

Embora a *E. coli* faça parte da microbiota intestinal, alguns sorotipos podem ser associados com patologias intestinais e extraintestinais no homem e animais (DE GRAAF e MOOI, 1986). Colibacilose é um termo genérico que abrange várias doenças associadas com cepas patogênicas de *Escherichia coli* (MARTINEAU et al., 1995).

Em suínos, a *E. coli* é responsável por septicemia, diarreia e doença do edema. No entanto, as maiores perdas econômicas estão associadas com as duas últimas patologias. A diarreia por *E. coli* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em suínos do nascimento ao desmame (TZIPORI et al., 1980; WILSON e FRANCIS, 1986; BRITO et al., 1995).

Atualmente, está bem estabelecida a participação de alguns sorotipos em casos de diarreia e doença do edema em suínos (SOJKA, 1971). Para a identificação correta da doença é necessário associar a sorotipagem das cepas

isoladas aos sinais clínicos, lesões e dados epidemiológicos encontrados. A partir do diagnóstico laboratorial é possível indicar a vacina mais adequada para controlar um surto, pois a imunidade é específica, ou seja, tipos sorológicos diferentes daquele isolado falham na proteção dos animais afetados (BARCELLOS e BAPTISTA, 1977).

Em 1968, NIELSEN et al. fizeram algumas considerações sobre o desenvolvimento da diarreia causada por *E. coli*. Segundo estes autores,

"1) estes microrganismos estão amplamente distribuídos no ambiente do suíno, mas a presença em pequeno número normalmente não leva ao desenvolvimento da diarreia no leitão. Uma certa dose infectante é provavelmente requerida para o estabelecimento da doença. 2) quanto à proliferação da *E. coli* no intestino delgado, há fatores que podem influenciar esta proliferação: a) motilidade intestinal: qualquer inibição da peristalse pode favorecer a multiplicação da bactéria; b) secreção glandular: a qual tende a lavar a bactéria do intestino delgado; c) fatores nutricionais: a disponibilidade de nutrientes para a multiplicação bacteriana; d) presença de anticorpos no lúme intestinal e) microbiota intestinal, a qual pode ter uma interação competitiva, antagonística ou simbiótica".

Em 1972, JONES e RUTTER demonstraram que a adesão da *E. coli* à mucosa do intestino delgado era realizada por estruturas filamentosas presentes na superfície bacteriana e que esta era uma etapa essencial para a proliferação de cepas causadoras de diarreia neonatal em leitões.

Em levantamentos sobre as causas de diarreias bacterianas em leitões, a *Escherichia coli* é o mais importante patógeno envolvido (BARCELLOS et al., 1980; FITZGERALD et al., 1988; BRITO et al., 1995). Os tipos de infecções por *E. coli* em leitões foram classificados por NIELSEN et al. (1968) em:

- a) diarreia de leitões de 1 a 4 dias de idade (diarreia neonatal);
- b) diarreia no período de desmame;
- c) doença do edema.

2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DA *Escherichia coli*

Como um membro típico da família *Enterobacteriaceae*, as *E. coli* utilizam a glicose fermentativamente, são oxidase negativas e reduzem nitratos a nitritos (KONEMAN et al., 1997). A habilidade de fermentar a glicose com a produção de

ácido e gás é uma característica básica da *E. coli*. Os ácidos acético, fórmico, láctico e succínico predominam, reduzindo o pH a níveis em torno de 4,4. O gás produzido é geralmente uma mistura de quantidades equivalentes de hidrogênio e dióxido de carbono a partir da quebra do ácido fórmico.

Segundo ØRSKOV (1984), morfológicamente as *E. coli* apresentam-se como bacilos retos Gram-negativos medindo 1,1 - 1,5 μm x 2,0 - 6,0 μm , ocorrendo separadamente ou em pares. Cápsulas ou microcápsulas ocorrem em muitas cepas e podem ser móveis através de flagelos peritríquios ou imóveis. São bactérias anaeróbicas facultativas com uma temperatura ótima de crescimento de 37°C. As colônias em ágar nutriente podem ser lisas, convexas, cinzas e com bordas regulares, ou rugosas.

A identificação completa da *E. coli* inclui uma ampla série de reações bioquímicas de fermentações, descarboxilações e hidrólises de substratos citadas no Manual de BERGEY (1984). A Tabela 1 mostra estas reações.

Embora sejam citadas inúmeras reações bioquímicas utilizadas na identificação desta espécie, a *E. coli* pode ser isolada e caracterizada rotineiramente no laboratório de diagnóstico utilizando poucos meios de cultura (QUINN et al., 1994).

A partir de amostras de fezes e/ou conteúdo do intestino delgado, os meios mais comumente empregados na rotina diagnóstica de isolamento são o ágar MacConkey e o ágar sangue de carneiro. No primeiro, verifica-se a fermentação da lactose pela *E. coli* a qual forma colônias vermelhas devido a acidificação do meio, demonstrada pelo indicador de pH vermelho neutro. O ágar sangue, além de ser um meio enriquecido possibilitando o crescimento de todos os membros da família *Enterobacteriaceae*, ainda caracteriza as colônias hemolíticas e as mucóides, comuns em casos de diarreia suína (QUINN et al., 1994). LARIVIÈRE e LALLIER (1976) verificaram que 78% das cepas enterotoxigênicas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia eram hemolíticas.

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

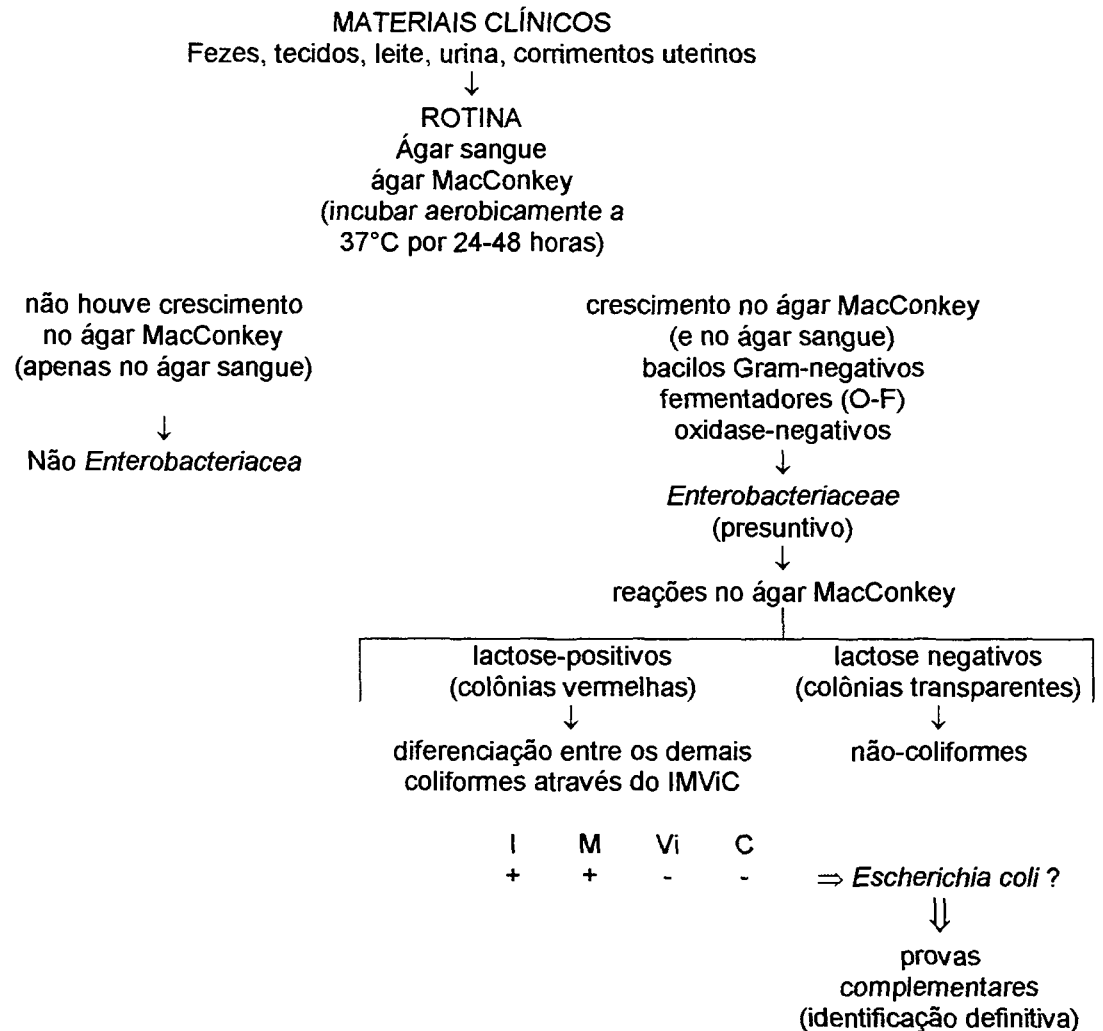
CARACTERÍSTICA	RESULTADO
Produção de indol	+
Vermelho de metila	+
Voges-Proskauer	-
Citrato de Simmons	-
Sulfito de hidrogênio (TSI)	-
Urease	-
Fenilalanina deaminase	-
Lisina decarboxilase	(+)
Arginina diidrolase	(-)
Motilidade	(+)
Liquefação da gelatina a 22°C	(-)
Crescimento em KCN	(-)
Utilização do malonato	(-)
D-glucose (produção de ácido)	+
D-glucose (produção de gás)	+
Lactose	+
Sacarose	d
D-manitol	+
Dulcitol	d
Salicina	d
D-adonitol	-
Myi-inositol	-
D-Sorbitol	+
L-arabinose	+
Rafinose	d
L-ramnose	(+)
Maltose	+
D-xylose	+
Trealose	+
Celobiose	-
α -metil-D-glicosídeo	-
Hidrólise da esculina	d
Melibiose	(+)
D-arabitol	-
Mucato	+
Lipase, corn oil	-
Deoxiribonuclease a 25°C	-
$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	+
Oxidase	-
ONPG	+
Pigmento amarelo	-
D-manose	+

+, >90% das cepas são positivas; (+), 76/89% positivas; d, 26/75% positivas;

(-), 11/25% positivas; -, 0/10% positivas

QUINN et al. (1994) propõem o seguinte esquema de isolamento e identificação da *E. coli* e sua diferenciação bioquímica com os demais gêneros e espécies de coliformes:

FIGURA 1 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA *Escherichia coli*



Das colônias obtidas nos meios de rotina, procede-se a identificação bioquímica preliminar, necessária para a diferenciação entre os gêneros fermentadores da lactose da família *Enterobacteriaceae* (coliformes). Para isso, utiliza-se o teste do IMViC cujos resultados estão indicados na Tabela 2 (QUINN et al., 1994; KONEMAN et al., 1997).

TABELA 2 - REAÇÕES DO IMVIC DE BACTÉRIAS COLIFORMES

MICROORGANISMO	INDOL	VERMELHO DE METILA	VOGES - PROSKAUER	CITRATO
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	v	+	-	v
<i>Citrobacter (diversus) koseri</i>	+	+	-	+
<i>Enterobacter spp.</i>	-	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	v	+	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	-	+	-	v

+, >90% das cepas são positivas; -, >90% das cepas são negativas; v, variável

Uma vez que os resultados preliminares são compatíveis com a espécie *Escherichia coli*, procede-se a identificação definitiva, indicada na Tabela 3 (FORBES et al, 1998).

TABELA 3 – PROVAS COMPLEMENTARES

BACTÉRIAS IMVIC + + - -	PROD. H ₂ S (em TSI)	FERM. SACAROSE	UREASE	FENILALANINA DESAMINASE	LISINA DESCARBOXILASE
<i>Escherichia coli</i>	-	v	-	v	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	v	v	v	-
<i>Shigella</i> grupos A, B e C	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	v	v	v	v	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	-	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>frederiksenii</i> e <i>intermedia</i>	-	+	v	+	-
<i>Proteus vulgares</i>	+	+	+	+	-
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	v	-	+	-	-

+, > 90% das cepas são positivas; -, > 90% das cepas são negativas; v, variável; I, indol; M, vermelho de metila; V, Voges-Proskauer; C, citrato; TSI, *triple sugar iron agar*

2.3 FATORES GERAIS DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli*

Segundo QUINN et al. (1994) são diversos os mecanismos de virulência apresentados por cepas patogênicas de *E. coli*, destacando-se entre estes:

- A cápsula polissacarídica (antígeno K) é antifagocítica e também protege a parede celular dos efeitos deletérios do complemento.

- A endotoxina (lípide A) é a toxina associada com colissepticemias e mastite coliforme. O lípide A também interfere com componentes do complemento responsáveis pelo ataque à membrana externa de *E. coli*.
- Certas fimbrias são adesinas protéicas. Estes fatores de colonização levam a adesão da *E. coli* a glicoproteínas da superfície de células epiteliais do jejuno e íleo com sua conseqüente colonização. A peristalse não consegue levar a bactéria para o intestino grosso, onde as células não são suscetíveis às enterotoxinas. A produção de K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41 e F165 está relacionada com a habilidade de cepas de *E. coli* formarem enterotoxinas.
- Cepas de *E. coli* produzem hemolisinas alfa e beta. A hemolisina alfa é uma proteína que lesa as membranas celulares do hospedeiro. A perda da habilidade de produzi-la diminui a virulência da cepa.
- Os sideróforos são importantes para as cepas invasivas. Eles removem o ferro ligado às proteínas do hospedeiro. O ferro é necessário para o crescimento da maioria das bactérias, que precisam competir com o hospedeiro pela sua disponibilidade.
- As enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) são produzidas por cepas de *E. coli* enterotoxigênicas que normalmente também possuem fatores de colonização (K88, K99 e outros). A enterotoxina LT é uma proteína de 91000 D antígenicamente relacionada a toxina colérica (*Vibrio cholerae*). Ela afeta a adenilato ciclase levando à diarreia, hipovolemia, acidose metabólica e hipercalemia se a acidose for severa. A enterotoxina ST é uma proteína de 1500 a 2000 D e é dividida em dois tipos: STa e STb. A STa afeta a guanilato ciclase, porém o mecanismo de ação da STb não é conhecido.
- As verotoxinas ou toxinas Shiga-like têm atividade similar a toxina (citotoxina) de espécies de *Shigella*. Estas toxinas inibem a síntese protéica nas células do hospedeiro ao interagir com a subunidade ribossomal 60S.

Porém, estes fatores agem isoladamente ou em conjunção, segundo a sua classificação de virulência, tornando os aspectos patológicos extremamente variados e complexos (LIOR, 1994).

2.4 CLASSIFICAÇÃO PATOGÊNICA DE *Escherichia coli*

Uma vez que as colônias isoladas são caracterizadas como *E. coli*, estas cepas podem ser classificadas, segundo seu local de isolamento, como extra-intestinais ou intestinais (ØRSKOV e ØRSKOV, 1985; LIOR, 1994).

As cepas extra-intestinais são classificadas em:

- UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica): responsáveis por infecções do aparelho urinário após adesão no epitélio (humanos e cães).
- SEPEC (*Escherichia coli* septicêmica): responsáveis por sepsis (colissepticemia) em humanos, leitões e bezerros.
- MENECA (*Escherichia coli* causadoras de meningite): responsáveis por meningites humanas em recém-nascidos.

Por outro lado, as cepas de *E. coli* causadoras de infecções entéricas em animais têm sido classificadas, de acordo com seus fatores de virulência, como:

- ETEC (*E. coli* enterotoxigênica): cepas possuidoras de fimbrias K88, K99 e outras; a produção destes fatores de colonização está correlacionada com a produção de enterotoxinas; causadoras da maioria das colibaciloses neonatais em humanos e animais.
- EPEC (*E. coli* enteropatogênica): cepas possuidoras de fatores de colonização, mas não produtoras de enterotoxinas ou verotoxinas; causadoras de diarreia em humanos e animais.
- EIEC (*E. coli* enteroinvasiva): cepas com capacidade de adesão às células do intestino delgado distal, invasoras dos enterócitos e camadas mais profundas da mucosa intestinal, alcançando o sistema linfático onde há multiplicação; algumas células bacterianas morrem liberando endotoxinas;

- fatores de virulência tais como cápsulas, adesinas, sideróforos e alfa-hemolisinas são importantes para estas cepas invasivas as quais são responsáveis por colisepticemia.
- EHEC (*E. coli* enterohemorrágica): cepas produtoras de verotoxinas ou toxinas Shiga-like envolvidas na síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica em humanos e enterites em animais.
- EAaggEC (*E. coli* enteroagregativa): cepas possuidoras de fimbrias e produtoras de uma enterotoxina ST-like (EAST1); causadoras de diarreia em humanos.

2.5 IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE *Escherichia coli*

A espécie *Escherichia coli* é composta de bactérias que têm reações bioquímicas similares, mas que podem ser separadas, de acordo com sua composição antigênica, em diferentes sorotipos.

A classificação sorológica das cepas de *E. coli* é baseada na identificação de seus quatro antígenos de superfície: O (antígeno somático), K (antígeno capsular), H (antígeno flagelar) e F (antígeno fimbrial) (ØRSKOV et al., 1977; ØRSKOV e ØRSKOV, 1983). A detecção destas estruturas superficiais, a partir de cepas virulentas, é importante para o levantamento de estudos epidemiológicos. Além disso, ao detectar o sorotipo responsável por determinada doença, pode-se estabelecer um esquema de vacinação mais adequado. Apesar da existência de vários sorotipos de *E. coli*, apenas um limitado número deles está associado com doenças no homem e animais (SOJKA, 1971).

Segundo SOJKA (1971), o termo sorotipo deve ser usado apenas quando todos os antígenos de superfície são identificados em uma cepa. Algumas vezes, apenas os antígenos O-K são determinados. Neste caso, os termos grupo ou sorogrupo O-K deveriam ser usados ao invés de sorotipo.

A importância da diferenciação entre cepas patogênicas e não patogênicas surgiu quando LE SAGE (1897) demonstrou que o soro de um caso agudo de diarreia aglutinou microrganismos de outros casos em uma epidemia, mas não de amostras de crianças saudáveis.

KAUFFMANN (1944) foi o primeiro a estabelecer um esquema antigênico para a *E. coli* através de métodos sorológicos. Ele descreveu 20 grupos O baseados em aglutinação de suspensões fervidas e, três anos após, ele publicou um esquema antigênico o qual consistia de 25 antígenos O, 55 antígenos K e 19 antígenos H. A partir daí, este esquema foi ampliado e hoje consiste de 167 antígenos O (O1-O173), 80 antígenos K e 56 antígenos H. Em 1983, ØRSKOV e ØRSKOV propuseram a identificação de um quarto grupo de antígenos de superfície chamados fímbrias e empregaram a letra F para designá-las.

2.5.1 Antígenos de superfície O-K

A especificidade sorológica dos antígenos O é baseada na estrutura complexa da cadeia polissacarídica presente na parede celular. Estes antígenos são termoestáveis, ou seja, não são inativados em temperaturas de 100°C ou 121°C. Na maioria dos laboratórios, a determinação do antígeno O é realizada através da soroaglutinação em lâmina. O antisoro é produzido em coelhos inoculados com suspensões de antígenos aquecidos (100°C ou 121°C) (SOJKA, 1965). Algumas cepas de *E. coli* podem sofrer variações da forma lisa para a rugosa devido a mutações em genes responsáveis pela síntese da cadeia polissacarídica, perdendo a sua especificidade antigênica. Estas cepas autoaglutinam em solução salina e, portanto, não podem ser sorotipadas (LIOR, 1994).

Durante as investigações das características sorológicas de *E. coli*, KAUFFMANN (1944) verificou que muitas bactérias vivas não aglutinavam com o antisoro O correspondente. A inibição da aglutinabilidade poderia ser resolvida ao aquecer a suspensão bacteriana. Em 1945, KAUFFMANN e VAHLNE introduziram o termo K, derivado da palavra germânica "*kapself*" (cápsula) para o antígeno responsável pela inaglutinabilidade das cepas e o dividiu em três classes, baseadas na suscetibilidade a diferentes temperaturas: L, A e B. O tipo L é termo-lábil, ou seja, após o aquecimento a 100°C durante 1 hora, as culturas com este antígeno são aglutinadas pelo antisoro O. O tipo A é inativado quando submetido a 121°C durante 2 horas. Devido as dificuldades encontradas na determinação destes três antígenos, ØRSKOV et al. (1977) propuseram denominá-los apenas de antígeno K.

Os antígenos K são polissacarídeos antigenicamente diferentes dos antígenos O encontrando-se ainda mais externamente a eles (JANN e JANN, 1992).

Em 1971, SOJKA estabeleceu o seguinte esquema de sorogrupos O-K enteropatogênicos e não enteropatogênicos associados, respectivamente, com diarreia e doença do edema em suínos:

I. Grupos O-K enteropatogênicos (positivos no teste de alça ligada)

A Cepas freqüentemente encontradas em diarreia, particularmente em leitões recém-nascidos:

"G7"	O8:K87 (B), K88a,b (L)
"G205"	O8:K87 (B), K88a,c (L)
"G4/66"	O45:K"E65", K88a,c (L)
"G491"	O138:K81 (B), K88a,c (L)
"E68 tipo 1"	O141:K85a,b (B), K88a,b (L)
"G1253"	O147:K89 (B), K88a,c (L)
"Abbotstown"	O149:K91 (B), K88a,c (L)

B Cepas menos freqüentemente encontradas em diarreia:

"P16"	O9:K"P16" (A)
"V50"	O10:K"V50"
"V79"	O35:K"V79"
"V142"	O64:K"V142"
"V189"	O108:K"V189"
"V165"	O115:K"V165"
"V113"	O119:K"V113"
"V17"	O"V17":K"V17"

C Cepas freqüentemente encontradas em diarreia e doença do edema, principalmente em leitões desmamados:

"E68 tipo II"	O141:K85a,b (B) – K85a,c (B)
"E145"	O141:K85a,c (B)
"E57"	O138:K81 (B)

II. Grupos não enteropatogênicos (negativos no teste de alça ligada) associados com doença do edema:

“E4”	O139:K82 (B)
“E65”	O45:K“E65”

2.5.2 Antígenos flagelares

Muitas *E. coli* são móveis através de flagelos de constituição protéica e podem ser examinadas para a determinação do antígeno termolábil H. O conteúdo de aminoácidos e a ordem na qual eles ocorrem diferenciam sorologicamente as cepas. Algumas cepas obtidas no isolamento primário podem mostrar uma motilidade lenta, tornando-as inadequadas para a determinação sorológica do antígeno H. Neste caso, as cepas devem ser passadas uma ou mais vezes em um meio semi-sólido até que a motilidade seja bem desenvolvida. A maioria dos antígenos H são específicos e mostram pouca ou nenhuma reatividade cruzada (EWING, 1986).

Os antígenos H são numerados de H1 a H49 e H51 a H56, e como podem ocorrer em associação com qualquer antígeno O, a sua determinação é importante em levantamentos epidemiológicos para estabelecer a patogenicidade da *Escherichia coli* envolvida em doenças intestinais e extraintestinais (LIOR, 1994).

2.5.3 Antígenos de aderência

Em 1961, ØRSKOV et al. descreveram um antígeno de superfície termolábil, chamado K88, encontrado em cepas de *E. coli* isoladas de casos de doença do edema e diarreia em suínos. Através da microscopia eletrônica, STIRM et al. (1967) verificaram que as bactérias K88+ eram cobertas por um material de aparência filamentosa. Em 1973, SOJKA reconheceu que a diarreia neonatal suína é caracterizada pela proliferação no intestino delgado de determinados sorotipos de *E. coli* possuidores deste antígeno de superfície. A partir destas descobertas, outros antígenos de aderência foram reconhecidos em cepas de *E. coli* envolvidas em doenças em humanos e animais (SMITH e LINGGOOD, 1972).

Uma importante etapa na colonização intestinal por cepas comensais ou patogênicas de *E. coli* é a ligação da bactéria a receptores localizados na mucosa ou glicocálix de células epiteliais (HACKER, 1992). Apêndices filamentosos não flagelares de constituição protéica são as estruturas de superfície responsáveis por esta aderência. Os termos fímbria, fator de colonização e adesina podem ser usados como sinônimos, mas de acordo com a microscopia eletrônica, as fímbrias são reveladas como estruturas rígidas de 5 a 7 nm de diâmetro. Algumas fímbrias são mais finas e flexíveis (2 a 4 nm) e são referidas como fibrilas. As designações F4, F5 e F6 foram aplicadas às fímbrias K88, K99 e 987P, respectivamente (ØRSKOV e ØRSKOV, 1983). O termo adesina é empregado para aquelas estruturas protéicas não fimbriais. A Tabela 4 indica as características dos principais fatores de colonização em cepas de *E. coli* intestinais (DE GRAAF, 1990).

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DE FÍMBRIAS DE *Escherichia coli*

FÍMBRIA	MORFOLOGIA	DIÂMETRO (nm)	PESO MOLECULAR DA SUBUNIDADE	LOCALIZAÇÃO DOS GENES	GENES
tipo 1	Rígida	7	17000	Cromossomo	-
K88 (F4)	Flexível	2,1	27600	Plasmídio	Suína
K99 (F5)	Flexível	5	16500	Plasmídio	Bov., ov., suína
987P (F6)	Rígida	7	17200	Cromossomo	Suína
F41	Flexível	3,2	29500	Cromossomo	Suína
F17	Rígida	3,4	20000	Cromossomo	Bovina
CFA/I (F2)	Rígida	7	15000	Plasmídio	Humana
CFA/II (F3)					
CS1	Rígida	7	16800	Plasmídio	Humana
CS2	Rígida	7	15300	Plasmídio	Humana
CS3	Flexível	2-3	15000	Plasmídio	Humana

Os fatores que promovem a colonização intestinal em recém-nascidos são pouco conhecidos, mas é provável que a fímbria do tipo 1, encontrada na maioria de cepas de *E. coli* comensais, desempenham um importante papel neste processo. Outras fímbrias menos comuns (M, S, P e X) também são freqüentemente detectadas na microbiota de indivíduos sadios (DE GRAAF, 1990).

A característica propriedade adesiva das fímbrias foi primeiramente demonstrada através da hemaglutinação, por DUGUID et al. (1955).

A atividade hemaglutinante de uma cepa bacteriana está geralmente associada com a capacidade aderente a algum epitélio. JONES e RUTTER (1972)

verificaram que havia uma boa evidência de que a capacidade de colonização dos antígenos denominados de K88 e K99 ao epitélio intestinal contribuía para a enteropatogenicidade da bactéria para suínos e bezerros da mesma maneira que o fator de colonização contribuía para a enteropatogenicidade ao homem.

A maioria das cepas comensais e patogênicas de *E. coli* produzem fímbrias do tipo 1, as quais aderem a células animais, vegetais e fúngicas. A hemaglutinação destas fímbrias é inibida na presença de 0,5% de D-manose e, portanto, são chamadas de fímbrias manose-sensíveis (MS). Sua propriedade adesiva pode ajudar a colonizar superfícies epiteliais, contribuindo para a patogenicidade da bactéria. Os genes envolvidos na produção destas fímbrias residem no cromossomo bacteriano (DE GRAAF, 1990).

As fímbrias manose-resistentes (MR) aglutinam eritrócitos mesmo na presença de D-manose. Esta propriedade pode ser usada para a identificação presuntiva dos diferentes fatores de colonização conhecidos. Cada fímbria resulta em um padrão específico de hemaglutinação manose-resistente frente a eritrócitos de diferentes espécies animais (DUGUID et al., 1979). Estas estruturas de superfície são antígenicamente diferentes e mostram um alto grau de especificidade de espécie. Seus determinantes genéticos estão localizados principalmente em plasmídios e a sua biossíntese é regulada por condições de crescimento, tais como temperatura e composição dos meios de cultura (DE GRAAF e MOOI, 1986). Nenhuma das fímbrias manose-resistentes é sintetizada em temperaturas abaixo de 20°C, indicando um mecanismo regulatório que suprime sua produção em temperaturas não fisiológicas. Quanto aos meios de cultura, em geral, a síntese das fímbrias requer o crescimento das cepas em meios não complexos, como por exemplo, o meio Minca, o qual contém menos aminoácidos e carboidratos do que os meios nutrientes comuns, a fim de suprimir a produção de antígenos capsulares (GUINÉE et al., 1977). A presença destes antígenos dificulta a detecção das fímbrias em testes de soroaglutinação.

A Tabela 5 indica os critérios para diferenciar as hemaglutinações manose-sensíveis e manose-resistentes, segundo DUGUID et al. (1979).

TABELA 5 - PROPRIEDADES DAS HEMAGLUTINAÇÕES MANOSE-SENSÍVEL E MANOSE-RESISTENTE EM CEPAS DE *Escherichia coli*

PROPRIEDADE	HEMAGLUTINAÇÃO	
	MANOSE - SENSÍVEL	MANOSE - RESISTENTE
Atividade na presença de 0,5% de D-manose	Ausente	Presente
Atividade em temperaturas de 10 a 50°C	Presente	Ausente
Atividade após bactéria ser aquecida a 65°C durante 30 minutos	Presente	Ausente
Atividade após bactéria ser exposta a 0,5% de formaldeído a 37° durante 4 horas	Presente	Ausente
Padrão de atividade com eritrócitos de diferentes espécies animais	O mesmo em todas as cepas de <i>E. coli</i>	Diferentes padrões em diferentes cepas de <i>E. coli</i>
Condições culturais ótimas para seu desenvolvimento	Cultura prolongada (48 h) em cultura estática	Cultura <i>overnight</i> em ágar a 37°C; não desenvolvidas abaixo de 25°C
Estrutura com a qual está associada	Fímbria do tipo 1	Fímbria MR ou antígeno não fimbrial

Segundo GAASTRA e DE GRAAF (1982) a ocorrência de fímbrias tende a ser hospedeiro-específica e está associada com um limitado número de sorotipos capazes de provocar uma condição patológica particular no homem e em animais, conforme exposto na Tabela 6.

TABELA 6 - OCORRÊNCIA DE FÍMBRIAS EM RELAÇÃO AOS SOROGRUPOS O

FÍMBRIA	ORIGEM	SOROGRUPOS O
K88	Suína	O8, O45, O138, O141, O147, O149, O157
K99	Suína	O64, O101
K99	Bovina, ovina	O8, O9, O20, O101
987P	Suína	O9, O20, O141
F41	Bovina	O9, O101
CFA/I	Humana	O15, O25, O63, O78
CFA/II	Humana	O6, O8

A Tabela 7 mostra os principais sorogrupos de *E. coli* implicados em diarreia em suínos, associados aos antígenos fimbriais K88, K99 e 987P (ØRSKOV e ØRSKOV, 1984).

TABELA 7 - SOROGRUPOS ASSOCIADOS A FÍMBRIAS IMPLICADOS EM DIARRÉIA EM SUÍNOS

SOROGRUPO	ANTÍGENO FIMBRIAL
O8:H87:H19	F4 (K88)
O9:K35:H-	F5 (K99)
O9:K103:H-	F6 (987P)
O20:K101:H-	F6 (987P)
O45:H-	F4 (K88)
O101:K30:H-	F5 (K99)
O138:H14	F4 (K88)
O141:H4	F4 (K88)
O147:H19	F4 (K88)
O149:H10	F4 (K88)
O138:H-b	
O139:K82:H1b	F107*
O141:K85:H4b	F107*

* Segundo IMBERECHTS et al. (1994)

A atividade hemaglutinante apresentada por cepas de *E. coli* portadoras de antígenos de aderência é dependente do tipo de eritrócito utilizado (GAASTRA e DE GRAAF, 1982), sendo apresentada na Tabela 8.

TABELA 8 - ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE FÍMBRIAS FRENTE A DIFERENTES ERITRÓCITOS

FÍMBRIA	ORIGEM	ERITRÓCITOS HEMAGLUTINADOS
K88	Suína	Cobaia, galinha
K99	Bovina, ovina, suína	Eqüino, ovino
987P	Suína	-
F41	Bovina, suína	Humano, cobaia, eqüino, ovino
CFA/I	Humana	Humano, bovino, galinha
CFA/II	Humana	Bovino, galinha

A associação entre a produção de fímbria e a produção de enterotoxina é mostrada na Tabela 9 (GAASTRA e DE GRAAF, 1982).

TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO DE FÍMBRIA E PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA

FÍMBRIA	ENTEROTOXINA		
	ST	LT	ST + LT
K88	+	+	+
K99	+	-	-
987P	+	-	-
F41	+	-	-
CFA/I	+	+	+
CFA/II	-	-	+

2.6 TOXINAS EM *Escherichia coli*

Certas cepas de *E. coli* produzem toxinas, muitas das quais desempenham um importante papel na patogênese das doenças. Estas incluem enterotoxinas (LT, STa e STb) e citotoxinas (verotoxinas ou toxinas Shiga-like, hemolisina alfa, enterohemolisina, citotoxina Vir, fator necrotizante citotóxico e toxina distensora citoletal) (GYLES, 1992, 1994).

A enterotoxina LT pode ser detectada em células de linhagem, tais como Y1, CHO (*Chinese hamster ovary*) ou Vero, ou através da imuno hemólise passiva (SERAFIM et al., 1979; WRAY e WOODWARD, 1994). Para a pesquisa de cepas de *E. coli* produtoras de STa, utiliza-se o teste do camundongo recém-nascido; para STb, o teste do segmento ligado de intestino de suíno desmamado (BURGESS et al., 1978; GUTH et al., 1986).

A atividade das diferentes citotoxinas pode ser ensaiada *in vitro* em células Vero, HeLa, HEp-2 e CHO (KONOWALCHUK et al., 1977; OSWALD et al., 1989).

2.6.1 Enterotoxinas

Na tentativa de buscar uma explicação para a diarreia causada por cepas de *E. coli* em suínos, SMITH e HALLS (1967) identificaram uma toxina termoestável que causava acúmulo de fluido em segmentos ligados de intestino de suínos. Em 1969, GYLES e BARNUM demonstraram, a partir de cepas de *E. coli*, também implicadas em diarreia nesta espécie animal, uma enterotoxina termolábil antígenicamente relacionada a enterotoxina do *Vibrio cholerae*. Posteriormente, SMITH e GYLES

(1970) verificaram diferenças entre as duas enterotoxinas e as denominaram termoestável (ST) e termolábil (LT).

Em 1978, BURGESS et al. demonstraram dois tipos de enterotoxinas ST: STa, solúvel em metanol e ativa no intestino de camundongo recém-nascido; e STb, insolúvel em metanol e inativa no intestino de camundongo recém-nascido, mas ativa no intestino de leitões desmamados. SO e McCARTHY (1980) empregaram como sinônimos para STa e STb as denominações STI e STII, respectivamente. Posteriormente, foram distinguidos dois tipos de STI, os quais foram chamados STIa e STIb (MOSELEY et al., 1983a, 1983b).

GREEN et al. (1983) identificaram um segundo tipo de LT (LTII), a qual era antigenicamente diferente da LT de GYLES e BARNUM (1969). Dois tipos antigênicos de LTII foram identificados por GUTH et al. (1986): LTIIa e LTIIb.

A diarreia secretória induzida pelas enterotoxinas de *E. coli* não parecem induzir lesões morfológicas discerníveis a nível de enterócitos (KENNEDY et al., 1984). Entretanto, WHIPP et al. (1986) demonstraram a atrofia de vilosidades devido a STb em suínos de 3 semanas de idade. Em 1987, ROSE et al. concluíram que a STb causava atrofia das vilosidades do intestino delgado de suínos de 2 a 3 semanas de idade.

A enterotoxina produzida pela cepa de *E. coli* previamente aderida ao epitélio intestinal inicia a sua ação no folheto interno da membrana citoplasmática do enterócito, ativando a adenilato ciclase ali presente por um mecanismo implicado na síntese do AMP cíclico a partir do ATP (GYLES, 1994).

A toxina LT é constituída de um oligômero de 88000 D constituído de duas subunidades: A (subunidade A1 com 23000 D e subunidade A2 de 5500 D) e de cinco subunidades B (com peso de 11500 D cada), segundo SIXMA*.

As subunidades A1 e A2 estão unidas por pontes dissulfídicas revestidas pelas subunidades B, formando uma coroa periférica. Quando uma das subunidades B se fixa ao gangliosídeo GM1 da membrana do enterócito, ocorre uma mudança conformacional da toxina, permitindo então a entrada das subunidades A (A1 e A2) que possuem atividade enzimática que catalisa a reação, ativando a adenilato ciclase provocando os efeitos fisiológicos de saída de cloro e água, não permitindo a

* citado por GYLES, C.L., 1994.

absorção de sódio resultando em acúmulo de líquido na luz intestinal provocando a diarreia (GYLES, 1994).

A toxina STa ativa a enzima guanilato ciclase do enterócito do jejuno e íleo elevando os níveis de GMP cíclico (FIELD et al., 1978; HUGHES et al., 1978). A elevação destes níveis provoca um aumento de secreção fluida por um mecanismo não conhecido, resultando na inibição da absorção de sódio estimulando a secreção de cloro nas criptas das células, as quais levam ao excessivo acúmulo de líquido no lume intestinal.

O mecanismo de ação da STb não é conhecido. Ela não causa elevação nos níveis de AMP cíclico ou GMP cíclico, nem altera o fluxo dos íons cálcio e cloro. Entretanto, tem sido associada com uma leve lesão histológica do epitélio intestinal que poderia ser responsável pela absorção prejudicada dos líquidos (WHIPP et al., 1987).

2.6.2 Citotoxinas

Em 1977, KONOWALCHUK et al. introduziram o termo verotoxina (VT) para uma citoxina de *E. coli* que era letal para células Vero. Ao pesquisarem 136 isolamentos de *E. coli*, verificaram que 7 entre 10 cepas VT-positivas estavam associadas com diarreia em humanos e uma, associada com diarreia em suínos.

O'BRIEN et al. (1982) relataram que certas cepas EPEC produziram uma citotoxina que era letal para células HeLa. Assim como a toxina da *Shigella dysenteriae*, esta citotoxina inibiu a síntese protéica em células HeLa, era enterotóxica no intestino de coelhos e era letal para camundongos. Esta toxina foi, portanto, denominada toxina Shiga-like (SLT). Entre as cepas SLT-positivas examinadas por eles, estava a cepa H30, também investigada por KONOWALCHUK et al. (1977) os quais a demonstraram ser VT-positiva.

Posteriormente, SCOTLAND et al. (1985) e STROCKBINE et al. (1986) caracterizaram dois tipos antigênicos de VT, denominando-os VT1 e VT2, e SLT-I e SLT-II, respectivamente.

A citotoxigenicidade de VT1 ou SLT-I é neutralizada por antisoro para toxina Shiga (O'BRIEN et al., 1982). O outro grupo de verotoxinas consiste de SLTs

relacionadas antigenicamente, cuja citotoxigenicidade não é neutralizada por anticorpos anti toxina Shiga ou por soro anti-SLT-I. Membros deste grupo inclui a SLT-II variante (SLT-IIv ou VT2e), a qual está envolvida na doença do edema em suínos (SMITH et al., 1983; GANNON et al., 1988). Esta toxina é considerada uma variante porque, ao contrário da SLT-II, ela é inativa ou fracamente ativa em células HeLa (GYLES, 1994).

As verotoxinas inibem a síntese protéica em células eucariontes através da atividade da RNA N-glicosidase. As toxinas clivam uma ligação N-glicosídica específica no RNA ribossomal 28S, liberando um único resíduo de adenina impedindo o fator de alongamento do aminoacil do RNA transportador (IGARASHI et al., 1987; ENDO et al., 1988).

O receptor celular da verotoxina é um globotriosil ceramida (Gb3), não havendo alteração dos níveis de adenilato ciclase ou guanilato ciclase nos enterócitos de coelhos injetados com a verotoxina a nível de intestino. Uma sugestão para o acúmulo de líquido no lúme seria o grau de desequilíbrio entre os níveis de absorção e secreção causado pelo dano aos enterócitos nas extremidades das vilosidades intestinais (KEENAN et al., 1986).

A maioria das cepas *E. coli* que produzem a verotoxina SLT-IIv são hemolíticas e pertencem aos sorogrupos O138, O139 e O141 (SOJKA, 1971; LINGGOOD e THOMPSON, 1987). Ela é pouco enterotóxica quando comparada com as outras SLTs, e o intestino de suínos parece não responder com acúmulo de líquidos como no intestino de coelhos (GANNON e GYLES, 1990; MacLEOD et al., 1991). Os sorogrupos O138 e O139 podem produzir SLTII-v e enterotoxinas (HAREL et al., 1991; SALAJKA et al., 1992). Neste caso, os sinais da doença do edema podem não ser observados, pois a produção de líquidos induzida pelas enterotoxinas eliminaria a verotoxina do intestino, prevenindo sua absorção em quantidade suficiente para induzir ao quadro clínico (LINGGOOD e THOMPSON, 1987).

LINGGOOD e THOMPSON (1987) pesquisaram a produção de verotoxina em 49 cepas de *E. coli* dos sorogrupos O138:K81, O139:K82 e O141:K85, isoladas de suínos com diarreia e doença do edema. Todas as cepas associadas com sinais clínicos da doença do edema produziram esta toxina. Entretanto, o sorogrupo

O141:K85 também foi associado com cepas produtoras de enterotoxinas e, portanto, com casos de diarreia.

Devido a freqüente associação de cepas de *E. coli* hemolíticas em surtos de diarreia e doença do edema em suínos, hemolisinas foram investigadas por SMITH (1963) o qual encontrou duas destas. A primeira delas, denominada hemolisina alfa estava presente em sobrenadantes de culturas bacterianas e a segunda, denominada de beta-toxina, encontrava-se associada às células bacterianas. Ambas as toxinas lisaram eritrócitos de bovino, suíno, coelho, porquinho da índia e galinha.

A ação tóxica da hemolisina alfa é explicada pela citolisina formadora de poro permitindo que haja uma saída de íons e a manutenção da proteína citoplasmática resultando no aumento de pressão osmótica coloidal, havendo um influxo de água para o interior da célula e sua conseqüente lise. Este mecanismo possui importância na patogenicidade de cepas de *E. coli* de isolamentos extraintestinais em humanos. HACKER et al. (1983) mostraram que a deleção do gene determinante *hly* de uma cepa de *E. coli* uropatogênica reduziu a toxicidade para camundongos.

Em suínos, a hemolisina alfa não parece desempenhar um importante papel em infecções entéricas. SMITH e LINGGOOD (1971) demonstraram que a perda do plasmídeo para produção de hemolisina não tinha qualquer efeito observável na habilidade de induzir diarreia em neonatos ou desmamados ou para induzir a doença do edema em suínos desmamados.

Os genes para a produção da hemolisina alfa são algumas vezes localizados em plasmídios (SMITH e LINGGOOD, 1971), mas são mais freqüentemente localizados no cromossoma (WELCH, 1991).

Segundo SOJKA (1971) a capacidade hemolítica em ágar sangue é uma característica útil, mas não conclusiva, para o reconhecimento de cepas de *Escherichia coli* potencialmente patogênicas, pois no intestino de suínos sadios podem estar presentes cepas hemolíticas.

A enterohemolisina é uma hemolisina termolábil associada a célula, distinta das hemolisinas alfa e beta e que tem sido identificada em cepas de *E. coli* verotoxigênicas e em certas EPEC. BEUTIN et al. (1989) verificaram que entre 64 cepas de *E. coli* verotoxigênicas de várias origens e sorotipos, 60 (93,8%)

produziram a enterohemolisina. Apenas os isolamentos de origem suína foram negativos, os quais produziram a hemolisina alfa.

Em 1990, BEUTIN et al. comprovaram que em cepas de *E. coli* do sorogrupo O26, a produção de enterohemolisina foi mediada por um bacteriófago temperado. Neste mesmo trabalho, os autores sugeriram que a enterohemolisina seja uma proteína de 60000 D, associada a membrana externa. No entanto, seu papel na doença ainda não foi estabelecido.

Em 1974, SMITH relatou que algumas cepas septicêmicas de *E. coli* de origem bovina e ovina dos sorogrupos O15:H21 e O78:K80 produziram uma toxina letal para camundongos, coelhos e galinhas. A síntese desta toxina era associada com a presença de um antígeno de superfície. O plasmídeo responsável por esta síntese foi chamado Vir. Mais tarde, foi mostrado que algumas cepas de *E. coli* produziam a toxina, mas não o antígeno de superfície (LOPEZ-ALVAREZ et al., 1980). OSWALD et al. (1989) demonstraram o efeito citopático da toxina Vir em células HeLa, caracterizado por sua multinucleação.

Em algumas cepas de *E. coli* isoladas de casos de diarreia em humanos, suínos e bovinos, bem como de septicemia e infecções do trato urinário em humanos, foi detectado um fator necrotizante citotóxico (CNF) o qual induzia a formação de células gigantes, polinucleadas em culturas de células HeLa e Vero (CAPRIOLI et al., 1984, 1987; GONZALES e BLANCO, 1985; ALONSO et al., 1987; De RYCKE et al., 1987, 1990). Mais tarde, a produção de CNF foi associada com a presença da fímbria P e produção da hemolisina alfa (BLANCO et al., 1990). De RYCKE et al. (1987) e OSWALD et al. (1989) demonstraram que CNF e a citotoxina Vir são imunologicamente relacionados, e hoje são conhecidos como CNF1 e CNF2, respectivamente (De RYCKE et al., 1990).

Os papéis que CNF1 e CNF2 desempenham nas doenças não são conhecidos (GYLES, 1994).

Uma toxina termolábil chamada toxina distensora citoletal (CLDT) tem sido relatada em filtrados de culturas de certas cepas de *E. coli* associadas com doença diarreica em humanos (JOHNSON e LIOR, 1988). Ela causa lesões citotóxicas e distensão celular em células Vero, HeLa, Hep-2 e CHO, e é produzida em algumas

cepas também produtoras de verotoxina. No entanto, *in vivo* seu papel ainda não foi estabelecido.

2.7 PLASMÍDIOS DE VIRULÊNCIA

Os plasmídios são materiais genéticos extracromossomiais presentes em muitas células procarióticas, capazes de se dividirem independentemente do cromossomo (KONEMAN et al., 1997). Na maioria das circunstâncias, não são essenciais para o crescimento e metabolismo bacterianos, mas freqüentemente, entretanto, os plasmídios contêm informação genética para estruturas ou funções relacionadas à virulência bacteriana, incluindo genes para a resistência antimicrobiana, produção de fímbrias e produção de toxinas (ZGUR-BERTOK e GRABNAR, 1991). Algumas características bioquímicas incomuns em *E. coli*, tais como utilização de citrato (SATO et al., 1978; ISHIGURO e SATO, 1979), produção de urease (WACHSMUTH et al., 1979), produção de sulfito de hidrogênio (BRAUNSTEIN e MLADINEO, 1974) são todas características codificadas por plasmídios.

ØRSKOV e ØRSKOV (1966) demonstraram o papel dos plasmídios na transmissão de virulência de *E. coli*. Relataram que a síntese da fímbria K88 e a habilidade de utilizar a rafinose eram codificadas por plasmídios transmissíveis. Entretanto, em 1978, SHIPLEY et al. demonstraram que na maioria das cepas K88+ estes genes estão localizados em um plasmídio não conjugativo de aproximadamente 50Md. Algumas cepas contêm plasmídios conjugativos maiores, aparentemente resultando da recombinação entre um plasmídio Raf/K88 e um fator de transferência. A associação de genes codificando para K88 e rafinose reflete a abundância da rafinose ou de açúcares no intestino do suíno. É possível que esta associação favoreça a cepas enterotoxigênicas porque os genes que codificam a rafinose também codificam para enzimas envolvidas na degradação de açúcares que competem com receptores intestinais pelo sítio de ligação das fímbrias.

A síntese da fímbria K99 é controlada por um plasmídio conjugativo (SMITH e LINGGOOD, 1972) de aproximadamente 52 Md (SO et al., 1974).

SCHIFFERLI et al. (1990) comprovaram que os genes para a produção da fímbria 987P reside em um plasmídio de pelo menos 35 Md.

Ao contrário das fímbrias K88, K99 e 987P, os determinantes genéticos para a fímbria F41 estão localizados no cromossomo bacteriano (MOSELEY et al., 1986).

Em uma série de experimentos, SMITH e LINGGOOD (1971) demonstraram a natureza transmissível dos plasmídios para explicar seu papel na patogênese da diarreia em suínos causada por ETEC. Foi determinado que a presença de plasmídios para a produção de enterotoxina e do plasmídio para produção de K88 era suficiente para converter algumas cepas de *E. coli* da microbiota normal de animais sadios em enterotoxigênicas. No entanto, a presença dos plasmídios Ent ou K88, isoladamente, não foi suficiente para tornar a cepa virulenta, embora aquelas expressando K88 poderiam algumas vezes induzir uma forma leve de diarreia.

Em 1968, SMITH e HALLS foram os primeiros a mostrar que a produção de enterotoxina em *E. coli* era transmissível por conjugação.

Os genes que controlam a produção de enterotoxinas (LT e ST) de *E. coli* são localizados em plasmídios chamados plasmídios Ent. GYLES et al. (1974) demonstraram que pelo menos um plasmídio transmissível estava presente em 96% de cepas toxigênicas de *E. coli* de origem suína comparada com 38% de 37 cepas da microbiota presente nesta espécie animal. Não foram detectados plasmídios Ent entre as cepas isoladas de animais assintomáticos.

Segundo GYLES et al. (1974), os genes para STa são encontrados em plasmídios de pesos moleculares entre 21 a 80 Mdal. No entanto, HARNETT e GYLES (1985) encontraram estes plasmídios com pesos moleculares de 5,2 a 85 Mdal. Estes autores também verificaram que em cepas de origem suína, pode-se encontrar genes para STa, K99, resistência a antimicrobianos e produção de colicina em um único plasmídio.

Normalmente, os genes para enterotoxinas, fatores de colonização e resistência aos antimicrobianos se localizam em plasmídios separados (FRANKLIN et al., 1981; GONZALEZ e BLANCO, 1986). No entanto, há relatos da existência de genes, no mesmo plasmídio, que codificam para a enterotoxina STa e F4 ou F6 (FRANKLIN et al., 1981; SCHIFFERLI et al., 1990). GYLES et al. (1977) identificaram um plasmídio contendo genes codificando para LT, STa e resistência a tetraciclina, estreptomicina e sulfonamidas no mesmo plasmídio. Este plasmídio, isolado de uma cepa de *E. coli* de um suíno com diarreia, tinha cerca de 75 Mdal e

provavelmente originou-se da recombinação entre um plasmídeo ST+LT e um fator R. O uso de antimicrobianos na ração para fins terapêuticos e para a prevenção de doenças pode selecionar não apenas a manutenção de fatores de resistência, mas também para determinantes de virulência (ZGUR-BERTOK e GRABNAR, 1991).

Outros fatores de virulência incluem a aderência localizada por EPEC através do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), aderência de RDEC-1 através da fímbria AF/RI (WOLF et al., 1988), enterotoxina termoestável EASTI da EaggEC (SAVARINO et al., 1991) e propriedade invasiva de EIEC (SILVA et al., 1982).

Em cepas ETEC de origem humana, os plasmídios não-conjugativos que codificam as fímbrias CFAI e CFAII normalmente também determinam a síntese das enterotoxinas ST e/ou LT. Plasmídios CFAI-ST de 54-72 Md foram observados em cepas ETEC de vários sorotipos (McCONNELL et al., 1981; WILLSHAW et al., 1982). Cepas ETEC pertencentes aos sorotipos O6, O8, O80, O85 e O139 apresentaram um único plasmídeo não-conjugativo de 54 a 90 Md o qual codificava a síntese de CFAII, ST e LT (PENARANDA et al., 1983).

Em um estudo feito por ECHEVERRIA et al. (1985), cinco isolamentos de *E. coli* continham plasmídios os quais codificavam para resistência a tetraciclina e produção de STb no mesmo plasmídeo.

2.8 SOROGRUPOS O-K EM CEPAS PATOGÊNICAS SUÍNAS

As cepas comensais de *E. coli* são residentes do intestino grosso o qual contém diferentes cepas freqüentemente com um sorotipo dominante. A princípio, cada espécie animal é caracterizada por seus próprios sorotipos, embora alguns deles ocorram em mais do que uma espécie. As cepas patogênicas também tendem a ser hospedeiro-específicas, no entanto, têm a habilidade de colonizar habitats onde as comensais normalmente não sobreviveriam (DE GRAAF e MOOI, 1986).

Segundo SOJKA (1971), os principais sorogrupos associados com diarreia neonatal em suínos são: O8:K87, O45, O138:K81, O141:K85, O147:K89 e O149:K91. Os principais sorogrupos envolvidos em diarreia pós-desmame incluem: O8, O141, O147, O149 e O157 (WILSON e FRANCIS, 1986; HAREL et al., 1991).

Em cepas de *E. coli* verotoxigênicas associadas com a doença do edema em leitões desmamados os principais sorogrupos são: O138:K81; O139:K82, O141:K85a,b e O141:K85a,c (LINGGOOD e THOMPSON, 1987; GANNON et al., 1988). LANGENEGGER et al. (1974) relataram o primeiro surto da doença do edema em 57 criações no município de Concórdia, Santa Catarina, Brasil. Entre os 1919 leitões desmamados com idades entre 8 e 12 semanas, 1057 (55%) adoeceram, dos quais 620 (32,3%) morreram. No exame bacteriológico de 8 amostras isolou-se, a partir do conteúdo intestinal, cepas hemolíticas de *E. coli* cuja caracterização sorológica evidenciou os sorogrupos O139:K82 e O8:K87:K88.

LARIVIÈRE e LALLIER (1975) examinaram 112 cepas isoladas de suínos com diarreia com até 9 semanas de idade. Os sorogrupos O157:K“V17”, O149:K91 e O141:K85 foram encontrados em 14 (12,5%), 11 (9,8%) e 9 (8,0%) cepas, respectivamente. Os demais sorogrupos encontrados foram: O8:K87 em 8 (7,14%) cepas, O45:K“E65” em 6 (5,35%), O138:K81 em 6 (5,35%), O139:K82 em 4 (3,57%), O147:K89 em 2 (1,78%), O9:K9 em 1 (0,89%) e O101 em 1 (0,89%) cepa.

Em um estudo realizado em duas propriedades com 50 leitões com menos de 15 dias de idade com diarreia na Galícia, Espanha, GONZALEZ e BLANCO (1986) caracterizaram sorologicamente 57 cepas de *E. coli*. O sorogrupo O141:K85ab:987P ocorreu em 56 (98%) delas. A cepa restante pertenceu ao sorogrupo O101:K30:K99.

Em 1986, WILSON e FRANCIS identificaram os sorogrupos O em 223 cepas envolvidas em colibacilose suína. Os sorogrupos O149, O20 e O141 foram os mais prevalentes em 76 (34%), 28 (12,5%) e 22 (9,86%) cepas, respectivamente. Também foram encontrados os sorogrupos O157 em 16 isolamentos (7,17%), O8 em 15 (6,72%), O101 em 14 (6,27%), O9 em 5 (2,24%), O64 em 3 (1,34%), O138 em 2 (0,89%) e O45 em 1 (0,44%). Em 34 (15,24%) cepas não foi possível identificar a qual sorogrupo estas pertenciam.

NAKAZAWA et al. (1987) investigaram 214 cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia. Entre as 77 cepas isoladas no período neonatal, o sorogrupo O149:K88 ocorreu em 21 (27,27%) cepas, o O157 em 13 (16,88%) e o O101 em 11 (14,28%). Os sorogrupos O9, O141, O8, O78 e O147 foram encontrados em 4 (5,2%), 3 (3,9%), 2 (2,6%), 1 (1,3%) e 1 (1,3%) cepas, respectivamente. Entre as 137 cepas de diarreia pós-desmame o sorogrupo O8 foi o mais prevalente,

ocorrendo em 42 (30,6%) cepas. Os sorogrupos O149 e O157 foram, cada um, encontrados em 35 (25,5%) cepas. O sorogrupo O141 esteve presente em apenas 2 (1,45%) das cepas.

Na Suécia, SÖDERLIND et al. (1988) pesquisaram os sorogrupos O em 505 cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia. O sorogrupo O149 ocorreu em 214 (42,37%) cepas, principalmente em leitões de 1 a 6 semanas de idade. O sorogrupo O101 foi o segundo mais prevalente, sendo encontrado em 91 (18%) cepas. Os demais sorogrupos identificados foram O9, O64, O20, O8 e O141 com 45 (8,9%), 37 (7,3%), 34 (6,7%), 32 (6,3%) e 30(5,9%) cepas, respectivamente.

Na Hungria, 88 suínos com 4 a 10 semanas de idade que morreram devido a diarreia pós-desmame causada pela *E. coli*, foram investigados por NAGY et al. (1990). Entre 205 cepas, o sorogrupo O149 ocorreu em 115 (56%) cepas, principalmente associado ao K88. Entre 70 cepas isentas de antígenos de aderência conhecidos, o sorogrupo O139 ocorreu em 10 (4,87%) cepas; O141 e O147 em 7 (3,4%); O157 em 6 (2,92%) e O8 em 3 (1,46%) e O138 em 3 (1,46%).

SALAJKA et al. (1992) investigaram 1300 cepas hemolíticas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia pós-desmame. A maioria delas (72,4%) pertenceram aos seguintes sorogrupos: 154 (11,8%) ao O149; 145 (11,1%) ao O147; 142 (10,9%) ao O8; 132 (10,1%) ao O138; 107 (8,2%) ao O108; 85 (6,5%) ao O139; 61 (4,7%) ao O141; 53 (4,1%) ao O157; 45 (3,5%) ao O45 e 19 (1,5%) ao O119.

Na Espanha, GARABAL et al. (1996) estabeleceram os principais sorogrupos O entre em 562 cepas de *E. coli* isoladas de suínos. Os sorogrupos mais prevalentes foram: O138 em 77 cepas (13,7%), O141 em 74 (13,16%), O8 em 69 (12,27%), O101 em 65 (11,56%), O9 em 64 (11,38%), O149 em 64 (11,38%) e O20 em 59 (10,5%). Os demais sorogrupos encontrados foram: O157 em 21 (3,73%) cepas, O115 em 20 (3,55%), O153 em 14 (2,5%), O21 em 13 (2,3%), O45 em 13 (2,3%), O139 em 8 (1,4%) e O64 em apenas 1(0,17%).

No Brasil, foram realizadas algumas pesquisas abordando aspectos relacionados à colibacilose suína.

Em 1977, BARCELLOS e BAPTISTA identificaram nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina 21 surtos de colibacilose suína. Os sorogrupos O:K envolvidos foram: O“V17”: K“V17” em 4 (19%) isolamentos; O119:K“V113” em 4

(19%); O45:K“E65” em 3 (14,28%); O108:K“V189” em 2 (9,5%); O141:K85a,c em 2 (9,5%); O141:K85a,c:K88a,c em 2 (9,5%). Os sorogrupos O9:K“P16”, O35:K“V79”, O64:K“V142” e O138:K81 participaram com 1(4,76%) isolamento cada.

Em 1980, BARCELLOS et al. investigaram a causa das diarréias bacterianas no Rio Grande do Sul. Entre as 338 amostras de *E. coli* isoladas, destacaram-se oito sorogrupos, representando 85,46% dos isolamentos: O138:K81 em 57 (16,86%), O141:K85a,c em 46 (13,6%), O141:K85a,c:K88a,b em 41 (12,13%), O138:K81:K88a,c em 40 (11,83%), O108:K“V189” em 32 (9,46%), O157:K “V17” em 30 (8,87%), O149:K91:K88a,c em 25 (7,39%) e O8:K87:K88a,b em 18 (5,32%). Outros sorogrupos menos prevalentes foram: O45:K“E65” em 8 (2,36%) isolamentos, O115:K“V165” em 7 (2,07%), O139:K82 em 5 (1,47%), O157:K“V17”:K88a,c em 5 (1,47%) e O10:K“V50” em apenas 1 (0,29%) isolamento. A faixa etária de maior prevalência da colibacilose se situou no período logo após o desmame.

Em São Paulo, OLIVEIRA et al. (1982) sorotiparam 28 cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarréia. Onze (39,28%) delas pertenceram ao sorogrupo O101, 6 (21,42%) ao O149 e 2 (7,14%) ao O8 e 2 (7,14%) ao O117. As cepas restantes pertenceram aos sorogrupos O3, O7, O80, O86, O105, O138 e O142, sendo cada um representando um (3,57%) isolamento.

CASTRO et al. (1984) analisaram 477 amostras de *E. coli* isoladas de surtos de diarréia neonatal suína na região de Concórdia, Santa Catarina. Entre as 34 cepas identificadas quanto ao antígeno O, os sorogrupos mais prevalentes foram: 11(32,3%) O149, 6 (17,6%) O10 e 5 (14,7%) O35. Os demais sorogrupos foram: O108 em 3 (8,8%) isolamentos, O9, O64, O138 e O157 em 2 (5,8%) isolamentos cada um. O sorogrupo O139 esteve presente em apenas 1 (2,9%) das cepas pesquisadas.

GATTI et al. (1985) pesquisaram os sorogrupos O em 323 amostras de *E. coli* isoladas de suínos com diarréia em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os sorogrupos O141, O138 e O149 foram os mais prevalentes, sendo identificados em 76 (23,5%) e 64 (19,8%) e 38 (11,7%) amostras, respectivamente. Os sorogrupos O108, O157, O8 e O35 foram encontrados em 27 (8,3%), 25 (7,7%), 22 (6,8%) e 19 (5,8%) cepas, respectivamente. Os demais sorogrupos, menos freqüentes, foram o O139 em 12

(3,7%) amostras, O119 em 11 (3,4%), O 9 em 8 (2,4%), O45 em 8 (2,4%), O64 em 6 (1,8%), O10 em 3 (0,9%), 115 em 3 (0,9%) e O147 em apenas 1 (0,3%) isolamento.

Ao investigar casos de diarreia em leitões lactentes em 21 granjas no sudoeste do Paraná, BRITO et al. (1995) verificaram que a *E. coli*, isolada ou em associação com o rotavírus, representou o principal agente etiológico envolvido. Das 56 amostras de *E. coli* sorotipadas, 25 (44,6%) não corresponderam a nenhum sorogrupo testado e 7 (12,5%) autoaglutinaram. Os sorogrupos O9:K“P16” e O“V17”:K“V17” foram encontrados, cada um, em 6 (10,7%) amostras; O35:K“V79” e O108:K“V189” em 4 (7,1%); O139:K82 em 2 (3,5%) e O10:K“V50” e O10:K“V165” em 1 (1,7%) amostra cada.

2.9 ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA EM CEPAS PATOGÊNICAS SUÍNAS

Vários antígenos de aderência têm sido identificados em cepas de *E. coli* e relacionados a sua patogenicidade, e cada vez mais tem se tornado evidente o significativo papel destas estruturas na colonização de habitats onde as cepas comensais normalmente não sobrevivem (DE GRAAF, 1986).

A produção das fímbrias é um pré-requisito fundamental na colonização do intestino delgado por cepas ETEC que causam doenças entéricas em suínos. Os antígenos fimbriais associados com a colonização do epitélio intestinal em leitões neonatos são: K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41 e F42 (JONES e RUTTER, 1972; MORRIS et al., 1983; YANO et al., 1986; FAIRBROTHER et al., 1988). Nos casos de diarreia pós-desmame nestes animais, são encontradas as fímbrias K88, 2134P, F165, F107 e 8813 (FAIRBROTHER et al., 1986; SÖDERLIND et al., 1988; NAGY et al., 1992; SALAJKA et al., 1992; IMBERECHTS et al., 1994). BERTSCHINGER et al. (1990) descreveram a fímbria F107, associada ao sorogrupo O139, como a responsável pela colonização intestinal de suínos com a doença do edema.

SMITH e LINGGOOD (1971) demonstraram que cepas produtoras de enterotoxina, mas não do antígeno K88 não causavam doença, e bactérias K88+, não enterotoxigênicas, causavam apenas uma diarreia leve. Vários trabalhos têm mostrado a ocorrência destes importantes fatores de virulência em cepas ETEC.

WILSON e FRANCIS (1986) identificaram as fímbrias K88, K99, 987P e F41 em 223 cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia de 1 dia a 9 semanas de idade. A fímbria K88 ocorreu em 106 (47,5%) cepas; K99 em 30 (13,4%); 987P em 67 (30%) e F41 em 12 (5,4%).

Na Venezuela, GARCÍA et al. (1987) caracterizaram 56 cepas de *E. coli* isoladas de casos de diarreia neonatal suína quanto a presença de antígenos de aderência. Em 19 (34%) cepas as fímbrias foram assim distribuídas: 10 (K88), 6 (987P), 1(K99), 1 (K88, K99) e 1 (K88, 987P). As 37 (66%) cepas restantes não apresentaram antígenos de aderência, no entanto 10 destas produziram STa.

FAIRBROTHER et al. (1988) pesquisaram a prevalência de antígenos fimbriais entre 99 cepas de sorogrupos não clássicos (O64:K“V142”, O9:K103, O9:K“416”, O20:K101, O108:K“V189”, O115:K“V165” e O119:K“V113”) de *E. coli* isolados do conteúdo intestinal de suínos com diarreia de 1 a 7 semanas de idade. Nenhuma delas produziu a fímbria F4. A fímbria F5 ocorreu em 32 (32,3%) cepas, a F41 em 15 (15,1%), a F6 em 23 (23,2%) e a F165 em 5 (5%).

Na Suécia, SÖDERLIND et al. (1988) isolaram de suínos com diarreia 856 cepas de *E. coli*, das quais 505 foram investigadas quanto à presença de fímbrias. A fímbria K88 foi encontrada em 210 (41,5%) cepas; a fímbria K99 em 57 (11,2%) cepas e esteve associada principalmente aos sorogrupos O101 (31 cepas) e O64 (15 cepas). O antígeno 987P foi encontrado em 21 (4,1%) cepas, sendo a maioria do sorogrupo O141, e apenas 1 (0,2%) expressou a fímbria F41.

Na Hungria, NAGY et al. (1990) investigaram a presença de antígenos de aderência em 205 cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia. Em 126 (61,4%) delas a fímbria K88 esteve presente.

Em 1991, HAREL et al. examinaram 1226 cepas de *E. coli* isoladas de casos de diarreia em suínos de 1 a 60 dias de idade quanto à presença da fímbria K88. Ela foi encontrada em 287 (23,4%) cepas e esteve associada principalmente aos sorogrupos O8:K“4627”, O157:K“V17”, O147:K89 e O149:K91 em animais de 7 a 27 dias de idade.

IMBERECHTS et al. (1994) investigaram a prevalência da fímbria F107 em 50 cepas isoladas de casos de diarreia e/ou doença do edema entre 50 suínos com 4 a 12 semanas de idade. Os resultados obtidos através de imunofluorescência de

esfregaços de mucosa submetidos ao antisoro F107 revelaram que 35 (70%) cepas produziram fluorescência específica com este antisoro. Este trabalho também revelou que esta fímbria pode ser detectada em cepas de *E. coli* verotoxigênicas, verotoxigênicas e enterotoxigênicas, apenas enterotoxigênicas ou mesmo em cepas não toxigênicas.

Embora a maioria das cepas ETEC envolvidas em casos de diarreia neonatal em suínos produzam fatores de colonização conhecidos (K88, K99, 987P e F41), vários relatos indicam que apesar da atividade hemaglutinante manose-resistente frente a diferentes eritrócitos, não há a confirmação sorológica em testes de aglutinação para os fatores mencionados em algumas cepas ETEC, principalmente em casos de diarreia pós-desmame. Estas cepas são referidas como 4P- (NAKAZAWA et al., 1987; NAGY et al., 1990). A ausência das principais fímbrias nestas cepas sugere a existência de outros fatores de colonização.

Três cepas isoladas por ANING et al. (1983) a partir de leitões desmamados sadios não aglutinaram frente a antisoros específicos preparados contra as fímbrias F4, F5, F6, F41, CFAI e CFaII. Além disso, causaram a hemaglutinação apenas de eritrócitos de suínos.

No Brasil, YANO et al. (1986) identificaram em três cepas ETEC isoladas de diarreia neonatal em suínos uma nova fímbria, provisoriamente designada F42. Embora tenham mostrado microhemaglutinação manose-resistente (eritrócitos de humano, ovino, eqüino, cobaia e galinha) em culturas crescidas a 37°C, mas não a 18°C, estas cepas foram sorologicamente diferentes das cepas que possuem fatores de colonização conhecidos (K88, K99, 987P e F41). O antisoro preparado a partir de um antígeno fimbrial parcialmente purificado inibiu a MRMH de eritrócitos de galinha, bem como a aderência de uma das cepas às células HeLa e ao intestino de suíno. a qual aglutinou eritrócitos de humanos, ovinos, eqüinos, cobaias e galinhas.

Na Hungria, NAGY et al. (1990) relataram que em 205 isolamentos de *E. coli* obtidos de casos de diarreia pós-desmame, 33% não foram encontradas nenhuma das fímbrias conhecidas nesta espécie animal. Segundo o autor, estas cepas podem produzir outros tipos de antígenos de aderência desconhecidos que também facilitam a adesão dos microrganismos ao epitélio intestinal.

Na Austrália, KENNAN e MONCKTON (1990) investigaram duas cepas do sorogrupo O141, pois apesar de ser a principal causa de diarreia em leitões desmamados naquele país, este sorogrupo não expressava nenhuma das fímbrias caracterizadas até hoje. Estas cepas produziram fímbrias rígidas com um diâmetro menor que 5 nm e não demonstraram hemaglutinação manose-resistente frente aos eritrócitos testados, propriedades estas que são similares àquelas encontradas na fímbria 987P, além de não serem produzidas quando as bactérias cresciam a 18°C. Portanto, a partir desta caracterização parcial, os autores propuseram que uma nova fímbria estaria associada com cepas ETEC de suínos do sorogrupo O141.

Em 1992, NAGY et al. demonstraram o padrão de colonização do intestino delgado de suínos desmamados por duas cepas ETEC 4P-, mas possuidoras de apêndices filamentosos, pertencentes aos sorogrupos O141 e O157. A intensidade da colonização foi mais aparente 48 a 72 após a inoculação e ocorreu preferencialmente nas vilosidades que cobrem as placas de Peyer. As cepas ETEC clássicas tendem a colonizar 24 horas após a inoculação. A partir das características morfológicas e de interação ao epitélio intestinal encontradas, os autores sugerem que estas bactérias produzem uma nova fímbria.

SALAJKA et al. (1992) isolaram entre 212 cepas ETEC de suínos com diarreia pós-desmame 47 (22%) cepas K88+ e apenas 3 (1,4%) possuíam as fímbrias K99/F41. No entanto, 83 (39%) cepas expressaram um novo fator de colonização, o 8813. Dois leitões desmamados foram inoculados com a cepa O138:"8813", STa+ para verificar a adesão *in vivo* à mucosa intestinal. A colonização intestinal induzida por este antígeno ocorreu de maneira similar ao da fímbria K88. Os autores não puderam determinar se este novo fator de colonização está relacionado àqueles descritos por ANING et al. (1983) e KENNAN e MONCKTON (1990).

No Brasil, OLIVEIRA et al. (1981) isolaram 33 cepas ETEC de suínos com diarreia na região de São Paulo. A pesquisa dos antígenos fimbriais foi realizada através da microhemaglutinação manose-resistente (MRMH) e testes sorológicos. Oito (24,2%) cepas expressaram a fímbria F4, 8 (24,2%) a fímbria F5 e 4 (12%) a CFA/I. Todas as cepas F4+, F5+ e CFA/I+ foram MRMH+, mas 4 cepas produtoras

de ST+ e MRMH+, não apresentaram nenhuma destas fímbrias. Isto sugere que outros fatores de colonização estariam associados a estas cepas.

Em Concórdia, CASTRO et al. (1984) isolaram 477 amostras de *E. coli* de suínos com diarreia neonatal. Em 57 (12%) delas foram detectados os fatores de colonização K88, K99 e 987P. Os antígenos K88 e K99 foram detectados em 28 (49,1%) e 26 (45,6%) cepas ETEC, respectivamente. O antígeno 987P foi encontrado em 3 (5,2%) cepas não enterotoxigênicas.

GATTI et al. (1985) isolaram 323 cepas de *E. coli* de suínos com diarreia em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os antígenos K88 e K99 foram pesquisados entre 93 cepas através da prova de soroaglutinação em lâmina. Em 27 (29%) delas foi encontrado o antígeno K88, e em apenas 4 (4,3%), o K99. Em 137 amostras escolhidas ao acaso, 12 (8,75%) reagiram com o antisoro 987P.

CARVALHO et al. (1991) examinaram a presença dos fatores de colonização K88, K99 e 987P em 100 cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia na região de Ribeirão Preto, São Paulo. Apenas uma cepa expressou o antígeno 987P, enquanto as fímbrias K88 e K99 estiveram presentes em 16 e 21 cepas, respectivamente. Em 12 cepas ETEC não foram encontradas nenhuma das fímbrias investigadas.

FERREIRA et al. (1997) avaliaram a presença de fímbrias em 84 cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia em 16 granjas na região de Londrina, Paraná. Os antígenos K88, K99 e 987P foram encontrados em 16 (19%), 1 (1,2%) e 29 (34,5%) cepas, respectivamente.

Algumas cepas ETEC isoladas de suínos podem expressar dois ou mais fatores de colonização. SCHNEIDER e TO (1982) descreveram uma cepa ETEC O149:K91:H10 isolada de um leitão com diarreia neonatal que produziu K88 e 987P. Em 1987, SUAREZ et al. isolaram 6 cepas ETEC de leitões de 9 a 15 dias de idade que, *in vitro*, expressaram as fímbrias K88 e 987P.

2.10 PARTICIPAÇÃO DE ENTEROTOXINAS EM DIARRÉIA SUÍNA

As cepas enterotoxigênicas de *E. coli* isoladas de casos de diarreia em suínos podem elaborar várias combinações das enterotoxinas LT, STa e STb (GYLES, 1992).

LARIVIÈRE e LALLIER (1976) pesquisaram a produção de ST e LT em 60 cepas ETEC isoladas de suínos com diarreia. Apenas 12 (20%) delas foram ST+ e 48 (80%) produziram as duas enterotoxinas.

HARNETT e GYLES (1985) investigaram a produção das enterotoxinas STa e STb em 11 cepas ETEC de origem suína. Quatro delas foram STa+ e 2 STb+, e em 5 cepas houve a produção concomitante das enterotoxinas.

GONZALEZ e BLANCO (1986) pesquisaram a produção das enterotoxinas LT e STa em 83 cepas de *E. coli* isoladas de leitões com menos de 15 dias de idade apresentando diarreia. Nenhuma delas formou LT e 57 (68,7 %) produziram STa.

Entre 223 isolamentos de *E. coli* envolvidas em colibacilose em suínos, WILSON e FRANCIS (1986) determinaram a produção das enterotoxinas LT e/ou ST. O sorogrupo O149.

Um total de 567 cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia neonatal e de pós-desmame foram investigadas por NAKAZAWA et al. (1987) quanto a produção de enterotoxinas LT e STa. Das 300 cepas obtidas dos casos de diarreia neonatal, 77 (25,7 %) produziram enterotoxinas assim distribuídas: 52 (67,5%) LT+, 19 (24,7%) STa+ e 6 (7,8%) LT + STa+. Das 267 cepas isoladas de leitões com diarreia pós-desmame, 137 produziram enterotoxinas igualmente distribuídas: 46 (33,6%) LT+, 45 (32,8%) STa+ e 46 (33,6%) LT + STa+.

Na Suécia, SÖDERLIND et al. (1988) investigaram os fatores de virulência em 856 cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia divididos em três grupos de acordo com a idade: grupo 1: 1 a 6 dias, grupo 2: 1 a 6 semanas e grupo 3: acima de 6 meses.

Ao investigarem a patogenicidade de 18 cepas de *E. coli* O115:K“V165” isoladas de suínos com diarreia com 1 a 8 semanas de idade, FAIRBROTHER et al. (1989) verificaram que 12 (66,7%) cepas foram STb+. No entanto, apenas 2 delas foram capazes de induzir diarreia em leitões recém-nascidos privados de colostro.

NAGY e MOON (1990) analisaram 70 cepas de *E. coli* K88- quanto à produção de STa, STb e LT pela técnica de hibridização e produção de VT em células Vero. Em nenhuma delas confirmou-se a presença de gens para LT. Em 34 (48,6%) cepas observou-se o perfil LT-, VT-, STa+, e/ou STb+. Em 17 (24,3%), LT-, STa+, STb+, e/ou VT+. As 19 cepas restantes não produziram toxinas.

SALAJKA et al. (1992) pesquisaram 393 cepas toxigênicas de *E. coli* de leitões com diarreia pós-desmame. Destas, 322 (82%) produziram as toxinas LT e/ou ST, VT e/ou ST e VT. A maioria das cepas produtoras de VT pertenceram ao sorogrupo O139. Em 19 cepas do sorogrupo O138 e 4 do O141 houve produção de VT e ST.

Na Espanha, GARABAL et al. (1996) estudaram 1334 colônias de *E. coli* isoladas de suínos sadios (163), com doença do edema (51) e com diarreia (1120). A produção de toxinas (STa, LT, VT e CNF1) foi detectada em 280 colônias. Entre estas, 267 (95,4%) foram enterotoxigênicas (STa e/ou LT), 51 (18,2%) verotoxigênicas (VT+) e 7 (2,5%) produziram CNF1.

No Brasil, alguns trabalhos se dedicaram à pesquisa de enterotoxinas em cepas de *E. coli*. Em 1982, OLIVEIRA et al. investigaram no estado de São Paulo 700 amostras de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia, quanto à produção da enterotoxina LT e 500 daquelas foram analisadas quanto à produção de STa. A primeira foi encontrada em 14 (2%) amostras; a segunda, em 23 (4,6%). Não houve a produção simultânea de LT e STa em nenhuma das amostras.

Em Porto Alegre, DE CASTRO et al. (1984) examinaram a frequência da produção de LT, STa e STb entre 323 amostras de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia. A produção de LT e STa ocorreu em 56 (17,3%) e 33 (10,2%) cepas, respectivamente. Entre 125 cepas STa-, 31 (24,8%) foram STb+. Onze cepas do sorogrupo O149 produziram LT e STb.

DE CASTRO et al. (1984) investigaram em Concórdia, Santa Catarina, 477 amostras de *E. coli* isoladas de suínos quanto à produção de LT, STa e STb. A produção de LT e STa ocorreu em 86 (18%) e 8 (1,7%) amostras, respectivamente. Das 391 cepas STa-, 49 (12,53%) produziram STb.

CARVALHO et al. (1991) pesquisaram a produção das enterotoxinas LT, STa e STb em 100 cepas de *E. coli* isoladas de suabes fecais obtidos de suínos entre 1 a

10 dias e 25 a 35 dias de idade, com diarreia, na região de Ribeirão Preto, São Paulo. Apenas 5 delas foram LT+, 3 STa+ e 24 STb+.

Na região de Londrina, Paraná, FERREIRA et al. (1997) analisaram 66 cepas quanto à produção de STa. No ensaio biológico, 16 (24,2%) cepas foram positivas. Entre as 89 cepas pesquisadas para a produção de LT, 50 (56,2%) produziram esta enterotoxina.

2.11 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Com a utilização abusiva e indiscriminada dos antimicrobianos, têm surgido muitas cepas bacterianas resistentes a estas drogas. Por se tornarem cada vez mais ineficazes, é imprescindível o estabelecimento do padrão de resistência de cepas patogênicas de *E. coli* frente a diferentes antimicrobianos. Vários trabalhos têm estabelecido o perfil de resistência destas cepas.

Na província de Quebec, Canadá, LARIVIÈRE e LALLIER (1976) examinaram 112 cepas isoladas de suínos com diarreia quanto a enterotoxigenicidade, padrão bioquímico e suscetibilidade aos antimicrobianos (estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, furacin e ampicilina). 107 (95,5%) foram resistentes à estreptomicina; 101 (90,1%) à tetraciclina; 24 (21,4%) ao cloranfenicol; 24 (21,4%) à neomicina; 22 (19,6%) à ampicilina e 1 (0,9%) ao furacin. Cinco (4,4%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos utilizados.

SAIDA et al. (1981) testaram 796 cepas de *E. coli* isoladas de suínos quanto à resistência aos seguintes antimicrobianos: sulfanilamida, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina e ampicilina. As maiores freqüências de cepas resistentes ocorreram com a sulfanilamida, estreptomicina e tetraciclina, com 664 (83,4%), 662 (83,2%) e 719 (90,3%), respectivamente. Quanto à canamicina, ampicilina e cloranfenicol, 321 (40,3%), 239 (30%) e 136 (17,1%) cepas foram resistentes a estes antimicrobianos.

HARNETT e GYLES (1984) investigaram a resistência a antimicrobianos (ampicilina, cloranfenicol, canamicina, sulfametoxazol e tetraciclina) de 34 cepas de *E. coli* de origem suína. Em 31 (91,1%) cepas demonstrou-se a resistência às sulfonamidas, em 26 (76,4%) à tetraciclina, em 25 (73,5%) à estreptomicina, em 18

(53%) à ampicilina, em 11 (32,3%) à canamicina e em apenas 2 (5,8%) ao cloranfenicol. Uma múltipla resistência foi comum entre as cepas. Em 23 (67,6%) cepas a resistência ocorreu a pelo menos três drogas, e 13 (38,2%) cepas foram resistentes a cinco ou mais drogas. A resistência ao cloranfenicol e canamicina foi menos comum do que outras drogas, possivelmente refletindo a frequência menor de uso destes agentes antimicrobianos em suínos. Em 1985, estes mesmos pesquisadores determinaram a resistência aos antimicrobianos estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina de três cepas ETEC de origem suína. Duas delas foram resistentes as três drogas, e uma delas, ao sulfametoxazol e tetraciclina.

Em um estudo feito na Galícia, Espanha, GONZALEZ e BLANCO (1986) investigaram a suscetibilidade aos antimicrobianos (gentamicina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, canamicina, ampicilina e polimixina) de 57 colônias de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia. Destas, 34 (59,6%) foram resistentes, ao mesmo tempo, à gentamicina, estreptomicina e tetraciclina; 12 (21%) à estreptomicina e tetraciclina; 9 (15,7%) à estreptomicina e cloranfenicol e 1 (1,7%) à estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol. Uma cepa foi resistente a apenas 1 antimicrobiano (estreptomicina).

Na Venezuela, GARCÍA et al. (1987) caracterizaram 56 cepas de *E. coli* isoladas de casos de diarreia neonatal suína quanto a enterotoxigenicidade, presença de fímbrias, presença de plasmídios e suscetibilidade aos antimicrobianos (tetraciclina, gentamicina, ampicilina, nitrofurantoína, cloranfenicol, estreptomicina, cefoxitina, canamicina e tobramicina). As maiores frequências de resistência ocorreram com a tetraciclina e cefoxitina com 55 (98,2%) e 40 (71,4%) cepas resistentes, respectivamente. Os demais antimicrobianos apresentaram as seguintes resistências: ampicilina 32 (57,1%), nitrofurantoína 32 (57,1%), canamicina 26 (46,4%), tobramicina 19 (33,9%), estreptomicina 13 (23,2%), gentamicina 12 (21,4%) e cloranfenicol 6 (10,7%).

BROES et al. (1988) caracterizaram 12 cepas ETEC O8:KX105 isoladas de suínos quanto à resistência aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina, canamicina, espectinomicina, estreptomicina, tetraciclina, sulfonamidas e trimetoprim-sulfametoxazol. Todas as cepas foram resistentes à estreptomicina; 11 (91,6%) à associação trimetoprim-sulfametoxazol; 8 (66,6%) à

canamicina; 7 (58,3%) à espectinomicina; 7 (58,3%) à ampicilina; 5 (41,6%) ao cloranfenicol; 1 (8,3%) à tetraciclina e 1 (8,3%) à cefalotina. As cepas foram resistentes a pelos dois antimicrobianos.

Em 1991, ZGUR-BERTOK e GRABNAR determinaram a resistência aos antimicrobianos (estreptomicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim, canamicina e ácido nalidíxico) em 3 cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia. Todas foram resistentes a pelo menos três drogas (cloranfenicol, tetraciclina e trimetoprim). Uma das cepas mostrou resistência a todos os antimicrobianos utilizados, exceto ao ácido nalidíxico.

CARVALHO et al. (1991) isolaram 100 cepas de *E. coli* obtidas de suínos com diarreia neonatal e pós-desmame em São Paulo, Brasil e investigaram a sensibilidade aos antimicrobianos (ácido nalidíxico, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, canamicina, lincomicina, penicilina, novobiocina, neomicina, nitrofurantoína e tetraciclina). Todas as cepas submetidas ao antibiograma foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. As maiores porcentagens observadas foram à penicilina (82%), tetraciclina (93%) e cefalotina (72%).

2.12 VACINAS

As maiores perdas econômicas na suinocultura ocorrem a partir do nascimento até o desmame, sendo a diarreia por *E. coli* a causa mais comum de morbidade e mortalidade em suínos (BARCELLOS, 1980; WILSON e FRANCIS, 1986; VAN BEERS-SCHREURS, 1992). Em 1991, foi estimado nos Estados Unidos que 7% dos leitões entre 0 a 4 dias de idade apresentaram diarreia, a maioria sendo causada pela *E. coli*, com uma taxa de mortalidade próxima a 50% (USDA, 1991).

Vários aspectos contribuem para a baixa imunocompetência do leitão ao nascimento, tornando-o altamente suscetível aos agentes infecciosos. A placenta epiteliocorial não permite a passagem de anticorpos maternos para o feto, nascendo o leitão sem a proteção da imunidade passiva (GASKINS e KELLEY, 1995). Além disso, o sistema imune do leitão recém-nascido é anatomicamente e funcionalmente imaturo, tornando a sobrevivência dependente da transferência passiva dos

anticorpos maternos no colostro e leite (STOKES e BOURNE, 1989). As gamaglobulinas são absorvidas a partir do intestino, principalmente do jejuno, de leitões recém-nascidos, mas esta absorção cessa 24 a 36 horas após o nascimento (REIS, 1981).

Na diarreia pós-desmame a taxa de mortalidade é menor do que na colibacilose neonatal, entretanto os fatores predisponentes são mais complexos. Fatores nutricionais, fisiológicos, *stress* ambiental, infecções concurrentes com o *Rotavirus* e a diminuição da proteção local fornecida pelos anticorpos colostrais contribuem para o estabelecimento do problema (BARCELLOS, 1980; MOON e BUNN, 1993; NABUURS, 1998).

Na tentativa de reduzir as perdas decorrentes das colibaciloses, estudos têm sido desenvolvidos para a utilização de vacinas efetivas nestas criações (ISAACSON, 1994). Muitas das vacinas utilizadas comercialmente são bacterinas de células totais administradas oral ou parenteralmente em porcas prenhes ou marrãs as quais irão transferir passivamente os anticorpos maternos aos leitões através do colostro e leite. A eficiência destas vacinas resulta principalmente da produção de anticorpos dirigidos contra os fatores de colonização. Nos anos de 1960 e 1970, as bacterinas foram utilizadas com resultados de variável a pobre (JONES et al., 1962; CARDELLA et al., 1974).

A aderência de cepas virulentas de *E. coli* ao epitélio intestinal de animais infectados é essencial para o desenvolvimento da diarreia (SMITH e LINGGOOD, 1971). As fímbrias, estruturas responsáveis por esta etapa, são constituídas por proteínas altamente antigênicas, as quais são facilmente reconhecidas pelas células do sistema imune. A inibição desta etapa, mediada por anticorpos, torna-se o principal mecanismo de defesa contra estes patógenos.

WILSON et al. (1972), verificaram através de hemaglutinação a presença de anticorpos pós-vacinais no colostro e no soro de leite de porcas imunizadas pela via intramamária com cepa de *E. coli* O149:K91;K88ac:H10. Os títulos de anticorpos no colostro foram 10 vezes maiores do que o grupo não vacinado, mostrando a eficácia deste procedimento na profilaxia da colibacilose.

Em 1973, RUTTER e JONES imunizaram 4 marrãs com uma preparação parcialmente purificada da fímbria K88 com óleo mineral como adjuvante, via

intramária, 11 semanas antes do parto. Os leitões foram desafiados oralmente com uma cepa do sorotipo O149:K91:K88ac:H10. Apenas 4 dos 31 leitões provenientes das marrãs vacinadas morreram de diarreia com sinais clínicos menos severos. A redução da mortalidade entre os leitões provenientes de marrãs vacinadas foi significativa estatisticamente.

Em 1976, RUTTER et al. concluíram, a partir de testes *in vitro* com soro e secreções mamárias de porcas vacinadas e não vacinadas, que a neutralização da fímbria K88 com anticorpos específicos contribuiu significativamente para a proteção da leitegada de porcas vacinadas.

MOON (1981) avaliou a proteção conferida por vacinas vivas e mortas de ETEC K99+ ou 987P+ administradas oralmente a marrãs. As vacinas ETEC vivas produziram anticorpos colostrais contra estes antígenos fimbriais. As vacinas não ETEC vivas e as ETEC mortas estimularam pouco ou não produziram anticorpos contra as fímbrias, tornando os animais suscetíveis à infecção.

Outros trabalhos confirmaram que os antígenos de aderência poderiam servir como vacinas efetivas contra as doenças induzidas pela ETEC (NAGY et al., 1978; MORGAN et al., 1978).

A vacinação de leitões contra a diarreia pós-desmame por *E. coli* tem sido investigada. Como estes animais não mais recebem anticorpos maternos, é necessário estimular a imunidade ativa para protegê-los. Os dados que demonstram a eficiência de vacinas parenterais são limitados, pois há pouca estimulação do sistema imune da mucosa intestinal e a IgG produzida sistemicamente é liberada inadequadamente da corrente sangüínea para o lúme intestinal (MOON e BUNN, 1993). PORTER et al. (1974) verificaram o efeito da imunização oral diária de leitões com 10 dias de idade com uma bacterina. Aos 21 dias estes animais foram desafiados com cepa comprovadamente patogênica do sorotipo O149:K91:K88ac. O efeito da colonização intestinal foi avaliado pela cultura de fezes destes animais após o desafio. Observou-se um atraso no estabelecimento do fenômeno de colonização comparativamente com o grupo controle e o número de UFC/g nas fezes. Observou-se, além disto, maior ganho de peso nos animais vacinados. Os autores acreditam que a produção de IgA local teve um papel preponderante impedindo a colonização pela *E. coli*.

Vacinas orais têm sido desenvolvidas para prevenir infecções por *E. coli* em leitões desmamados. FRANCIS e WILLGOHS (1991) avaliaram a eficácia de uma vacina viva avirulenta K88+ e LT+ em prevenir a colibacilose de leitões desmamados. Os animais foram vacinados oralmente aos 14 e 19 dias de idade. Amostras fecais foram colhidas de todos os leitões antes de cada vacinação e do desafio para certificar-se da ausência de *E. coli* hemolítica K88+. Todos os leitões foram desafiados oralmente 14 dias após a primeira vacinação. Entre os 33 animais vacinados, apenas um apresentou diarreia, mas não morreu. Do grupo controle, 17 apresentaram diarreia e 11 morreram.

Outro fato que desafia a produção de uma vacina efetiva contra a diarreia pós-desmame é que em muitas cepas os antígenos fimbriais não são identificados e, portanto, não são incluídos nas vacinas comerciais.

Outros antígenos de superfície tem sido testados como possíveis imunógenos. MOON e RUNNELS (1983) demonstraram que a vacinação apenas com o antígeno O101 de uma cepa ETEC não provocou uma resposta imune em suínos, mesmo quando se utilizou uma cepa não capsulada. No entanto, a vacinação contra o antígeno capsular K30 evocou uma resposta protetora frente ao desafio com uma cepa portadora de K30. A produção de uma vacina contra a colibacilose suína dos neonatos necessita da inclusão dos principais antígenos K de cepas ETEC, o que exige a constante investigação sobre as frequências das mesmas em uma determinada região. Com relação aos antígenos de aderência, devido à pouca variedade destas, a produção de uma vacina é facilitada, além de provocar uma melhor resposta imunogênica e protetora.

As enterotoxinas termoestáveis (ST) têm baixo peso molecular e portanto são pouco imunogênicas. A enterotoxina termolábil (LT) é uma proteína altamente antigênica que pode atuar como antígeno protetor nas vacinas de *E. coli* não permitindo o desequilíbrio osmótico do enterócito. No entanto, a vacinação com LT não afeta a colonização e a proteção conferida não se estende para cepas produtoras de ST (FRANTZ e MELLENCAMP, 1983; ISAACSON, 1994).

Para a prevenção da doença do edema, MacLEOD e GYLES (1991) inativaram a toxina SLT-IIv com glutaraldeído e demonstraram que os suínos imunizados parenteralmente ou passivamente através de injeção peritoneal de

antitoxina foram protegidos contra uma dose letal da toxina purificada. Em 1992, GORDON et al. atenuaram a toxina SLT-IIv trocando o aminoácido na posição 167 pela glutamina. Os suínos vacinados com esta toxina mutante produziram anticorpos neutralizantes.

As vacinas autógenas são empregadas quando não há vacinas comerciais disponíveis ou quando estas não estão controlando a doença adequadamente. Isto pode ocorrer quando o sorotipo presente na granja difere daqueles incluídos na vacina comercial.

Embora a vacinação desempenhe um importante papel na prevenção de doenças causadas pela *E. coli*, estratégias de manejo que empregam medidas sanitárias melhoradas, o uso de antimicrobianos e assegurar que os neonatos recebam colostro logo após o nascimento são importantes na redução da doença e permanecem como parte integral da prevenção da doença (ISAACSON, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL ANALISADO

Nos anos de 1996 a 1999, no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, foram examinadas quanto a presença de *Escherichia coli*, 42 amostras de conteúdo intestinal, oriundas de surtos de diarreia em suínos, pertencentes a 42 propriedades localizadas no Estado do Paraná.

TABELA 10 - ORIGEM DAS 42 AMOSTRAS DE *E. coli* ISOLADAS NO PARANÁ

AMOSTRA	IDADE	MUNICÍPIO
1	Desmame	TOLEDO
2	Desmame	IRATI
3	Desmame	MARECHAL CÂNDIDO RONDON
4	Desmame	LAPA
5	Desmame	PÉROLA
6	Desmame	DOIS VIZINHOS
7	Desmame	IRATI
8	Desmame	SÃO JORGE D'OESTE
9	Desmame	UMUARAMA
10	Desmame	SÃO MIGUEL DO IGUAÇU
11	Desmame	TAMBOARA
12	Neonatal	CASCABEL
13	Desmame	CAMPO MOURÃO
14	Neonatal	LONDRINA
15	Desmame	ASTORGA
16	Neonatal	DOIS VIZINHOS
17	Desmame	GUARAPUAVA
18	Desmame	MANOEL RIBAS
19	Desmame	LAPA
20	Desmame	IVAIPORÃ
21	Desmame	MARIÓPOLIS
22	Desmame	SARANDI
23	Desmame	ITAMBÉ
24	Desmame	CHOPINZINHO
25	Desmame	SIQUEIRA CAMPOS
26	Desmame	PARANACITY
27	Desmame	QUATIGUÁ
28	Desmame	JAPIRA
29	Desmame	ARAPOTI
30	Desmame	ENÉAS MARQUES
31	Desmame	UNIÃO DA VITÓRIA
32	Desmame	PIRAQUARA
33	Neonatal	PALOTINA
34	Desmame	NOVA SANTA ROSA
35	Desmame	SANTA CRUZ DO MONTE CASTELO
36	Desmame	MUNHOZ DE MELO
37	Desmame	CURITIBA
38	Neonatal	NOVA SANTA ROSA
39	Desmame	CAFELÂNDIA
40	Desmame	MARMELEIRO
41	Neonatal	SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
42	Desmame	CIANORTE

3.2 METODOLOGIA EMPREGADA

3.2.1 Colheita das amostras de conteúdo intestinal

Essas amostras foram obtidas de segmentos de alças intestinais, ligadas nas extremidades, colhidas com o máximo de assepsia durante a necrópsia. As peças eram embaladas em sacos plásticos apropriados, devidamente identificados, e após o acondicionamento em caixas de isopor com blocos de gelo, eram remetidas ao laboratório onde eram efetuadas as análises bacteriológicas*.

3.2.2 Preparo das amostras

As amostras de segmentos de alças intestinais foram abertas com a utilização de tesoura e pinça esterilizadas e as análises efetuadas a partir do conteúdo intestinal.

3.2.3 Isolamento e identificação bioquímica de *Escherichia coli*

3.2.3.1 Plaqueamento

A partir das amostras de conteúdo intestinal, foram efetuadas sementeiras com a utilização de alça de cromo níquel em placas de Petri contendo ágar sangue e ágar MacConkey (QUINN et al., 1994). Após incubação a 37°C por 24-48 horas, as colônias hemolíticas ou não em ágar sangue e aquelas fermentadoras da lactose no ágar MacConkey, foram repicadas em meio TSI para a identificação presuntiva.

3.2.3.2 Identificação presuntiva

As colônias fermentadoras da lactose foram inoculadas em tubos contendo ágar com três açúcares e ferro (TSI) os quais eram incubados a 37°C por 24-48 horas. Na superfície deste meio, o crescimento bacteriano que apresentava reações

* conforme a recomendação constante na apostila do IPVDF (1981)

bioquímicas compatíveis com aquelas produzidas pela *Escherichia coli*, ou seja, fermentação total do tubo (fermentação da glicose no fundo do tubo e da lactose no ápice), produção de gás e não produção de H₂S, foram então submetidos a prova do IMViC (KONEMAN et al., 1997).

3.2.3.3 Identificação definitiva

Microrganismos com um perfil bioquímico no IMViC compatível com espécie *Escherichia coli* (Indol +, VM +, VP -, C -), foram submetidos a identificação definitiva preconizada por FORBES et al (1998). As provas complementares incluíram: prova da urease, fenilalanina desaminase e lisina descarboxilase (Tabela 3).

3.2.4 Caracterização sorológica dos antígenos somáticos O-K

As cepas de *Escherichia coli* identificadas através de provas bioquímicas foram mantidas em meio de manutenção de Lignières (BIER, 1985), seladas e posteriormente enviadas ao Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CPVDF), no laboratório de Patologia Suína, em Guaíba, Rio Grande do Sul.

Colônias bem isoladas crescidas em ágar sangue foram misturadas, com o auxílio da alça de níquel cromo, com uma gota de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e uma gota de um *pool* de antisoros O-K (diluído 1:10) sobre uma lâmina de microscopia. Se ocorresse a aglutinação, as cepas eram então submetidas aos antisoros separadamente.

3.2.5 Caracterização sorológica dos antígenos somáticos de aderência

As cepas de *Escherichia coli* identificadas através de provas bioquímicas foram mantidas em meio de manutenção de Lignières (BIER, 1985), seladas e posteriormente enviadas ao Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo.

3.2.6 Sensibilidade e resistência aos antimicrobianos

No laboratório de Bacteriologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, as cepas isoladas foram submetidas a testes de sensibilidade através do método de difusão em ágar, segundo a técnica do disco único de BAUER et al. (1966). Foram utilizados discos da marca Cecon, cujo controle de qualidade foi realizado com a cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, com os seguintes princípios ativos e concentrações:

Ácido nalidíxico	(30 µg)
Ampicilina	(10 µg)
Canamicina	(30 µg)
Cefalotina	(30 µg)
Cloranfenicol	(30 µg)
Estreptomicina	(10 µg)
Gentamicina	(10 µg)
Neomicina	(30 µg)
Nitrofurantoína	(300 µg)
Norfloxacina	(10 µg)
Penicilina	(10 U.I.)
Polimixina	(300 µg)
Sulfonamida	(300 µg)
Sulfametoxazol	(25 µg)
Tetraciclina	(30 µg)

Foram transferidas 5 colônias de cada cepa isolada em ágar sangue para tubos contendo 5 ml de caldo Mueller Hinton e incubados a 37°C por 12 horas. Esta cultura foi diluída em solução fisiológica a 1:50 de modo a se obter uma turbidez equivalente ao padrão de referência de sulfato de bário (0,5 da escala de Mac Farland). A inoculação das placas foram realizadas com swabs umedecidos nestas

culturas e os discos de antimicrobianos foram depositados nas placas manualmente, com o auxílio de uma pinça esterilizada.

Após 18 a 24 horas de incubação a 37% foi usada uma régua transparente e milimetrada para determinar precisamente o diâmetro (em mm) do halo de inibição.

A interpretação, realizada de acordo com a medida do halo de inibição, para cada droga, baseou-se nas especificações contidas na Tabela 11.

TABELA 11 - INTERPRETAÇÕES DAS ZONAS DE INIBIÇÃO

ANTIMICROBIANOS	SIGLA	CONCENTRAÇÃO DO DISCO	ZONAS DE INIBIÇÃO EM MILÍMETRO		
			resistente	intermediário	sensível
Penicilina	PN	10 UI	11	12-21	22
Ampicilina	AP	10 mcg	13	12-13	14
Cefalotina	CF	30 mcg	14	15-17	17
Gentamicina	GN	10 mcg	12	13-14	15
Neomicina	NO	30 mcg	12	13-16	17
Estreptomicina	ET	10 mcg	11	12-14	15
Canamicina	KN	30 mcg	13	14-17	18
Sulfonamida	SF	300 mcg	12	13-16	17
sulfa + trimetoprim	SFT	25 mcg	10	11-15	16
Tetraciclina	TT	30 mcg	14	15-18	19
Cloranfenicol	CO	30 mcg	12	13-17	18
ácido nalidíxico	NA	30 mcg	13	14-18	19
Norfloxacina	NOR	10 mcg	12	13-16	17
Polimixina	PL	300 mcg	8	9-11	12
Nitrofurantoína	NT	300 mcg	14	15-16	17

4 RESULTADOS

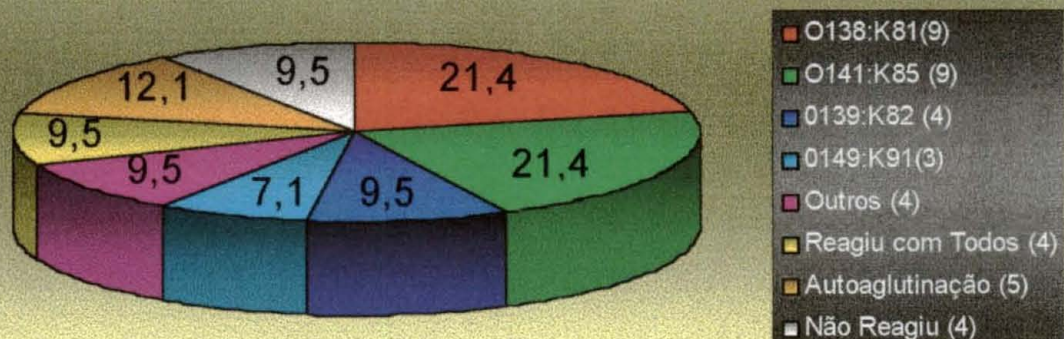
4.1 PRESENÇA DOS SOROGRUPOS SOMÁTICOS O-K

Na Tabela 12 e Figura 2 são apresentados os resultados das sorotipagens das 42 cepas de *Escherichia coli* realizadas no CPVDF.

TABELA 12 – SOROGRUPOS SOMÁTICOS O-K

AMOSTRA	IDADE	RESULTADO
1	Desmame	O35:K ⁺ V79 ⁺
2	Desmame	Não reagiu
3	Desmame	Não reagiu
4	Desmame	O138:K81
5	Desmame	Não reagiu
6	Desmame	Não reagiu
7	Desmame	Autoaglutinação
8	Desmame	Autoaglutinação
9	Desmame	Autoaglutinação
10	Desmame	Autoaglutinação
11	Desmame	O115:K ⁺ V165 ⁺
12	Neonatal	O141:K85a,b
13	Desmame	O138:K81
14	Neonatal	O141:K85a,c
15	Desmame	O138:K81
16	Neonatal	O141:K85a,b
17	Desmame	O141:K85a,b
18	Desmame	O138:K81
19	Desmame	O141:K85a,b
20	Desmame	O119:K ⁺ V113 ⁺
21	Desmame	Reagiu com todos
22	Desmame	Reagiu com todos
23	Desmame	Reagiu com todos
24	Desmame	Reagiu com todos
25	Desmame	O139:K82
26	Desmame	O108:K ⁺ V189 ⁺
27	Desmame	O138:K81
28	Desmame	O138:K81
29	Desmame	O141:K85a,b
30	Desmame	Autoaglutinação
31	Desmame	O141:K85a,b
32	Desmame	O141:K85a,b
33	Neonatal	O141:K85a,b
34	Desmame	O139:K82
35	Desmame	O139:K82
36	Desmame	O149:K91
37	Desmame	O138:K81
38	Neonatal	O149:K91
39	Desmame	O138:K81
40	Desmame	O139:K82
41	Neonatal	O149:K91
42	Desmame	O138:K81

FIGURA 2 - OCORRÊNCIA DOS PRINCIPAIS SOROGRUPOS DE *E. coli* ISOLADOS DE LEITÕES COM DIARRÉIA NO ESTADO DO PARANÁ



4.2 PRESENÇA DOS SOROGRUPOS SOMÁTICOS DE ADERÊNCIA

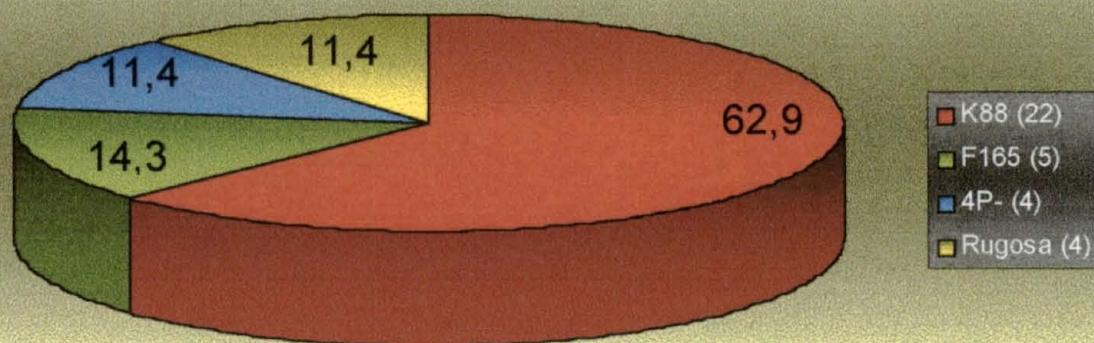
Na Tabela 13 e na Figura 3 são apresentados os resultados das sorotipagens para pesquisa dos antígenos de aderência de 42 cepas de *Escherichia coli* realizada na Universidade Estadual de Campinas.

TABELA 13 – SOROGRUPOS SOMÁTICOS DE ADERÊNCIA

AMOSTRA	IDADE	RESULTADO
1	Desmame	Rugosa
2	Desmame	F165
3	Desmame	Negativa
4	Desmame	K88a,d
5	Desmame	Negativa
6	Desmame	Rugosa
7	Desmame	K88a,d
8	Desmame	K88a,c
9	Desmame	K88a,c
10	Desmame	K88a,c
11	Desmame	K88a,b
12	Neonatal	K88a,d
13	Desmame	Negativa
14	Neonatal	K88a,c
15	Desmame	K88a,c
16	Neonatal	K88a,c
17	Desmame	F165
18	Desmame	Negativa
19	Desmame	K88a,c
20	Desmame	K88a,c
21	Desmame	F165
22	Desmame	F165
23	Desmame	K88a,d
24	Desmame	F165
25	Desmame	Rugosa
26	Desmame	K88a,b
27	Desmame	K88a,d
28	Desmame	K88a,c
29	Desmame	K88a,c
30	Desmame	Rugosa
31	Desmame	K88a,d
32	Desmame	K88a,d
33	Neonatal	K88a,b
34	Desmame	NT
35	Desmame	NT
36	Desmame	K88a,c
37	Desmame	NT
38	Neonatal	K88a,c
39	Desmame	NT
40	Desmame	NT
41	Neonatal	NT
42	Desmame	NT

NT: não testado

FIGURA 3 - OCORRÊNCIA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE FÍMBRIAS ENCONTRADAS EM CEPAS DE *E. coli* - %



4.3 SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA APRESENTADA AOS ANTIMICROBIANOS

Verificou-se o padrão de resistência e sensibilidade de 32 cepas de *Escherichia coli*, a 15 diferentes antimicrobianos, onde 100% destas apresentaram resistência à penicilina; 62,5% à tetraciclina; 50,0% às sulfonamidas; 43,7% à estreptomicina; 28,1% à associação sulfa + trimetoprim; 25,0% à ampicilina; 15,6% ao cloranfenicol; 12,5% à neomicina; 9,4% à cefalotina; 9,4% à canamicina; 9,4% ao ácido nalidíxico e 0,0% à polimixina, gentamicina, norfloxacina e nitrofurantoína (Tabela 14).

TABELA 14 - SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS (%)

	BETA-LACTÂMICOS			AMINOGLICOSÍDEOS				SULFONAMIDAS		TETRACICLINA	CLOSPANFENICOL	QUINOLONAS		POLIPEPTÍDEO	NITROFURANOS
	PN	AP	CF	GN	NO	ET	KN	SF	SFT	TT	CO	NA	NOR	PL	NT
S	0	75	71,9	100	81,25	25	90,6	50	71,8	34,4	84,4	87,5	100	100	87,5
I	0	0	18,7	0	6,25	31,25	0	0	0	3,1	0	3,1	0	0	12,5
R	100	25	9,4	0	12,5	43,75	9,4	50	28,2	62,5	15,6	9,4	0	0	0

S: sensível
I: intermediário
R: resistente
PN: penicilina
AP: ampicilina
CF: cefalotina
GN: gentamicina
NO: neomicina
ET: estreptomicina
KN: canamicina
SF: sulfonamida
SFT: sulfa+trimetoprim
TT: tetraciclina
CO: cloranfenicol
NA: ácido nalidíxico
NOR: norfloxacina
PL: polimixina
NT: nitrofurantoína

Quanto aos padrões de resistência múltipla (a mais de uma droga) apresentou-se o seguinte perfil: 22 (68,7%) cepas apresentaram resistência conjunta à penicilina e tetraciclina; 14 (43,7%) apresentaram resistência conjunta a três antimicrobianos (penicilina, tetraciclina e sulfonamida); 11 (34,4%) à quatro antimicrobianos (penicilina, tetraciclina, sulfonamida e estreptomicina); 6 (18,7%) aos antimicrobianos penicilina, tetraciclina, sulfonamida, estreptomicina e ampicilina); 6 (18,7%) aos antimicrobianos penicilina, tetraciclina, sulfonamida, estreptomicina,

ampicilina e sulfa + trimetoprim); 7 (9,4%) à sete drogas (penicilina, tetraciclina, sulfonamida, estreptomicina, sulfa + trimetoprim e cloranfenicol) e 2 (6,2%) à nove drogas (penicilina, tetraciclina, sulfonamida, estreptomicina, ampicilina, sulfa + trimetoprim, cloranfenicol, canamicina e neomicina) (Tabela 15 e Figura 4).

TABELA 15 - PADRÃO DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA

N.º DE CEPAS	%	PN	TT	SF	ET	AP	SFT	CO	KN	NO
32	100	R								
22	68,7	R	R							
14	43,7	R	R	R						
11	34,37	R	R	R	R					
6	18,7	R	R	R	R	R				
6	18,7	R	R	R	R	R	R			
3	9,4	R	R	R	R	R	R	R		
2	6,2	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: resistente

PN: penicilina

TT: tetraciclina

SF: sulfonamida

ET: estreptomicina

AP: ampicilina

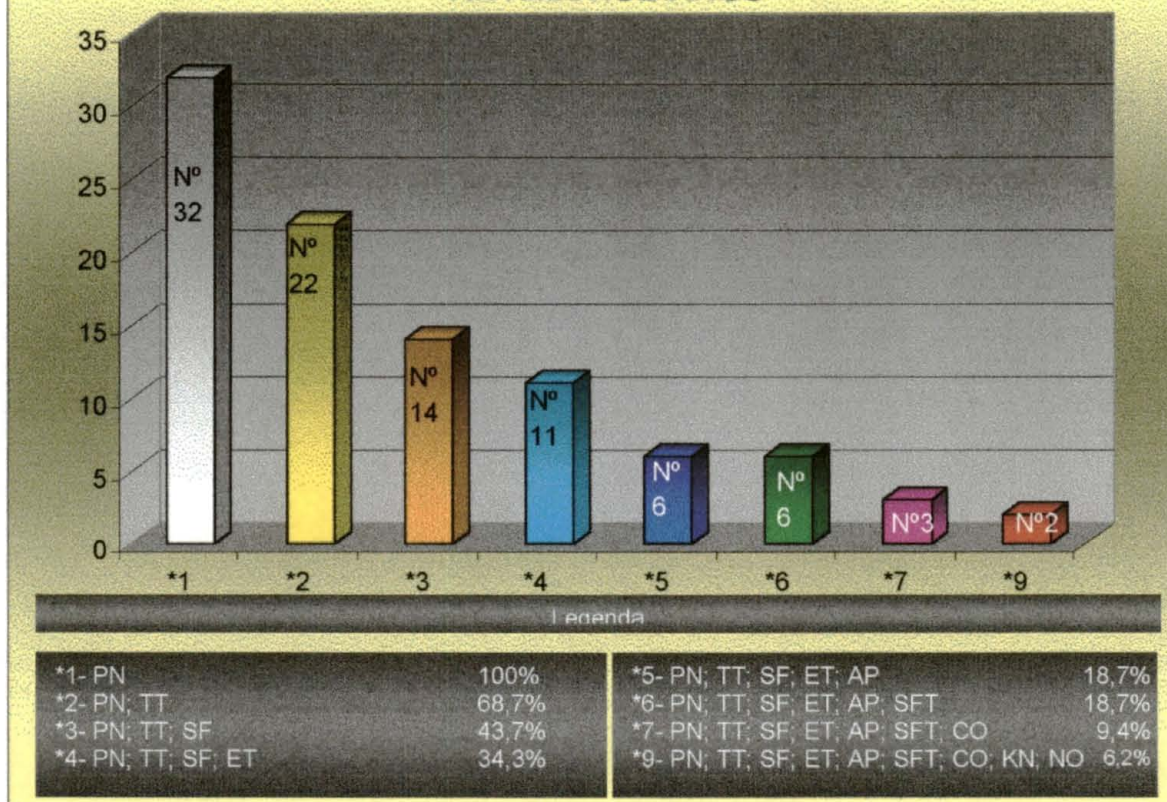
SFT: sulfa+trimetoprim

CO: cloranfenicol

KN: canamicina

NO: neomicina

FIGURA 4 - SOMATÓRIO ACUMULADO DAS CEPAS DE *E. coli* QUE APRESENTARAM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS ANTIMICROBIANOS



5 DISCUSSÃO

5.1 FREQUÊNCIA DOS SOROGRUPOS SOMÁTICOS O-K

Verificou-se na presente pesquisa a frequência maior dos sorogrupos O138:K81 com 9 (21,4%) isolamentos; O141:K85a,b com 8 (19%) isolamentos e o sorogrupo O139:K82 com 4 (9,5%) isolamentos. Portanto, houve o predomínio destes 3 sorogrupos em 50,0% dos isolamentos. Os demais sorogrupos encontrados foram: O149:K91 com 3 (7,1%) isolamentos, O35:K“V79”, O108:K“V189”, O115:K“V165”, O119:K“V113” e O141:K85a,c, com apenas 1 (2,4%) isolamento cada. Os resultados obtidos por outros pesquisadores no Sul e Sudeste do Brasil, são semelhantes, em parte, com os encontrados no Rio Grande do Sul por BARCELLOS et al. (1980) onde os autores verificaram o predomínio dos sorogrupos O138:K81 (28,7%), O141:K85a,c (25,7%), O108:K“V189” (9,5%), O157:K“V17” (10,3%), O149:K91 (7,4%) e O8:K87 (5,3%). Houve discrepância com o sorogrupo O139:K82, o qual foi encontrado em apenas 1,5% das amostras (Tabela 16 - Anexo 3).

OLIVEIRA et al. (1982) verificaram no estado de São Paulo, entre 28 cepas sorotipadas, a prevalência dos sorogrupos O101 em 11 amostras (39,3%), O149 em 6 (21,4%) e apenas uma amostra O138 (3,6%)(Tabela 16 - Anexo 3). Segundo LIOR (1994), o sorogrupo O101 está implicado tanto em diarreias de bezerros como de suínos, pois este possui o mesmo antígeno fimbrial que possibilita a aderência nos enterócitos destas espécies animais.

CASTRO et al. (1984) verificaram em 34 cepas isoladas em Santa Catarina o predomínio dos sorogrupos O149 em 11 amostras (32,3%); O10 em 6 (17,6%) e O35 em 5 (14,7%). O sorogrupo O138 foi identificado em 2 cepas (5,8%). No entanto, a ênfase deste trabalho referiu-se mais à verificação da produção das enterotoxinas e não à identificação dos sorogrupos, já que foram trabalhadas 477 cepas o que daria uma idéia mais precisa dos sorogrupos que ocorrem naquele estado. Percebe-se as diferentes prevalências de sorogrupos quando comparado aos dados anteriormente citados (Tabela 16 - Anexo 3).

GATTI et al. (1985) verificaram entre 323 cepas isoladas no Rio Grande do Sul por BARCELLOS, a predominância do sorogrupo O141 com 76 (23,5%) cepas; O149 com 38 cepas (11,7%); O108 com 27 (8,3%); O35 com 19 (5,8%) e O139 com

12 (3,7%). Verifica-se neste trabalho que, passados 5 anos, houve algumas alterações nas freqüências dos sorogrupos naquele estado, ou seja, a freqüência de O141 passou de 25,7% para 23,5%, houve aumento da freqüência de O149 de 7,4% para 11,7% e o sorogrupo O108 manteve-se praticamente em igual percentagem, passando de 9,5% para 8,3%. Verificou-se, também, o surgimento de dois sorogrupos, O9 e O35, não verificados anteriormente. O sorogrupo O35 foi encontrado na presente pesquisa em 2,4% das cepas (Tabela 16 - Anexo 3).

BRITO et al. (1995) verificaram no sudoeste do Paraná a predominância dos sorogrupos O9:K“P16” e O“V17”:K“V17” com 10,7% cada, representando 21,4% do total analisado. Já os sorogrupos O35:K“V79” e O108:K“V189” contribuíram com 7,1% cada; os sorogrupos O139:K82 em 3,5% e O10:K“V50” e O10:K“V165” em 1,7% cada um. Observa-se, neste caso, a presença do O139:K82 em 3,5%, e na presente pesquisa, em 9,5%. Outros sorogrupos coincidentes foram a presença do O35:K“V79” e O108:K“V189” perfazendo 14,2%. Estes resultados podem ser, em parte, atribuídos ao direcionamento da pesquisa abrangendo apenas 21 granjas suinícolas no sudoeste do estado do Paraná, o que pode levar ao isolamento de uma mesma cepa, considerada “problema”, mais de uma vez em uma mesma propriedade. Ao contrário, as 42 cepas isoladas no presente estudo, foram oriundas de 42 propriedades diferentes, distribuídas por todo o estado, o que diversifica as possibilidades da participação destes sorogrupos. Um dado interessante verificado pelos autores acima, foi a presença de 25 (44,7%) cepas não aglutinantes (não tipáveis) e de 7 (12,5%) cepas autoaglutinantes. Em pesquisa realizada por HAREL et al. (1991), 2,12% das cepas foram autoaglutinantes e 25,9% foram consideradas não tipáveis.

Na presente pesquisa, verificou-se que 12,1% foram auto-aglutinantes e 9,5% reagiram com todos os antisoros testados. As cepas 2, 3, 5 e 6 não aglutinaram com os antisoros mais freqüentes, segundo o esquema de SOJKA (1971), podendo indicar a possibilidade da ocorrência de novos sorogrupos considerados “não freqüentes” em casos de diarreia suína. As cepas 21, 22, 23 e 24 aglutinaram com todos os antisoros utilizados o que denota características antigênicas comuns. A verificação precisa dos antígenos somáticos O-K destas cepas exigiria a produção de antisoros individuais, o que demandaria custo e tempo, por isto não realizada. Por outro lado, desde que consideradas aglutinantes com

todas os antisoros, uma vacina composta dos antígenos mais freqüentes protegeria também contra estas cepas não identificadas já que haveria a produção de anticorpos humorais comuns.

Ainda sobre a ocorrência de novos sorogrupos O-K, BARCELLOS e BAPTISTA (1977) descreveram o isolamento e identificação daqueles isolados pela primeira vez nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul: O119:K"V113" (4), O"V17":K"V17" (4), O45:K"E65" (3), O141:K85a,c (2), O141:K85a,c:K88 a,c (2), O108:K"V189" (2), O35:K"V79" (1), O138:K81 (1), O64:K"V142" (1) e O9:K"P16" (1).

O levantamento dos principais sorogrupos deve-se à ocorrência variada destes, de região para região, o que reforça a idéia de que o conhecimento prévio dos principais sorogrupos é fator imprescindível na elaboração de uma vacina contra a colibacilose suína (LIOR, 1994).

SÖDERLIND et al. (1988) verificaram na Suécia uma contínua mudança na freqüência dos sorogrupos isolados de diarréia de leitões. Entre 1964 e 1967, o sorogrupo O8 foi o mais comum na diarréia neonatal. Em outro levantamento posterior, entre 1975 e 1980, o O149 foi o mais freqüente na mesma faixa etária. Posteriormente, no último período testado (1983-1984), o sorogrupo O101 foi o mais freqüente. No entanto, o sorogrupo O149 continuou sendo o predominante em leitões com idade acima de uma semana por todo o período testado abrangendo mais de 20 anos. Segundo os autores, a utilização de vacinas contendo o sorogrupo O149 e o antígeno de aderência K88 por mais de 10 anos naquele país, levou à mudança do sorogrupo dominante na época para o predomínio do O101 cujo antígeno de aderência é o K99, e não o K88. Segundo os autores, estudos em outros países demonstraram que o sorogrupo O149 foi o mais freqüente na Noruega, República Democrática Alemã, no centro-oeste dos Estados Unidos, Austrália e Brasil em surtos de diarréia neonatal.

Verifica-se na Tabela 16 um resumo dos principais sorogrupos implicados em diarréia neonatal e de desmame, verificados por diversos pesquisadores, tanto no Brasil como em outros países, comparando-os com os resultados obtidos na presente pesquisa.

Considerando apenas os trabalhos publicados em nosso país, verifica-se que os dados obtidos por BARCELLOS et al. (1980) são os que mais se aproximaram com os da atual pesquisa. Todavia, GATTI et al. (1985) também observaram o

predomínio do sorogrupo O141 (23,5%) cujas cepas investigadas por eles eram provenientes do estado do Rio Grande do Sul.

Considerando os trabalhos publicados no exterior, verifica-se similaridade nos dados de NAKASAWA et al. (1987) e GONZALEZ e BLANCO (1986). Conclui-se, portanto, que a participação dos sorogrupos em um determinado país é uma particularidade regional, mutável, e vacinas autógenas baseadas apenas nos antígenos O-K oferecem melhor possibilidade de proteção em uma dada propriedade ou região do que vacinas comerciais que não levam em conta estas particularidades antigênicas das cepas mais freqüentemente ocorrentes.

5.2 FREQUÊNCIA DOS SOROGRUPOS SOMÁTICOS DE ADERÊNCIA

No presente estudo, pesquisaram-se os antígenos de aderência de 35 cepas de *Escherichia coli*. Observou-se a freqüência do antígeno K88 em 22 (62,9%) destas, e do antígeno F165 em 5 (14,3%) cepas (Figura 3). Portanto, 77,1% das cepas apresentaram antígenos de aderência conhecidos. No entanto, 4 (11,4%) cepas foram consideradas negativas (não tipáveis) e 4 (11,4%) rugosas. Como foram utilizados antisoros para os antígenos K99, K88, 987P, F41 e F165, os resultados negativos significam ou a ausência de qualquer antígeno de aderência ou a presença de outros ainda desconhecidos em casos de colibacilose suína. Verificou-se a presença do antígeno F165 o qual, segundo a literatura consultada, parece ter sido pela primeira vez identificado em cepas patogênicas para suínos no Brasil.

Considerando os dados levantados sobre a ocorrência destas fímbrias no Brasil e outros países, observa-se na Tabela 17 (Anexo 3) a presença do antígeno K88 como sendo o mais freqüente, seguido do K99 e 987P.

Com relação ao K88, as porcentagens variaram entre 16,0% (CARVALHO et al., 1991) a 61,0% (NAGY et al., 1990) (Tabela 17- Anexo 3). Na presente pesquisa, esta porcentagem atingiu 62,9% das cepas analisadas.

Algumas particularidades sobre a ocorrência destes antígenos vale a pena mencionar.

No Brasil, OLIVEIRA et al. (1981), CASTRO et al. (1984) e CARVALHO et al. (1991) identificaram o antígeno K88 em 19,5%, 49,1% e 16,0%, respectivamente.

Outro dado interessante extraído dos trabalhos destes autores foi a demonstração de que entre 569 cepas não portadoras dos antígenos K88, K99 e 987P, somente 162 (28,5%) foram consideradas como ETEC e 407 (71,5%) como não ETEC (Tabela 18 - Anexo 3). Este dado demonstra, indiretamente, que estas cepas ETEC poderiam apresentar outros antígenos de aderência não investigados, ou menos freqüentes, pois foram isoladas de casos de colibacilose onde a diarreia se fazia presente. Por outro lado, elas poderiam ter perdido seus plasmídios em subculturas ou no processo de estocagem e estariam sendo consideradas erradamente como “não portadoras” de antígenos de aderência. Determinadas cepas de *E. coli* possuem plasmídios os quais são responsáveis pela produção de enterotoxinas e fímbrias (FRANKLIN et al., 1981). Porém, o mesmo plasmídio pode mediar a produção de ambos fatores de virulência (WILLSHAW et al., 1982). Ao analisarmos conjuntamente os dados apresentados pelos citados autores e de GATTI et al. (1985), entre 1033 cepas de *E. coli*, 849 (82,2%) destas não apresentaram antígenos de aderência conhecidos (K88, K99 e 987P) e apenas 184 (17,8%) os possuíam (Tabela 19 - Anexo 3).

Outro dado interessante que poderia ser extraído da pesquisa realizada, baseado apenas nos resultados preliminares da sorotipagem dos antígenos O-K, foi a constatação da ausência do antígeno de aderência K99. Sabe-se que somente determinados sorogrupos O (O101 e O9) estão associados a sua presença (OLIVEIRA et al., 1981; GONZALEZ e BLANCO, 1986; SÖDERLIND et al., 1988; GARABAL et al., 1996). Como estes não foram identificados, já era de se esperar a ausência deste antígeno de aderência. Outro detalhe é que nas cepas envolvidas em diarreia pós-desmame, o K99 raramente é encontrado (NAKAZAWA et al., 1987; NAGY et al., 1990). Verifica-se na Tabela 10 que 36 (85,7%) cepas foram isoladas de casos de diarreia pós-desmame e apenas 6 (14,3%) de diarreia neonatal. Com relação a este antígeno fimbrial no Brasil, OLIVEIRA et al. (1981), CASTRO et al. (1984) e CARVALHO et al. (1991) obtiveram as freqüências de 9,0%, 45,6% e 21,0%, respectivamente. Nos dois primeiros trabalhos, houve a associação do K99 com O9 e O101, respectivamente. CARVALHO et al. (1991) não associaram a freqüência do antígeno K99 aos sorogrupos O-K (não realizaram a sorotipagem).

Quanto ao antígeno 987P, CASTRO et al. (1984), CARVALHO et al. (1991) e FERREIRA et al. (1997) verificaram sua frequência em 5,2%, 1,0% e 34,5% respectivamente.

Com relação à frequência do antígeno F41, FERREIRA et al. (1997) demonstraram sua ausência nas cepas investigadas. Nos trabalhos de âmbito internacional consultados, MORRIS et al. (1983) verificaram a produção deste antígeno associado a 4 cepas pertencentes ao sorogrupo O101. WILSON e FRANCIS (1986) identificaram sua presença em 5,4%; FAIRBROTHER et al. (1988) em 15,1% e NAKASAWA et al. (1987) em 0,5%.

Com relação ao F165, FAIRBROTHER et al. (1988) identificaram sua presença em 5% das cepas de *Escherichia coli* associadas aos sorogrupos O64:K“V142” (2) e O115:K“V165” (3). Coincidentemente o sorogrupo O115:K“V165” foi identificado na presente pesquisa, correspondendo à cepa número 11 (Tabela 12), porém associado ao antígeno K88a,b, e não ao F165 (Tabela 13). Na presente pesquisa, identificou-se este antígeno em 14,3% das cepas investigadas. Apesar da não identificação precisa dos sorogrupos O-K em 4 cepas (1 delas não reagiu e 3 reagiram com todos os antisoros) associadas ao F165, este dado é importante quando se pensa em vacinas contra a colibacilose suína no estado do Paraná. Pelo que se sabe, as vacinas comerciais não incluem o F165, mas apenas os antígenos mais comuns como o K88, K99, 987P e F41.

Um outro dado muito significativo foi o encontro, na presente pesquisa, de 4 (11,4%) cepas isoladas consideradas negativas para a presença dos antígenos K88, K99, 987P e F41, no entanto, elas poderiam possuir um antígeno ainda desconhecido ou não testado, como o F107 e o F42. NAGY et al. (1990) verificaram que 79 (38,5%) das 205 cepas pesquisadas não possuíam fímbrias conhecidas, porém foram consideradas enterotoxigênicas ou produtoras de verotoxinas. Seria interessante pesquisar nestas 4 cepas negativas, a sua capacidade toxigênica.

A utilização contínua de vacinas com antígenos somáticos O-K e K88, de frequências mais comuns em surtos de colibacilose, levam à mudança da incidência destes antígenos, tornando as vacinas comerciais ineficazes, como verificado por SÖDERLIND et al. (1988) na Suécia. Talvez isto esteja acontecendo em nosso país, ou mesmo no Paraná, o que justificaria, na atualidade, a presença do antígeno F165 nas vacinas comerciais.

Portanto, faz-se necessário a pesquisa constante destes antígenos de aderência. Os laboratórios de microbiologia veterinária, ao diagnosticarem surtos de colibacilose suína, deveriam enviar estas cepas a centros de referência para a verificação destes antígenos, tais como os existentes na UNICAMP (SP), CPVDF (RS) e EMBRAPA – CNPSA (SC). Estas informações seriam de grande valor tanto para os proprietários quanto para os veterinários. De posse delas, poder-se-ia elaborar vacinas para determinada propriedade ou região.

A intensa comercialização de animais entre criações de várias regiões e a importação de reprodutores de outros países são os grandes fatores de disseminação de diversas doenças e entre estas situa-se a colibacilose. Cepas antes consideradas “raras” em determinada região tornam-se “freqüentes”. Por isto, deve ser enfatizado a necessidade da identificação completa dos antígenos O-K (polissacarídicos) e de aderência (protéicos) como subsídio para a produção comercial ou artesanal (autógena) de vacinas contra a colibacilose no Brasil, sob pena dos prejuízos verificados na colibacilose tornarem-se ainda maiores do que já são.

5.3 FREQUÊNCIA DE SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Ao analisarmos os resultados obtidos de sensibilidade das 32 cepas de *Escherichia coli*, verifica-se com relação aos beta-lactâmicos que 100% das cepas foram resistentes à penicilina, 25,0% à ampicilina e 9,4% à cefalotina. CARVALHO et al. (1991) encontraram freqüências de 82,0% e 72,0% de resistência à penicilina e cefalotina, respectivamente. LARIVIÈRE e LALLIER (1976), SAIDA et al. (1981) e HARNETT e GYLES (1984) encontraram 19,6%, 30,0% e 53,0% das cepas resistentes à ampicilina, respectivamente (Tabela 20 - Anexo 3).

Já em relação aos aminoglicosídeos, produtos amplamente utilizados em diarreias suínas, as resistências foram de 0% para a gentamicina, 9,4% para a canamicina, 12,5% para a neomicina e 43,7% para a estreptomicina. Segundo LOPEZ et al. (1982) a resistência à gentamicina não é freqüente entre cepas de *E. coli* causadoras de colibacilose, também encontrando 0% de resistência a este antimicrobiano (Tabela 20 – Anexo 3). No entanto, GONZALEZ e BLANCO (1986) e GARCIA et al. (1987) verificaram índices de resistência de 59,6% e 21,4%,

respectivamente. Observa-se que os maiores índices de resistência aos aminoglicosídeos foram verificados em relação à estreptomicina e à canamicina, que variaram de 0% a 66,6% (Tabela. 20 – Anexo 3). Já em relação à neomicina, LARIVIÈRE e LALLIER (1976) verificaram que 21,4% das cepas de *E. coli* apresentaram resistência (Tabela 20 – Anexo 3).

A associação dos aminoglicosídeos e beta-lactâmicos de amplo espectro poderia auxiliar na eliminação de cepas mais resistentes, já que são conhecidos os efeitos sinérgicos entre estas famílias de antimicrobianos (BARCELLOS e SOBESTIANSKY, 1998).

Com relação aos sulfonamídeos, verificou-se que 50% das cepas apresentaram resistência às sulfas. Já na associação sinérgica sulfa + trimetoprim, as porcentagens caíram para 28,2%. Altas porcentagens de resistência às sulfas foram observadas por SAIDA et al. (1981) e HARNETT e GYLES (1984) com 83,4% e 91,1%, respectivamente (Tabela 20 – Anexo 3). BROES et al. (1988) verificaram que 91,6% das cepas apresentaram resistência à associação sulfa + trimetoprim.

Com relação às tetraciclinas, 62,5% das cepas apresentaram-se resistentes. Outros pesquisadores também encontraram frequências altas de resistência a este antimicrobiano: LARIVIÈRE e LALLIER (1976) em 90,1%; SAIDA et al. (1981) em 90,3%; HARNETT e GYLES (1984) em 76,4%; GONZALEZ e BLANCO (1986) em 82,4%; GARCÍA et al. (1987) em 98,2% e CARVALHO et al.(1991) em 93% das cepas analisadas.

Quanto ao cloranfenicol, 15,6% das cepas apresentaram resistência a este antimicrobiano. Este dado assemelha-se àqueles encontrados por LARIVIÈRE e LALLIER (1976) com 21,4%; SAIDA et al. (1981) com 17,1%; HARNETT e GYLES (1984) com 5,8%; GONZALEZ e BLANCO (1986) com 17,5%; e BROES et al. (1988) com 41,6%.

Com relação às quinolonas, antimicrobianos relativamente recentes no mercado, 100% das cepas apresentaram-se sensíveis (Tabela 20). Não obteve-se junto à literatura consultada dados referentes a testes de sensibilidade *in vitro* utilizando esta droga.

No entanto, segundo PRESCOTT e BAGGOT (1991) a família das quinolonas não apresentam antagonismo com a família dos aminoglicosídeos, ou seja, a partir da combinação destes espera-se um efeito aditivo. Os resultados obtidos mostraram

que 100% das cepas de *E. coli* foram sensíveis à gentamicina e norfloxacina o que poderia ser explorado na produção de um novo produto antimicrobiano com ambas as drogas para ser aplicado tanto na diarreia neonatal quanto na diarreia pós-desmame e doença do edema. A utilização de apenas um antimicrobiano exerce pressão seletiva o que acarreta a possibilidade de cepas mutantes resistentes (PELCZAR, 1997). A utilização de duas drogas não antagônicas exerceria efeito bactericida maior e mais completo tornando a possibilidade do surgimento de mutantes um evento difícil. Os sítios de ação destas drogas na célula bacteriana situam-se, no caso da norfloxacina, na DNA girase dificultando o empacotamento do DNA, e o da gentamicina na subunidade 30S, impedindo a síntese protéica (PRESCOTT e BAGGOT, 1991).

Quanto à polimixina, também obteve-se 100% de sensibilidade, índice igualmente encontrado por GONZALEZ e BLANCO (1986). Esta droga age desorganizando as membranas externa e citoplasmática apresentando sinergismo com ampla variedade de antimicrobianos, inclusive à norfloxacina e gentamicina. A polimixina e a norfloxacina são administradas em infecções por *E. coli* no período pós-desmame (diarreia e doença do edema) pela via oral. A utilização de outra droga da família das quinolonas (enrofloxacin) poderia ser associada com a gentamicina para serem administradas intramuscularmente (BARCELLOS e SOBESTIANSKY, 1998). Portanto, a utilização da polimixina e norfloxacina pela via oral e da gentamicina e enrofloxacin pela via intramuscular poderia ser adotado no tratamento de infecções por *E. coli*.

Por fim, sobre os nitrofuranos, 100% das cepas apresentaram-se sensíveis a este quimioterápico e GARCÍA et al. (1987) verificaram resistência em 57,1% das cepas analisadas.

Sobre o padrão de resistência múltipla às drogas, observou-se que as cepas em estudo apresentaram graus variados quanto a este aspecto. Em linhas gerais, 68,7% das cepas foram resistentes a mais de uma droga (penicilina e tetraciclina), o que é um resultado altamente significativo; 43,7% foram resistentes a 3 antimicrobianos (penicilina, tetraciclina e sulfonamida); 34,4% resistentes a 4 (penicilina, tetraciclina, sulfonamida e estreptomicina); 18,7% resistentes a 5 (penicilina, tetraciclina, sulfonamida, estreptomicina e ampicilina); 18,7% resistentes a 6 (penicilina, tetraciclina, sulfonamida, estreptomicina, ampicilina e sulfa +

trimetoprim); 6,25% apresentaram resistência a 9 antimicrobianos ao mesmo tempo, entre estes: cloranfenicol, canamicina, neomicina, tetraciclina e sulfa + trimetoprim, drogas de uso rotineiro na suinocultura industrial em problemas infecciosos entéricos.

Sabe-se que os produtos derivados deste antimicrobiano são muito utilizados nas rações para suínos como promotores de crescimento ou mesmo para controle preventivo e curativo (BARCELLOS e SOBESTIANSKY, 1998). Ainda hoje a utilização de antimicrobianos na ração de maneira preventiva é um assunto extremamente polêmico. Existem aqueles que defendem a sua utilização e aqueles que argumentam que subdosagens possibilitaria o surgimento de cepas resistentes (PELCZAR, 1997).

Segundo a literatura, as resistências unitárias são atribuídas a fenômenos de mutação, enquanto as resistências múltiplas, à presença de plasmídios R conjugativos (MURRAY et al., 1998). O encontro de 22 (68,7%) cepas resistentes a mais de uma droga pode ser devido à presença de plasmídios R.

Tendo em vista as resistências apresentadas pelas cepas patogênicas, faz-se necessário a constante verificação das sensibilidades, através da realização de testes *in vitro* para um efetivo resultado à campo. Convém salientar as vantagens da utilização de associação de drogas que apresentam sinergismo de ação, diminuindo as possibilidades do surgimento de cepas resistentes a duas drogas simultaneamente (PRESCOTT e BAGGOT, 1991).

6 CONCLUSÃO

1. Observou-se a predominância dos sorogrupos O138:K81, O141:K85 a, b e O139:K82, totalizando 50,0% das amostras.
2. Observou-se a predominância dos antígenos protéicos K88 e F165 em 62,8% e 14,3%, respectivamente totalizando 77,13% das amostras.
3. O antígeno de aderência F165 foi identificado pela primeira vez em nosso país, implicado em diarreia de leitões e deverá ser incluído nas vacinas contra a colibacilose suína.
4. Observou-se resistência múltipla em 68,7% das cepas estudadas.

ANEXO 1 - MATERIAL DE LABORATÓRIO

1.1 MEIOS DE CULTURA , REAGENTES E SOLUÇÕES

1.1.1 Base de ágar sangue e triptose DIFCO 0232

Triptose.....	10,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar.....	15,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 33 gramas do meio “Bacto Tryptose Blood Agar Base” (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,2 e esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O meio já esterilizado foi resfriado a temperatura de 45-50°C e adicionava-se 50 ml de sangue ovino desfibrinado. Após a homogeneização, evitando a formação de bolhas de ar, foram distribuídos volumes de aproximadamente 12 ml em placas de Petri de 15 x 100 mm. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.2 Ágar MacConkey DIFCO 0075

Peptona.....	17,0 g
Proteose peptona.....	3,0 g
Lactose.....	10,0 g
Sais biliares.....	1,5 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Vermelho neutro.....	0,03 g
Cristal violeta.....	0,001 g
Ágar.....	13,5 g

Preparo: Foram dissolvidas 50 gramas do meio “Bacto MacConkey Agar” (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,1 e esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O meio foi resfriado até a temperatura de 45-50°C e distribuído volumes de aproximadamente 12 ml em placas de Petri de 15 x 100 mm. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.3 Ágar Mueller-Hinton MERCK 5437

Infusão de carne.....	5,0 g
Caseína hidrolizada.....	17,5 g
Amido.....	1,5 g
Ágar.....	12,5 g

Preparo: Foram dissolvidas 36,5 gramas do meio “Ágar Mueller-Hinton” (MERCK 1982) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição agitando freqüentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,4 e esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuía-se volumes de aproximadamente 20 ml em placas de Petri de 15 x 150 mm. Os meios eram mantidos a 4°C em geladeira.

1.1.4 Meio de Lignières, seg. BIER (1978)

Extrato de carne.....	5,0 g
Peptona.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Gelatina.....	5,0 g
Ágar.....	8,0 g
pH: 7,4	

1.1.5 Ágar com três açúcares e ferro DIFCO 0265

Extrato de carne.....	3,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Peptona.....	15,0 g
Proteose e peptona.....	5,0 g
Lactose.....	10,0 g
Sacarose.....	10,0 g
Dextrose.....	1,0 g
Sulfato ferroso.....	0,2 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Tiosulfato de sódio.....	0,3 g
Vermelho de fenol.....	0,024 g
Ágar.....	12,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 65 gramas do meio “Bacto Triple Sugar Iron Agar” (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,4 e distribuía-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Resfriavam-se os tubos em posição inclinada, de modo que o meio no fundo do tubo alcançasse uma profundidade de 1,5 a 2,0 cm e formasse na superfície uma base inclinada. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.6 Ágar uréia de Christensen MERCK 8492

Meio base	
Peptona de carne.....	1,0 g
D (+) glicose.....	1,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Potássio dihidrogenofosfato.....	2,0 g
Vermelho de fenol.....	0,012 g
Ágar.....	12,0 g
Aditivo	
Uréia.....	20,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 21 gramas do meio “Ágar Uréia de Christensen” (MERCK, 1982) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 6,8 e esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O meio base era resfriado até 45°C e incorporava-se no mesmo, 50 ml de solução (esterilizada por filtração) de uréia a 40%. Distribuía-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e resfriava-se os mesmos em posição inclinada. Os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.7 Água peptonada (caldo triptofano), segundo KONEMAN, 1997

Peptona.....	10 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Água destilada.....	1000 ml

Preparo: Foram dissolvidas 15 gramas do meio água peptonada desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição. Ajustava-se o pH para 8,4 a 8,5 e distribuía-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm. Autoclavava-se a 121°C durante 15 minutos e resfriavam-se os tubos até a temperatura de 45-50°C. Após o resfriamento, os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.8 Caldo VMVP

Polipeptona.....	7 g
Glicose.....	5 g
Fosfato dipotássio.....	5 g
Água destilada.....	1000 ml

Preparo: Foram dissolvidas 17 gramas do meio VMVP desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até a completa dissolução. O pH era ajustado para 6,9 e distribuía-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de

ensaio de 13 x 100 mm. Autoclavava-se a 121°C durante 15 minutos e resfriavam-se os tubos até a temperatura de 45°C. Após o resfriamento, os tubos eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.9 Ágar citrato de Simmons

MERCK 2501

Amônio dehidrogenofosfato.....	1,0 g
Di-potássio hidrogenofosfato.....	1,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Citrato de sódio.....	5,0 g
Sulfato de magnésio.....	0,2 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Ágar.....	12,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 22 gramas do meio Ágar Citrato, segundo Simmons (MERCK, 1982) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição. Ajustava-se o pH para 6,9 e distribuía-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm. Esterilizava-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos e resfriavam-se os tubos na posição inclinada até a solidificação do ágar. Os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.10 Caldo vermelho de fenol

MERCK 10987

Meio Base

Peptona de caseína.....	5,0 g
Peptona de carne.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Vermelho de fenol.....	0,018 g
Aditivo:	
Sacarose.....	10 g

Preparo: Foram dissolvidas 15 gramas do meio base “Caldo Vermelho de Fenol” (MERCK, 1982) em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,4. O meio era, em seguida, dividido em porções de 45 ml e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Paralelamente, era preparada solução aquosa a 10% da sacarose a qual era esterilizada por filtração em filtro Seitz. Posteriormente, a cada porção do meio eram adicionados 5 ml da solução de sacarose e a mistura era distribuía em volumes de 5 ml em tubos de 13 x 100 mm. Estes meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.11 Ágar fenilalanina

DIFCO 0745

Extrato de levedura.....	3,0 g
Fosfato dipotássico.....	1,0 g
Cloreto de sódio.....	2,0 g
DL-phenylalanina.....	2,0 g
Ágar.....	12,0 g

Preparo: Foram dissolvidas 23 gramas do meio “Bacto Phenylalanina Agar” (DIFCO, 1984) desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até a completa dissolução. Ajustava-se o pH para 7,3 e distribuía-se a solução em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm. Esterilizava-se a 121°C durante 15 minutos e resfriavam-se os tubos na posição inclinada até a solidificação. Os meios eram mantidos em geladeira a 4°C.

1.1.12 Caldo base descarboxilase de Moeller

Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	5,0 g
Púrpura de bromocresol.....	0,01 g
Vermelho de cresol.....	0,005 g
Glicose.....	0,5 g
Piridoxal.....	0,005 g
Água destilada.....	1000 ml

Preparo: Foram dissolvidas 10 gramas do meio base “Caldo Base Descarboxilase de Moeller” desidratado em 1000 ml de água destilada. Deixava-se hidratar por 5 a 10 minutos e ajustava-se o pH em 6,0. Aquecia-se até o ponto de ebulição, agitando freqüentemente até completa dissolução. A base era então dividida em duas porções iguais: em uma adicionava-se lisina a 1%, enquanto a outra porção era utilizada como controle. O meio era distribuído em tubos de 13 x 100 mm em volumes de 5 ml, adicionava-se vaselina estéril e autoclavado a 121°C por 10 minutos. Os meios eram mantidos a 4°C na geladeira.

1.1.13 Reativo de Ehrlich para prova do indol, seg. KONEMAN et al., 1983

p-dimetilaminobenzaldeído.....	2,0 g
Ácido clorídrico concentrado.....	40,0 ml
Álcool etílico absoluto	190,0 ml

1.1.14 Reativo para a prova da fenilalanina desaminase, seg. KONEMAN et al., 1983

Cloreto férrico.....	10,0 g
HCl concentrado.....	2,5 g
Água destilada.....	100 ml

1.1.15 Indicador de pH vermelho de metila

Vermelho de metila.....	0,1 g
Álcool etílico a 95%.....	300 ml
Água destilada.....	200 ml

1.1.16 Reativo alfa-naftol

Alfa-naftol (5%).....	5 g
Álcool etílico absoluto.....	100 ml

1.1.17 Hidróxido de potássio (KOH)

Hidróxido de potássio (40%).....	40 g
Água destilada.....	100 ml

ANEXO 2 - INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS

2.1 IMViC

2.1.1 Prova do indol

Nesta prova, a colônia suspeita foi inoculada no caldo água peptonada e incubada a 37°C durante 18 a 24 horas. Ao término deste período, adicionava-se 1 ml de clorofórmio e 15 gotas do reativo de Ehrlich. O aparecimento da cor vermelha na superfície de contato entre o reativo e a camada de clorofórmio, segundos após a adição do reativo, indicava a presença do indol e uma prova positiva. O não aparecimento da cor vermelha indicava prova negativa. Como controle positivo e negativo foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 e uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente.

2.1.2 Prova do vermelho de metila

Inoculava-se o caldo Clark e Lubs com uma cultura pura do microrganismo em estudo. Incubava-se o tubo a 37°C durante 48 a 72 horas e ao término deste período adicionavam-se diretamente ao caldo, 5 gotas do reativo vermelho de metila. O desenvolvimento da cor vermelha no tubo indicava a produção de ácido suficiente para abaixar o pH a 4,4, resultando em uma prova positiva. O não aparecimento da cor vermelha indicava prova negativa. Como controle positivo e negativo foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 e uma cepa de *Enterobacter aerogenes*, respectivamente.

2.1.3 Prova de Voges-Proskauer

Inoculava-se o caldo Clark e Lubs com uma cultura pura do microrganismo em estudo e incubava-se durante 24 horas a 37°C. Ao término deste período, transferia-se 1 ml de caldo para um tubo de ensaio limpo. Adicionava-se 0,6 ml de alfa-naftol a 5% e 0,2 ml de KOH a 40%. Agitava-se o tubo suavemente para expor o meio ao oxigênio atmosférico e deixava-o repousar durante 10 a 15 minutos. Uma prova positiva era representada pelo desenvolvimento da cor vermelha após este período. O não aparecimento da cor vermelha indicava prova negativa. Como controle positivo e negativo foi utilizada uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* e uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente.

2.1.4 Prova do citrato

Uma colônia bem isolada era colhida da superfície do meio de isolamento primário e semeada na superfície do tubo. Este material era incubado a 37°C durante 24 a 48 horas. A prova positiva era representada pelo desenvolvimento da cor azul escura e negativa quando da ausência de crescimento visível da

colônia ao longo da estria de inoculação. Como controle positivo e negativo foi utilizada uma cepa de *Enterobacter aerogenes* e uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente.

2.2 PROVAS COMPLEMENTARES

2.2.1 Prova da urease

Nesta prova, a cultura em estudo era inoculada em ágar uréia por um período de incubação de 72 horas a 37°C. O resultado era considerado negativo quando não ocorria mudança de coloração do meio, decorrente da não hidrólise da uréia. Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Proteus vulgaris* e como controle negativo a *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.2.2 Prova da fenilalanina desaminase

A cultura era semeada na superfície do meio ágar fenilalanina e incubada durante 72 horas a 37°C. Após o período de incubação, pingavam-se 4 a 5 gotas do reativo para a prova da fenilalanina desaminase na superfície de crescimento. Ao acrescentar o reativo, agitava-se o tubo até ocorrer o desprendimento das colônias na superfície do meio. Considerava-se a prova negativa quando não ocorria o surgimento da cor verde. Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Proteus vulgaris* e como controle negativo uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.2.3 Prova da lisina descarboxilase

A colônia obtida era inoculada em dois tubos do meio descarboxilase de Moeller, um contendo a lisina e outro, não. Ambos os tubos eram cobertos com 1 cm de óleo mineral e incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. A conversão do tubo controle para a cor amarela indicava que o microrganismo era viável e que o pH do meio tinha sido abaixado suficientemente para ativar a descarboxilase. A reversão do tubo contendo a lisina para a cor púrpura indicava uma prova positiva levando à formação de aminas a partir da descarboxilação. Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Salmonella gallinarum* e como controle negativo a cepa de *Enterobacter cloacae*.

ANEXO 3 – TABELAS

TABELA 16 - FREQUÊNCIAS DE ANTÍGENOS O NO BRASIL E NO MUNDO

AUTORES	ANO	CEPAS (a)	O157 %	O149 %	O141 %	O138 %	O139 %	O101 %	O8 %	O115 %	O45 %	O147 %	O108 %	O35 %	O119 %	O9 %	O64 %	O20 %	O10 %	OV17 %
BARCELLOS e BAPTISTA	1977	21	NT	0	19	4,8	0	NT	0	0	14,3	0	9,3	4,8	19	4,8	4,8	NT	0	19
BARCELLOS et al.	1980	338	10,3	7,4	25,7	28,7	1,5	NT	5,3	2,1	2,4	0	9,5	0	0	0	0	NT	0,3	0
OLIVEIRA et al.	1982	28	0	21,4	0	3,6	0	39,3	7,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASTRO et al.	1984	34	5,8	32,3	0	5,8	2,9	NT	0	0	0	0	8,8	14,7	0	5,8	5,8	NT	17,6	0
GATTI et al.	1985	323	7,7	11,7	23,5	19,8	3,7	NT	6,8	0,9	2,4	0,3	8,3	5,8	3,4	2,4	1,8	NT	0,9	0
BRITO et al.	1995	56	NT	0	0	0	3,5	NT	0	NT	0	0	7,1	7,1	0	10,7	0	NT	3,4	10,7
LARIVIÉRE e LALLIER	1975	112	12,5	9,8	8	5,3	3,6	0,9	7,1	NT	5,3	1,8	NT	NT	NT	0,9	NT	NT	NT	NT
GONZALEZ e BLANCO	1986	41	0	0	36,5	0	0	2,4	9,7	0	0	0	0	0	0	4,8	0	0	0	0
WILSON e FRANCIS	1986	223	7,2	34	9,9	0,9	0	6,3	6,7	0	0,4	0	0	0	0	2,2	1,3	12,5	0	0
NAKAZAWA et al.	1987	214	42,4	52,8	5,3	0	0	14,3	33,2	0	0	1,3	NT	0	0	5,2	0	0	NT	NT
SÖDERLIND et al.	1988	505	0	42,4	5,9	0	0	18	6,3	0	0	0	NT	NT	NT	8,9	7,3	6,7	NT	NT
NAGY et al.	1990	205	2,9	55,6	3,4	1,5	4,9	NT	1,5	NT	NT	3,4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SALAJKA et al.	1992	1300	4,1	11,8	4,7	10,1	6,5	0	10,9	0	3,5	11,1	8,2	0	1,5	0	0	0	0	0
GARABAL et al.	1996	562	3,7	11,4	13,2	13,7	1,4	11,5	12,3	3,5	2,3	NT	NT	NT	NT	11,4	0,2	10,5	NT	NT
Atual pesquisa	2000	42	NT	7,1	21,4	21,4	9,5	NT	0	2,4	0	0	2,40	2,4	2,4	0	0	NT	0	0

(a) número de cepas analisadas

TABELA 17 - PREVALÊNCIA DE ANTÍGENOS FIMBRIAIS NO BRASIL E EM OUTROS PAÍSES

AUTORES	ANO	N (a)	K88 %	K99 %	987P %	F41 %	F42 %	F165 %	F107 %	3P- (b) %	3P- (c) %	4P- (d) %	4P- (e) %
OLIVEIRA et al.	1981	133	19,5	9	0	NT (f)	NT	NT	NT	65,4			
CASTRO et al.	1984	57	49,1	45,6	5,2	NT	NT	NT	NT		88,1		
GATTI et al.	1985	323	29	4,3	8,7	NT	NT	NT	NT		86,7		
YANO et al.	1986	23	NT	NT	NT	NT	13	NT	NT				
CARVALHO et al.	1991	100	16	21	1	NT	NT	NT	NT		62		
FERREIRA et al.	1997	84	19	1,2	34,5	0	17,8	NT	NT			22,6	
WILSON & FRANCIS	1986	223	47,5	13,4	30	5,4	NT	NT	NT			4	
GARCIA et al.	1987	56	17,8	1,8	10,7	NT	NT	NT	NT		66		
NAGAZAWA et al.	1987	214	18,2	17,3	0,5	0,5	NT	NT	NT			47,2	
FAIRBROTHER et al.	1988	99	7,2	32,3	23,2	15,1	NT	5	NT			42,4	29,3
SÖDERLIND et al.	1988	505	41,5	11,2	4,1	0,2	NT	NT	NT				
NAGY et al.	1990	205	61,4	0	0	0	NT	NT	NT			38,5	
HAREL et al.	1991	1226	23,4	0	0	0	NT	NT	NT				
SALAJKA et al.	1992	212	22	0	0	0	NT	NT	NT				
IMBERECHTS et al.	1994	50	18	NT	NT	NT	NT	NT	70				
Atual pesquisa	2000	35	62,9	0	0	0	NT	14,3	NT			11,4	

(a) número de cepas analisadas

(b) K88, K99 e CFA/I negativas

(c) K88, K99 e 987P negativas

(d) K88, K99, 987P e F41 negativas

(e) K99, 987P, F41 e F165 negativas

NT: não testado

TABELA 18 - CEPAS ETEC E NÃO ETEC SEM ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA

AUTORES	CEPAS SEM ANTÍGENO DE ADERÊNCIA (*)	ETEC		NÃO ETEC	
		Nº CEPAS	%	Nº CEPAS	%
OLIVEIRA et al. (1982)	87	32	36,8	55	63,2
CASTRO et al. (1984)	420	118	28,1	302	71,9
CARVALHO et al. (1991)	62	12	19,4	50	80,6
TOTAL	569	162	28,5	407	71,5

* Cepas 3P negativas (K88, K99 e 987P)

TABELA 19 - PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA

AUTORES	Nº CEPAS	PRESENÇA DE ANTÍGENO DE ADERÊNCIA (*)		SEM ANTÍGENO DE ADERÊNCIA	
		Nº CEPAS	%	Nº CEPAS	%
OLIVEIRA et al. (1982)	133	46	34,6	87	65,4
CASTRO et al. (1984)	477	57	11,9	420	88,1
GATTI et al. (1985)	323	43	13,3	280	86,7
CARVALHO et al. (1991)	100	38	38,0	62	62,0
TOTAL	1033	184	17,8	849	82,2

* K88, K99 ou 987P

TABELA 20 - PORCENTAGENS DE CEPAS DE *Escherichia coli* RESISTENTES

AUTORES	Nº	PN	AP	CF	GN	NO	ET	KN	SF	SFT	TT	CO	NA	NOR	PL	NT
LARIVIÈRE & LALLIER (1976)	112		19,6			21,4	95,5					90,1	21,4			
SAIDA et al. (1981)	796		30				83,4	40,3	83,4			90,3	17,1			
LOPEZ et al. (1982)	39	100	33,3	33,3	0,0	43,5	71,8	23,1		15,4	76,9	0,0	0,0		0,0	7,7
HARNETT e GYLES (1984)	34		53				73,5	32,3	91,1			76,4	5,8			
GONZALEZ e BLANCO (1986)	57		0,0		59,6		100	0,0				82,4	17,5	0,0		0,0
GARCÍA et al. (1987)	56		57,1		21,4		23,2	46,4				98,2	10,7			57,1
BROES et al. (1988)	12		58,3	8,3	0,0		100	66,6				8,3	41,6			
ZGUR-BERTOK e GRABNAR (1991)	3		66,6				66,6	33,3				100	100	0,0		
CARVALHO et al. (1991)	100	82		72								93				
Atual pesquisa	32	100	25	9,4	0,0	12,5	43,7	9,4	50	28,2	62,5	15,6	9,4	0,0	0,0	0,0

PN: penicilina

AP: ampicilina

CF: cefalotina

GN: gentamicina

NO: neomicina

ET: estreptomicina

KN: canamicina

SF: sulfonamida

SFT: sulfa+trimetoprim

TT: tetraciclina

CO: cloranfenicol

NA: ácido nalidixico

NOR: norfloxacina

PL: polimixina

NT: nitrofurantoína

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALONSO, P.; BLANCO, M.; GONZALEZ, E.A. Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infections. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 48, p. 391-396, 1987.
- 2 ALVAREZ, M.; PANIAGUA, C.; SUAREZ, S. *Escherichia coli* enterotoxigênicos que expresan simultâneamente fimbrias de adhesión K88 y 987P. In: CONGRESSO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA (10: 1985: Valencia). **Anais...** Valencia: Sociedad Española de Microbiología, 1985. p. 282.
- 3 ANING, K.G.; THOMLINSON, J.R.; WRAY, C.; SOJKA, W.J.; COULTER, J. Adhesion factor distinct from K88, K99, F41, 987P, CFAI and CFAll in porcine *Escherichia coli*. **Vet. Rec.**, London, v. 12, p. 251, mar. 1983.
- 4 ATTRIDGE, S.; HACKETT, J.; MORONA, R.; WHYTE, P. Towards a live oral vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli* of swine. **Vaccine**, Oxon, v. 6, p. 387, 1988.
- 5 BARCELLOS, D.E.S.N. Diarréias dos suínos: etiologia, diagnóstico e controle. In: SIMPÓSIO DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES E SIMPÓSIO CATARINENSE DE SANIDADE SUÍNA (2 : 1980 : Concórdia). **Anais...** Concórdia : EMBRAPA, 1980. p. 25-31.
- 6 _____ ; BAPTISTA, P.J.H.P. Colibacilose suína: novos tipos sorológicos de *Escherichia coli* identificados em municípios do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Boletim IPVDF**, Guaíba, v. 4, p. 65-71, 1977.
- 7 _____ ; GUIZZARDI, I.I.; FALLAVENA, L.C.B. Freqüência e causa de diarréias em suínos nas zonas do Vale do Taquari e Missões; Rio Grande do Sul; Brasil. **Bol. IPVDF**, Guaíba, v. 7, p. 27-37, 1980.
- 8 _____ ; SOBESTIANSKY, J. Emprego de antimicrobianos em associação. In: _____. **Uso de antimicrobianos em suinocultura**. Goiânia: Copyright, 1998. p. 24-27.
- 9 BARNES, E. Anaerobic bacteria of the normal intestinal microflora of animals. In: _____. **Anaerobic bacteria in habitats other than man**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986. p. 225-238.
- 10 BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, Hagerstown, v. 45, p. 493-496, 1966.
- 11 **BERGEY'S manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 408 *seq.*

- 12 BERTSCHINGER, H.U.; BACHMANN, M.; METTLER, C.; POSPISCHIL, A.; SCHRANER, E.M.; STAMM, M.; SYDLER, T.; WILD, P. Adhesive fimbriae produced *in vivo* by *Escherichia coli* O139:K12(B) :H1 associated with enterotoxaemia in pigs. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 25, p. 267-281, 1990.
- 13 BEUTIN, L.; BODE, L.; ÖZEL, M.; STEPHAN, R. Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 172, n. 11, p. 6469-6475, 1990.
- 14 _____; MONTENEGRO, M.A.; ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, p. 2559-2564, 1989.
- 15 BIER, O. Técnicas bacteriológicas. In: _____. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1985. p. 784.
- 16 BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; GONZALEZ, E.A.; BLANCO, M.; GARABAL, J.I. Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor (CNF) by P-fimbriate strains. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 31, p. 175-183, 1990.
- 17 BRAUNSTEIN, M.; MLADINEO, M.A. *Escherichia coli* strains producing hydrogen sulfide in iron-agar medium. **Am. J. Clin. Pathol.**, Hagerstown, v. 62, p. 420-424, 1974.
- 18 BRITO, Benito Guimarães de; FILIPPSEN, Laerte Francisco; MORES, Nelson; BRENTANO, Liana; BRITO, Maria Aparecida V. P. Etiologia da diarréia de leitões lactentes em granjas suínícolas do sudoeste do Paraná. **Semina Ci. Agr.**, Londrina, v.16, n. 1, p. 13-17, mar. 1995.
- 19 BROES, A.; FAIRBROTHER, J.M.; MAINIL, J.; HAREL, J.; LARIVIÈRE S. Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O8:KX105 and O8:K"2829" strains isolated from piglets with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 26, n. 11, p. 2402-2409, 1988.
- 20 BURGESS, M.N.; BYWATER, R.J.; COWLEY, C.M.; MULLAN, N.A.; NEWSOME, P. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. **Infect. Immun.**, Washington, v. 21, p. 526-531, 1978.
- 21 CAPRIOLI, A.; DONNELI, G.; FALBO, L. A cell division-active protein from *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 118, p. 587-593, 1984.

- 22 _____; FALBO, V.; RUGGERI, F.M. Cytotoxic necrotizing factor production by haemolytic strains of *Escherichia coli* causing extra-intestinal infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 25, p. 146-149, 1987.
- 23 CARDELLA, M.A.; HUHN, R.G.; WILSON, M.R. Immunity to neonatal colibacillosis: field studies. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v. 164, p. 299-303, 1974.
- 24 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. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.**, Paris, v. 44, n. 1, p. 49-52, 1991.
- 25 CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B.; BRITO, J.R.F.; BARCELLOS, D.S.E.N.; COLLI, I.A.G. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concórdia, Santa Catarina, Brazil. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 109-114, 1984.
- 26 DE GRAAF, F.K. Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immun.**, Berlin, v. 151, p. 29-53, 1990.
- 27 _____; MOOI, F.R. The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. **Adv. Microbiol. Physiol.**, London, v. 28, p. 65-143, 1986.
- 28 DE RYCKE, J.; GONZALEZ, E.A.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BLANCO, M.; BOIVIN, R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factors in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, p. 694-699, 1990.
- 29 _____; GUILLOT, J.F.; BOIVIN, R. Cytotoxins in nonenterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 15, p. 137-150, 1987.
- 30 DUGUID, J.P.; CLEGG, S.; WILSON, M.I. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 12, p. 213-227, 1979.
- 31 _____; SMITH, W.; DEMPSTER, G.; EDMUNDS, P.N. Nonflagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. **J. Pathol. Bacteriol.**, Edinburgh, v. 70, p. 335-348, 1955.
- 32 ECHEVERRIA, P.; SERIWATANA, J.; TAYLOR, D.N.; TIRAPAT, C.; ROWE, B. *Escherichia coli* contains plasmids coding for heat-stable b, other enterotoxins, and antibiotic resistance. **Infect. Immun.**, Washington, v. 48, n. 3, jun. 1985. p. 843-846.

- 33 ENDO, Y.; TSURUGI, K.; YUTSUDO, T.; TAKEDA, Y.; OGASAWARA, T.; IGARASHI, K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 171, p. 45-50, 1988.
- 34 EUTIS, S.L.; NELSON, D.T. Lesions associated with coccidiosis in nursing piglets. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 18, p. 21-28, 1981.
- 35 EWING, W.H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier Science, 1986.
- 36 FAHMY, M.H.; BERNARD, C. Causes of mortality in Yorkshire pigs from birth to 20 weeks of age. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v. 51, p. 351-359, 1971.
- 37 FAIRBROTHER, J.M. Enteric colibacillosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of swine**. Iowa: State University Press, 1992. p. 489-497.
- 38 _____; BROES, A.; JACQUES, M.; LARIVIÈRE, S. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 50, n. 7, p. 1029- 1036, 1989.
- 39 _____; LARIVIÈRE, S.; JOHNSON, W.M. Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhea. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 49, n. 8, p. 1325-1328, 1988.
- 40 _____; _____; LALLIER, R. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. **Infect. Immun.**, Washington, v. 51, n. 1, p. 10-15, 1986.
- 41 FERREIRA, A.J.P.; BRITO, B.G.; TAGLIARI, K.C.; SARIDAKIS, H.O. Fímbrias (F41, F42, 987P, K88, K99, Fy) e enterotoxinas (STa e LTI) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarréia na região de Londrina-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS (1997 : Foz do Iguaçu). **Anais...** Foz do Iguaçu, 1997. p. 213-214.
- 42 FIELD, M.; GRAF, L.H.; LAIRD JUNIOR, W.J; SMITH, P.L. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: *in vitro* effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 75, p. 2800-2804, 1978.
- 43 FITZGERALD, G.R.; BARKER, T.; WELTER, M.W.; WELTER, C.J. Diarrhea in young pigs: comparing the incidence of the five most common infectious agents. **Vet. Med.**, Bonner Springs, v. 83, n. 1, p. 80-86, 1988.

- 44 FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; MOSBY, A.S.W. Enterobacteriaceae. In: _____. **Bailey and Scott's diagnostic microbiology** . 10. ed. St. Louis : s.n., 1998. p. 509-526.
- 45 FRANCIS, D.H.; WILLGOHS, J.A. Evaluation of a live a virulent *Escherichia coli* vaccine for K88+, LT+ enterotoxigenic colibacillosis in weaned pigs. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 52, n. 7, p. 1051-1055, 1991.
- 46 FRANKLIN, A.; SÖDERLIND, O.; MÖLLBY, R. Plasmids coding for enterotoxins, K88 antigens and colicins in porcine *Escherichia coli* strains of O-group 149. **Med. Microbiol. Immunol.**, Berlim, v. 170, p. 63-72, 1981.
- 47 FRANTZ, J.C.; MELLENCAMP, M.W. Production and testing of *Escherichia coli* (LTb) toxoid. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NEONATAL DIARRHEA (4 : 1983 : Saskatoon). **Anais...** Saskatoon : 1983. p. 500-517.
- 48 GAASTRA, W.; DE GRAAF, F.K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 46, n. 2, p. 129-161, 1982.
- 49 GANNON, V.P.J.; GYLES, C.L. Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 24, p. 89-100, 1990.
- 50 _____; _____; FRIENDSHIP, R.W. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. **Can. J. Vet. Res.**, Ottawa, v. 52, p. 331-337, 1988.
- 51 GARABAL, J.I.; GONZALEZ, E.A.; VAZQUEZ, F.; BLANCO, J; BLANCO, M.; BLANCO, J.E. Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 48, p. 113-123, 1996.
- 52 GARCÍA, D.; CAVAZZA, M.E.; BOTERO, L.; GORZIGLIA, M.; URBINA, G.; LIPRANDI, F.; ESPARZA, J. Preliminary characterization of *Escherichia coli* from pigs with diarrhoea in Venezuela. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 13, p. 47-56, 1987.
- 53 GASKINS, H.R.; KELLEY, K.W. Immunology and neonatal mortality. In: VARLEY, M.A. **The neonatal pig**. CAB International, 1995. p. 39-55.
- 54 GATTI, M.S.V.; SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.P. Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas para suínos isoladas no Brasil. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 21-30, jan./mar. 1985.
- 55 GONZALES, E.A.; BLANCO, J. Colonization antigens, antibiotic resistance and plasmid content of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Galicia (North-Western Spain). **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 11, p. 271-283, 1986.

- 56 _____ ; _____. Production of cytotoxin VT in enteropathogenic and nonenteropathogenic *Escherichia coli* strains of porcine origin. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 26, p. 127-130, 1985.
- 57 GORDON, V.M.; WHIPP, S.C.; MOON, H.W.; O'BRIEN, A.D.; SAMUEL, J.E. An enzymatic mutant of Shiga-like toxin-II variant is a vaccine candidate for oedema disease of swine. **Infect. Immun.**, Washington, v. 60, p. 485-490, 1992.
- 58 GREEN, B.A.; NEILL, R.J.; RUYECHAN, W.T.; HOLMES, R.K. Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucaryotic target cells is not plasmid mediated. **Infect. Immun.**, Washington, v. 41, p. 383-390, 1983.
- 59 GUINÉE, P.A.M.; VELTKAMP, J.; JANSEN, W.H. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 15, p. 676-678, 1977.
- 60 GUTH, B.E.C.; TWIDDY, E.M.; TRABULSI, L.R.; HOLMES, R.K. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 54, n. 2, p. 529-536, 1986.
- 61 GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 38, p. 734-746, 1992.
- 62 _____. *Escherichia coli* enterotoxins. In: _____. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford: Cab International, 1994. p. 337-364.
- 63 _____. *Escherichia coli* verotoxins and other cytotoxins. In: _____. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford: Cab International, 1994. p. 365-398.
- 64 _____ ; BARNUM, D.A. A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 120, n. 4, p. 419-426, 1969.
- 65 _____ ; PALCHAUDHURI, S.; MAAS, W.K. Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. **Science** (Wash. DC), v. 198, p. 198-199, 1977.
- 66 _____ ; SO, M.; FALKOW, S. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 130, p. 40-49, 1974.
- 67 HACKER, J. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 38, p. 720-727, 1992.

- 68 _____; HUGHES, C.; HOF, H.; GOEBEL, W. Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. **Infect. Immun.**, Washington, v. 42, n. 1, p. 57-63, 1983.
- 69 HAREL, J.; LAPOINTE, H.; FALLARA, A.; LORTIE, L.A.; BIGRAS-POULIN, M.; LARIVIÈRE, S.; FAIRBROTHER, J.M. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, n. 4, p. 745-752, 1991.
- 70 HARNETT, N.M.; GYLES, C.L. Enterotoxin plasmids in bovine and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of O groups 9, 20, 64 and 101. **Can. J. Comp. Med.**, Ottawa, v. 49, p. 79-87, 1985.
- 71 _____; _____. Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 48, n. 5, p. 930-935, nov. 1984.
- 72 HOLLAND, R.E. Some infections causes of diarrhoea in young farm animals. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 3, n. 4, p. 345-375, 1990.
- 73 HUGHES, J.M.; MURAD, F.; CHANG, B.; GUERRANT, R.L. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Nature (Lond.)**, v. 271, p. 755-756, 1978.
- 74 IGARASHI, K.; OGASAWARA, T.; ITO, K.; YUTSUDO, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of elongation factor 1-dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes by Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 and by Shiga toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 44, p. 91-94, 1987.
- 75 IMBERECHTS, H.; BERTSCHINGER, H.U.; STAMM, M.; SYDLER, T.; POHL, P.; De GREVE, H.; HERNALSTEENS, J.P.; Van MONTAGU, M.; LINTERMANS, P. Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 40, p. 219-230, 1994.
- 76 INSTITUTO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS DESIDÉRIO FINAMOR. Manual para coleta e remessa de material para exame de laboratório. Guaíba-RS, 1981. n. p. (Apostila).
- 77 ISAACSON, R.E. Vaccines against *Escherichia coli* diseases. In: GYLES, C.L. ***Escherichia coli* in domestic animals and humans** Wallingford: Cab International, 1994. p. 629-647.

- 78 ISHIGURO, N.; SATO, G. The distribution of plasmids determining citrate utilization in citrate-positive variants of *Escherichia coli* from human, domestic animals, feral birds and environments. **J. Hyg.** Cambridge, v. 83, p. 331-344, 1979.
- 79 JANN, K.; JANN, B. Capsules of *Escherichia coli* and biological significance. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 38, p. 705-710, 1992.
- 80 JOHNSON, W.M.; LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. **Microb. Pathog.**, London, v. 4, p. 103-113, 1988.
- 81 JONES, G.W.; RUTTER, J.M. Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. **Infect. Immun.**, Washington, v. 6, p. 918-927, 1972.
- 82 JONES, J.E.T.; SELLERS, K.C.; SMITH, H.W. The evaluation of live and dead *Escherichia coli* vaccines administered to the pregnant female in the prevention of scouring (diarrhea) in piglets. **Vet. Rec.**, London, v. 74, n. 7, p. 202-203, 1962.
- 83 KAUFFMANN, F. Zur serologie der *coli*-gruppe. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, Copenhagen, v. 21, p. 20-45, 1944.
- 84 _____. The serology of the *coli* group. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 57, p. 71-100, 1947.
- 85 KEENAN, K.P.; SHARPNACK, D.D.; COLLINS, H.; FORMAL, S.B.; O'BRIEN, A.D. Morphologic evaluation of the effects of Shiga toxin, and *E. coli* shiga-like toxin on the rabbit intestine. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 125, p. 69-80, 1986.
- 86 KENNAN, R.M.; MONCKTON, R.P. Adhesive fimbriae associated with porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of the O141 serotype. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, p. 2006-2011, Sept. 1990.
- 87 KENNEDY, D.J.; GREENBERG, R.N.; DUNN, J.A.; ABERNATHY, R.; RYERSE, J.S.; GUERRANT, R.L. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits and piglets. **Infect. Immun.**, Washington, v. 46, n. 3, p. 639, 1984.
- 88 KERNKAMP, H.C.H. Birth and death statistics on pigs of preweaning age. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 146, p. 337-340, 1965.

- 89 KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C.J. Basic bacteriology, concepts of virulence, and technologic advances in clinical microbiology: an overview. In: _____. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1997. p. 1-67.
- 90 _____. The *Enterobacteriaceae*. In: _____. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1997. p. 171-252.
- 91 KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 18, p. 775-779, 1977.
- 92 LANGENEGGER, J.; AMORIM, A.F.; LANGENEGGER, C.H. Surto da doença do edema do suíno em Concórdia, Santa Catarina. **Pesqui. Agropec. Bras., Ser. Vet.**, Brasília, v. 9, p. 87-90, 1974.
- 93 LARIVIÈRE, S.; LALLIER, R. *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic piglets in the Province of Quebec. **Can. J. Comp. Med.**, Ottawa, v. 40, p. 190-197, 1976.
- 94 LE SAGE, A.A. Contribution a l'étude des enterites infantiles-sero-diagnostic des races de *Bacterium coli*. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.**, Paris, v. 49, p. 900-901, 1897.
- 95 LINGGOOD, M.A.; THOMPSON, J.M. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 25, p. 359-362, 1987.
- 96 LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford: Cab International, 1994. p. 31-72.
- 97 LOPEZ, A.G.; KADIS, S.; SHOTTS, E.B. Enterotoxin production and resistance to antimicrobial agents in porcine and bovine *Escherichia coli* strains. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 43, n. 7, p. 1286-1287, 1982.
- 98 LOPEZ-ALVAREZ, J.; GYLES, C.L.; SHIPLEY, P.; FALKOW, S. Genetic and molecular characteristics of Vir plasmids of bovine septicemic *E. coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 141, p. 758-769, 1980.
- 99 MACLEOD, D.L.; GYLES, C.L. Immunization of pigs with a purified Shiga-like toxin II variant toxoid. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 29, p. 309-318, 1991.
- 100 _____; _____; WILCOCK, B.P. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin II variant. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 28, p. 66-73, 1991.

- 101 MADEC, F.; JOSSE, J. Influence of environmental factors on the onset of digestive disorders of the weaned piglets. **Ann. Rech. Vet.**, Paris, v. 14, n. 4, p. 456-462, 1983.
- 102 MARTINEAU, G.P.; VAILLANCOURT, J.P.; BROES, A. Principal neonatal diseases. In: VARLEY, M.A. **The neonatal pig – development and survival**. [S.l.]: Cab International, 1995. p. 239-268.
- 103 McCONNELL, M.M.; SMITH, H.R.; WILLSHAW, G.A.; FIELD, A.M.; ROWE, B. Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli*: comparison of their properties. **Infect. Immun.**, Washington, v. 32, p. 927-936, 1981.
- 104 MOON, H.W.; BUNN, T.O. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. **Vaccine**, Oxon, v. 11, n. 2, p. 213-220, 1993.
- 105 _____; RUNNELS, P.L. Trials with somatic (O) and capsular (K) antigens in vaccines for swine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NEONATAL DIARRHEA (4 : 1983 : Saskatoon). **Anais...** Saskatoon : 1983. p. 558-569.
- 106 MORGAN, R.L.; ISAACSON, R.E.; BRINTON, C.C.; MOON, H.W. Immunization of neonatal suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea by vaccinating dams with purified 987P ou K99 pili: protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. **Infect. Immun.**, Washington, v. 22, p. 771-777, 1978.
- 107 MORILLA, A; ARRIAGA, C.; RUIZ, A.; MARTINEZ, A.G.; CIGARROA, R.; VELAZQUEZ, A. Association between diarrhoea and shedding of group A and atypical groups B to E rotaviruses in suckling pigs. **Ann. Rech. Vet.**, Paris, v. 22, p. 193-200, 1991.
- 108 MORRIS, J.A.; THORNS, C.J.; WELLS, G.A.H.; SCOTT, A.C.; SOJKA, W.J. The production of F41 fimbriae by piglet strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack K88, K99 and 987P fimbriae. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 129, p. 2753-2759, 1983.
- 109 MOSELEY, S.L.; DOUGAN, G.; SCHNEIDER, R.A.; MOON, H.W. Cloning of chromosomal DNA encoding the F41 adhesin of enterotoxigenic *escherichia coli* and genetic homology between adhesins F41 and K88. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 167, p. 799-804, 1986.
- 110 _____; HARDY, J.W.; HUQ, M.I. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 39, n. 3, p. 1167-1174, 1983a.

- 111 _____; SAMADPOUR-MOTALEBI, M.; FALKOW, S. Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 156, n. 1, p. 441-443, 1983b.
- 112 MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. Bacterial genetics. In: _____. **Medical microbiology**. St. Louis : Mosby, 1998. p. 31-42.
- 113 NABUURS, M.J.A. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. **Vet.Q.**, Dordrecht, v. 20, p. 42-45, 1998.
- 114 NAGY, B.; ARP, L.H.; MOON, H.W.; CASEY, T.A. Colonization of the small intestine of weaned pigs by enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack known colonization factors. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 29, p. 239-246, 1992.
- 115 _____; CASEY, T.A.; MOON, H.W. Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 4, p. 651-653, 1990.
- 116 _____; MOON, H.W.; ISAACSON, R.E.; BRINTON, C.C. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. **Infect. Immun.**, Washington, v. 21, p. 269-274, 1978.
- 117 NAKAZAWA, M.; SUGIMOTO, C.; ISAYAMA, Y.; KASHIWAZAKI, M. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from piglets with neonatal and post-weaning diarrhea in Japan. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 13, p. 291-300, 1987.
- 118 NIELSEN, N.O.; MOON, H.W.; ROE, W.E. Enteric colibacillosis in Swine. **J. Am. Vet. Ass.**, Schaumburg, v. 153, n. 12, p. 1590-1606, 1968.
- 119 O'BRIEN, A.D.; LaVECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 146, p. 763-769, 1982.
- 120 OLIVEIRA, M.S.; CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B. Produção de enterotoxinas e resistência a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarréia. **R. Microbiol.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 135-142, 1982.
- 121 _____; _____; _____; GIORGI, W. Mannose-resistant haemagglutination and colonization factors among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Vet. Rec.**, London, v. 109, p. 275-278, 1981.

- 122 ØRSKOV, F. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 408 seq.
- 123 ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. **J. Hyg.**, Cambridge, v. 95, p. 551-575, 1985.
- 124 _____; _____. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. I. transmission of the determinant of the K88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 91, p. 69-75, 1966.
- 125 _____.; _____. Serology of *Escherichia coli* fimbriae. **Prog. Allergy**, Basel, v. 33, p. 80-105, 1983.
- 126 _____; JANN, B.; JANN, K. Serology chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriol. Rev.**, Washington, v. 41, p. 667-710, 1977.
- 127 _____; SOJKA, W.J.; LEACH, J.M. Simultaneous occurrence of *E. coli* B and L antigens in strains from diseased swine. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 53, p. 404-422, 1961.
- 128 OSWALD, E.; DE RYCKE, J.; GUILLOT, J.F.; BOIVIN, R. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell cultures associated with the presence of Vir plasmid in *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 58, p. 95-100, 1989.
- 129 PELCZAR, M.J.; CHAIN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Antibióticos e outros agentes quimioterápicos. In: _____. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo : Makron, 1997. p. 111-140.
- 130 PENARANDA, M.E.; EVANS, D.G.; MURRAY, B.E.; EVANS, D.J. ST:LT:CFA/II plasmids in enterotoxigenic *Escherichia coli* belonging to serogroups O6, O8, O80, O85 and O139. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 154, p. 980-983, 1983.
- 131 PORTER, P.; KENWORTHY, R.; ALLEN, W.D. Effect of oral immunization with *E. coli* antigens on post weaning enteric infection in the young pig. **Vet. Rec.**, London, v. 95, p. 99-104, 1974.
- 132 PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D. Fluoroquinolones. In: _____. **Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine**. Iowa : Iowa State University Press, 1991. p. 252-262.
- 133 QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Enterobacteriaceae*. In: _____. **Clinical veterinary microbiology**. [S.l.]: Wolf Publishing. 1994. p. 209-236.

- 134 REIS, R. Imunologia suína. In: SIMPÓSIO DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES E SIMPÓSIO CATARINENSE DE SANIDADE SUÍNA (2 : 1980 : Concórdia). **Anais...** Concórdia ; EMBRAPA, 1980. p. 99-102.
- 135 ROSE, R.; WHIPP, S.C.; MOON, H.W. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b on small intestinal villi in pigs, rabbits and lambs. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 24, p. 71-79, 1987.
- 136 RUTTER, J.M.; JONES, G.W. Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli* – a model for vaccination with a virulence determinant ? **Nature**, London, v. 242, p. 531-532, 1973.
- 137 _____ ; _____ ; BROWN, G.T.H.; BURROWS, M.R.; LUTHER, P.D. Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric disease caused by K88-positive *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 13, n. 3, p. 667-676, 1976.
- 138 SAIDA, K.; IKE, Y.; MITSUHASHI, S. Drug resistance and R plasmids of *Escherichia coli* strains isolated from pigs, slaughterers, and breeders of pigs in Japan. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 19, n. 6, p. 1032-1036, Jun. 1981.
- 139 SALAJKA, E.; SALAJKOVA, Z.; ALEXA, P.; HORNICH, M. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 32, p. 163-175, 1992.
- 140 SATO, G.; ASAGI, M.; OKA, C.; ISHIGURO, N.; TERAKADO, N. Transmissible citrate-utilizing ability in *Escherichia coli* isolated from pigeons, pigs and cattle. **Microbiol. Immun.**, Tokyo, v. 22, n. 6, p. 357-360, 1978.
- 141 SAVARINO, S.J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D.C.; LEVINE, M.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 87, p. 1450-1455, 1991.
- 142 SCHIFFERLI, D.M.; BEACHEY, E.H.; TAYLOR, R.K. The 987P fimbrial gene cluster of enterotoxigenic *Escherichia coli* is plasmid encoded. **Infect. Immun.**, Washington, v. 58, n. 1, p. 149-156, 1990.
- 143 SCHNEIDER, R.A.; TO, S.C.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains that express K88 and 987P pilus antigens. **Infect. Immun.**, Washington, v. 36, n. 1, p. 417-418, 1982.

- 144 SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; ROWE, B. Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, Boston, v. 2, n. 8460, p. 885-886, 1985.
- 145 SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.P.; REIS, M.H.L.; TRABULSI, L.R. Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. **Infect. Immun.**, Washington, v. 24, n. 3, p. 606-610, 1979.
- 146 SHIPLEY, P.L.; GYLES, C.L.; FALKOW, S. Characterization of plasmids that encode for the K88 colonization antigen. **Infect. Immun.**, Washington, v. 20, n. 2, p. 559-566, 1978.
- 147 SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.; TRABULSI, L.R. Correlation of invasiveness with plasmid in enteroinvasive strains of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 146, p. 706, 1982.
- 148 SMITH, H.W. The haemolysins of *Escherichia coli*. **J. Pathol. Bacteriol.**, Edinburgh, v. 85, p. 197-211, 1963.
- 149 _____. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-mediated toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated with, or identical with, colicine V. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 83, p. 95-111, 1974.
- 150 _____; GREEN, P.; PARSELL, Z. Vero cell toxins in *Escherichia coli*, and related bacteria: transfer by phage and conjugation, and toxic action in laboratory animals, chickens, and pigs. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 129, p. 3121-3137, 1983.
- 151 _____; GYLES, C.L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 3, p. 387-401, 1970.
- 152 _____; HALLS, S. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. **J. Pathol. Bacteriol.**, Edinburgh, v. 93, p. 531-543, 1967.
- 153 _____; _____. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 52, p. 319-334, 1968.
- 154 _____; LINGGOOD, M.A. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by a typical piglet strains and by calf and lamb strains. The transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 5, p. 243-250, 1972.

- 155 _____; _____. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 4, p. 467-485, 1971.
- 156 _____; PARSELL, Z. Transmissible substrate-utilising ability in enterobacteria. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 87, p. 129-140, 1975.
- 157 SO, M.; CRANDALL, J.F.; CROSA, J.H.; FALKOW, S. Extrachromosomal determinants which contribute to bacterial pathogenicity. In: SCHLESSINGER, D. **Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1974. p. 16-26.
- 158 _____; McCARTHY, B.J. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 77, n. 7, p. 4011-4015, 1980.
- 159 SÖDERLIND, O.; THAFVELIN, B.; MÖLLBY, R. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from Swedish piglets with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 26, n. 5, p. 879-884, 1988.
- 160 SOJKA, W.J. Enteric diseases in new-born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. **Vet. Bull.**, Weybridge, v. 41, p. 509-522, 1971.
- 161 _____. Enteropathogenic *Escherichia coli* in man and farm animals. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, Ottawa, v. 6, p. 52-63, 1973.
- 162 _____. Practical procedures in studies of members of the genus *Escherichia*. In: _____. **Escherichia coli in domestic animals and poultry**. England: Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal, 1965. p. 184-214.
- 163 STIRM, S.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; BIRCH-ANDERSEN, A. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. III. Morphology. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 93, p. 740-748, 1967.
- 164 STOKES, C.R.; BOURNE, J.F. Mucosal immunity. In: HALLIWELL, R.E.W. **Veterinary clinical immunology**. Philadelphia: Harcourt Brace Jovanovich Inc., 1989. p. 164-192.
- 165 STROCKBINE, N.A.; MARQUES, L.R.M.; NEWLAND, J.W.; SMITH, H.W.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. **Infect. Immun.**, Washington, v. 53, n. 1, p. 135-140, 1986.

- 166 SUAREZ, S.; PANIAGUA, C.; ALVAREZ, M.; RUBIO, P. Features of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of porcine origin that express K88 and 987P fimbrial antigens. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 13, p. 65-68, 1987.
- 167 TZIPORI, S. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, San Diego, v. 29, p. 103-206, 1985.
- 168 _____; CHANDLER, D.; SMITH, M.; MAKING, T.; HENNSESER, D. Factors contributing to post-weaning diarrhea in a large intensive piggyery. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v. 56, n. 6, p. 274-278, 1980.
- 169 UNITED STATES OF AMERICA. Department of Agriculture. **Prewaning morbidity and mortality: National Animal Health Monitoring System.** Washington, USDA, APHIS, 1991.
- 170 VAN BEERS-SCHREURS, H.M.G.; VELLENGA, L.; WENSING, Th.; BREUKINK, H.H.J. The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets; a review. **Vet. Q.**, Dordrecht, v. 14, p. 29-34, 1992.
- 171 WACHSMUTH, I.K.; DAVIS, B.R.; ALLEN, S.D. Ureolytic *Escherichia coli* of human origin: serological, epidemiological and genetic analysis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 10, p. 897-902, 1979.
- 172 WELCH, R.A. Microreview. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. **Molec. Microbiol.**, Oxford, v. 5, p. 521-528, 1991.
- 173 WHIPP, S.C.; KOKUE, E; MORGAN, R.W.; MOON, H.W. Functional significance of histologic alterations induced by *Escherichia coli* heat-stable, mouse-negative, pig-positive enterotoxin (STb). **Vet. Res. Commun.**, Dordrecht, v. 11, p. 41-55, 1987.
- 174 _____; MOSELEY, S.L.; MOON, H.W. Microscopic alterations in jejunal epithelium of 3-week-old pigs induced by pig-specific, mouse-negative, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 47, n. 3, p. 615, 1986.
- 175 WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; McCONNELL, M.M. Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in several *Escherichia coli* serotypes. **Infect. Immun.**, Washington, v. 37, p. 858-868, 1982.
- 176 WILSON, M.R.; BROWN, P.; SVENDSEN, J. Immunity to *Escherichia coli* in pigs: antibody secretion by the mammary gland after intramammary or intramuscular vaccination with a *E. coli* vaccine. **Can. J. Comp. Med.**, Ottawa, v. 36, p. 44-48, 1972.

- 177 WILSON, R.A.; FRANCIS, D.H. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 47, n. 2, p. 213-217, 1986.
- 178 WOLF, M.K.; ANDREWS, G.P.; FRITZ, D.L.; SJOGREN, R.W.; BOEDEKER, E.C. Characterization of the plasmid from *Escherichia coli* RDEC-1 that mediates expression of adhesin AF/R1 and evidence that AF/R1 pili promote but are not essential for enteropathogenic disease. **Infect. Immun.**, Washington, v. 56, p. 1846-1857, 1988.
- 179 WRAY, C.; WOODWARD, M.J. Laboratory diagnosis of *Escherichia coli* infections. In: GYLES, C.L. ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. Wallingford: Cab International, 1994. 595-628.
- 180 YANO, T.; LEITE, D.S.; CAMARGO, I. J.B.; CASTRO, A.F.P. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 30, n. 6, p. 495-508, 1986.
- 181 ZGUR-BERTOK, D.; GRABNAR, M. Plasmids encoding virulence factors and drug resistance determinants in porcine *Escherichia coli* strains. **Period. Biol.**, Zagreb, v. 93, n. 2, p. 153-160, 1991.