MARINA MORENO

**Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de
Escherichia coli associadas à diarreia pós-desmame
em suínos**

São Paulo

2015

MARINA MORENO

**Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli*
associadas à diarreia pós-desmame em suínos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

SÃO PAULO

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3107
FMVZ

Moreno, Marina

Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas à
diarreia pós-desmame em suínos / Marina Moreno. -- 2015.
70 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São
Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicadas às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicadas às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Diarreia. 2. Pós-desmame. 3. Suínos. 4. Antimicrobianos. 5. *Escherichia coli*. 6.
Resistência. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação entre os perfis plasmidiais de cepas de *Escherichia coli* isoladas do ciclo de produção suína carregando genes de resistência a cefalosporinas e quinolonas", protocolado sob o nº 2572/2012, utilizando 100 (cem) suínos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Plasmidial profile comparison in *Escherichia coli* strains isolated from commercial swine sources harboring resistance genes to cephalosporins and quinolones", protocol number 2572/2012, utilizing 100 (one hundred) pigs, under the responsibility Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MORENO, Marina

Título: Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas à diarreia pós-desmame em suínos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA:

Aos meus pais (in memoriam) e aos meus irmãos que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS:

À minha irmã, Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, pela oportunidade, atenção, dedicação, trabalho duro e apoio total.

Ao meu orientador, Prof. Titular José Soares Ferreira Neto pela confiança.

À Virbac pelo incentivo, por todas as chances concedidas.

À Prevtec Microbia que despertou meu interesse pela *E. coli*.

Aos colegas do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia que apoiaram e trabalharam nesse projeto, em especial:

Vasco Túlio de Moura Gomes, Luiza Zanolli Moreno, Ana Paula da Silva Santos, Maria Roberta Felizardo, Pedro Henrique Nogueira de Lima Filsner, Barbara Letícia Pereira da Costa, Thaís Sebastiana Porfida Ferreira, Ketrin Cristina da Silva, Givago Faria Ribeiro da Silva, Jucélia de Jesus Pereira, Alexandre Abelardo Sanches e Rosilma A. dos Reis Louro.

Aos meus colegas de trabalho e amigos Eduardo Pasquali, Clovis Bernardes de Souza Jr., Ludmila Diez Aires, Arthur Meletti, Wellington Rossito, Luis Gustavo Fonte Bôa de Mello, José Gazal Curvelo e Mehdi Laraichi pelas concessões e compreensão.

Aos colegas das distribuidoras que me acompanharam na coleta destas amostras, Daniel Borelli, Rodinei Bazetto, Luciano Flores, Roberto Vieira e Eduardo Zanela.

À minha família, incluindo Gustavo de Moraes pela paciência nesse finalzinho e ao Miro e ao Miguel pelo amor incondicional e pela não tão grande compreensão quando tive que me ausentar ou negar-lhes atenção.

RESUMO

MORENO, M. **Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas à diarreia pós-desmame em suínos.** [Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* strains associated with from post-weaning swine]. 2015. 70 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A *Escherichia coli* é um dos principais agentes envolvidos na síndrome da diarreia pós-desmame em suínos, sendo a infecção de difícil controle devido à elevada capacidade deste agente em desenvolver e disseminar mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento da doença. No presente estudo foi estabelecido o perfil de virulência de cepas de *E. coli* isoladas de 621 leitões com sintomas de diarreia na fase de creche (21 a 40 dias de vida), provenientes de 52 granjas de suínos no Brasil. Foram selecionadas 148 cepas de *E. coli*, positivas para fímbria F4 e /ou F18 e destas foi determinado o perfil de resistência à antimicrobianos por determinação da concentração inibitória mínima para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, clindamicina, clortetraciclina, danofloxacina, enrofloxacina, florfenicol, gentamicina, neomicina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina, espectinomicina, trimetoprima / sulfametoxazole, tiamulina, tilmicosina, tulatromicina, tilosina, ceftiofur e enrofloxacina. Dos 621 animais observados, 321 animais foram positivos para pelo menos um fator de virulência. Das cepas estudadas, todas as 148 foram resistentes a tilosina, clindamicina, tiamulina, tilmicosina e sulfadimetoxina. A frequência de cepas resistentes foi elevada também para o oxitetraciclina, clortetraciclina, danofloxacina, ampicilina e ao florfenicol. Considerando-se o fato de 100% das cepas terem apresentado resistência a mais de três classes de antimicrobianos pode-se concluir que todas as cepas de *E.coli* do presente estudo foram multirresistentes sendo frequente a resistência aos principais antimicrobianos utilizados na terapia da diarreia em leitões de creche.

Palavras-chave: Diarreia. Pós-desmame. Suínos. Antimicrobianos. *Escherichia coli*. Resistência.

ABSTRACT

MORENO, M. **Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* strains associated with from post-weaning swine** [Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas à diarreia pós-desmame em suínos]. 2015. 70 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Escherichia coli is one of the agents involved in the syndrome of post-weaning diarrhea in swine. The infection is difficult to control because of high ability of this agent to develop and spread antimicrobial resistance mechanisms against commonly used antibiotics. This study has as goal determine the virulence profile of *E. coli* strains isolated of 621 piglets with diarrhea symptoms in the nursery with 21-40 days of age, from 52 pig farms in Brazil. Of the isolated strains, we selected 148 strains of *E. coli*, positive for F4 fimbriae and / or F18 and these were tested for antimicrobial resistance for determining the minimum inhibitory concentration for the following antibiotics: ampicillin, clindamycin, chlortetracycline, danofloxacin, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, neomycin, oxytetracycline, sulfadimethoxin, spectinomycin, trimethoprim / sulfamethoxazole, tiamulin, tilmicosin, tulathromycin, tylosin, ceftiofur and enrofloxacin. Of the 621 observed animals 321 animals were positive for at least one virulence factor. Of the studied strains, all 148 were resistant to tylosin, clindamycin, tiamulin, tilmicosin and sulfadimethoxin. The frequency of resistant strains was also high for oxytetracycline, chlortetracycline, danofloxacin, ampicillin and florfenicol. Considering the fact that 100% of the strains have shown resistance to more than three classes of antimicrobials can be concluded that all *E. coli* strains in this study were multidrug-resistant and are frequent the resistance to the main antimicrobials used in therapy of diarrhea in nursery pigs.

Keywords: Diarrhea. Post-weaning. Swine. Antimicrobials. *Escherichia coli*. Resistance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	ETIOLOGIA	14
2.2	INFECÇÃO EM SUÍNOS.....	19
2.3	CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE	23
3	OBJETIVOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	AMOSTRAS	29
4.2	ISOLAMENTO E REPIQUE DAS CEPAS	29
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ATRAVÉS DA PCR	31
4.4	PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA	32
4.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS	35
4.6	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (DI)	35
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	63

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a mais consumida no mundo e estima-se que pelos próximos cinco anos continuará ocupando essa posição. Para atender a esta demanda, a suinocultura mundial vem buscando níveis cada vez maiores de produtividade. Neste contexto, as criações tiveram que se modernizar, direcionando seus esforços para uma produção mais eficiente e de volumes e proporções cada vez maiores. As granjas modernas abrigam muitas vezes um alto número de animais em suas instalações e apesar de todas as medidas de biossegurança que podem e devem ser tomadas, a propagação de alguns agentes bacterianos ou virais torna-se uma fonte importante de preocupação para o médico veterinário sanitário, com foco não somente na manutenção da saúde dos animais como também na produtividade e desempenho. Por estas razões, o uso de antibióticos na suinocultura se tornou uma ferramenta importante e parte integrante do sistema de produção tecnificado, sendo eles usados não apenas como tratamento, mas também como métodos profiláticos e como promotores de crescimento na rotina das granjas no Brasil e no Mundo.

No Brasil o uso de antimicrobianos é ainda mais intenso se comparado à países da União Européia, que possuem legislações mais restritivas. Este uso chega a ser indiscriminado em algumas granjas ou regiões, não sendo incomum encontrar na rotina de visita às granjas, casos em que os animais não passam nenhum dia de suas vidas sem receber antibiótico por alguma via (via ração, água de bebida ou injetável). Segundo os dados do IMS, em 2014, o mercado de antimicrobianos para suínos movimentou mais de 146 milhões de reais, representando cerca de 31% do mercado de produtos veterinários para suínos, cerca de 8 milhões a mais do que o

mercado de biológicos (vacinas) que representou um total de 138 milhões de reais neste período (28%). Destes antimicrobianos a maior fatia do faturamento ficou com os antibióticos via ração, que movimentaram mais de 92 milhões de reais, sendo que destes antimicrobianos o sub-segmento que teve maior faturamento foi o das tetraciclina via ração, que vem apresentando crescimento ao longo dos anos, o que contraria as expectativas Européias, que apontam sempre para um decréscimo dos volumes vendidos destes produtos devido às barreiras sanitárias impostas à exportação.

Pensando no contexto da necessidade de mantermos a produtividade e a eficiência do rebanho, as infecções por *Escherichia coli* causam graves prejuízos à indústria suinícola devido à redução do desempenho de crescimento e mortalidade, com consequente queda de produtividade.

A presença de genes codificadores dos fatores de virulência está diretamente envolvida com os mecanismos de patogenicidade das cepas de *E. coli*. Alguns destes fatores de virulência como a toxina Stx2e estão relacionados a surtos com grande impacto nas taxas de mortalidade na fase de creche. Em alguns locais do país o uso constante de antimicrobianos tem feito com que os quadros de diarreia geralmente restritos a animais de creche, ocorram mais tardiamente, nas fases de crescimento e terminação, levando a prejuízos ainda maiores devido à mortalidade. Nestes surtos, observa-se ainda a alta frequência de isolados multirresistentes.

Apesar de sua grande ocorrência no Brasil, a epidemiologia da infecção por *E. coli* no pós-desmame e estudos envolvendo a caracterização molecular e as características de resistência a antimicrobianos destas cepas tem sido pouco estudadas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A diarreia pós-demame afeta principalmente os leitões entre 21 e 45 dias e é causada por cepas de *Escherichia (E.) coli* adaptadas ao hospedeiro e que produzem a toxinas e fímbrias (PATON; PATON, 1998). Evidências sugerem que estas cepas possam ser transmitidas aos leitões tanto pela fêmea suína quanto pelo ambiente. Uma vez que o microrganismo está no ambiente em que os animais são criados torna-se muito difícil sua eliminação e o mesmo pode ser transmitido entre as diferentes fases da produção e de um rebanho para outro (GARABAL et al., 1996; AARESTRUP et al., 1997, AARESTRUP; DURAN; BURCH, 2008).

2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, da qual compreende cinco espécies, designadas: *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia vulneris*, sendo que a espécie de maior importância é *Escherichia coli* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Este microrganismo (*E. coli*) foi primeiramente descrito pelo pediatra e bacteriologista alemão Theodor Escherich (1857-1911) em neonatos. São bactérias gram-negativas não esporuladas, anaeróbias facultativas, apresentam-se como

bastonentes móveis com flagelos peritríquios ou imóveis, e produtores de catalase (FAIRBROTHER, 1992; GYLES, 1994).

A espécie *E. coli*, além de ser um habitante comensal do trato gastrointestinal de humanos e animais, está associada a infecções intestinais e extraintestinais. É um dos principais agentes infecciosos nos quadros de diarreias em leitões e vem gerando perdas importantes ao setor no período de lactação e após o desmame devido à morbidade, mortalidade, queda no ganho de peso e custos com tratamentos, vacinações e suplementação via ração (LEVINE, 1987; IMBERECHTS; GREVE; LINTERMANS, 1992; BRITO; TAGLIARI, 2000; CALDERARO et al., 2001; SMITH; FRATAMICIO; GUNTHER, 2007; FAIRBROTHER, GYLES, 2012).

Existem diferentes maneiras de se sub-dividir a espécie *E. coli* em tipos. Até o presente a divisão por sorotipos foi a que mostrou maior associação com a virulência das cepas (FAIRBROTHER, GYLES, 2012).

Na etiologia das infecções por *E. coli*, denominadas colibaciloses, estão envolvidos inúmeros sorogrupos. Os principais antígenos foram caracterizados através de métodos sorológicos em: antígeno somático (O), lipopolissacarídeo presente na cápsula bacteriana; antígeno capsular (K), polissacarídeo presente na cápsula bacteriana, antígeno flagelar (H), uma proteína constituinte do flagelo (MACKINNON, 1997) e antígeno fimbrial (F) (FAIRBROTHER; GYLES, 2012). Porém nem todas as cepas de *E. coli* apresentam todos os tipos de antígenos simultaneamente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Cepas patogênicas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia pós-desmame pertencem tipicamente aos sorogrupos O8, O141 e O149 e são hemolíticas (NIEWERTH et al., 2001); estas colonizam o intestino delgado através de fatores

específicos de adesão (fímbrias) e produzem uma ou diversas exotoxinas responsáveis pela doença (VAN DEN BROECK et al., 2000; FRYDENDAHL, 2002).

As adesinas fimbriais mediam a fixação da bactéria à superfície das células epiteliais do hospedeiro e iniciam a colonização bacteriana (ZHANG et al., 2007). Em suínos as fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987p), F41 estão relacionadas com distúrbios entéricos na fase de lactação e as fímbrias F4 (K88) e F18 (F107) com os quadros de enterite ou doença do edema na fase pós-desmame. Determinadas cepas de *E. coli* produzem toxinas protéicas que podem exercer um papel importante na patogenia das doenças, tais como: hemolisina, colicina, enterotoxina termolábil (LT), enterotoxina termoestável (ST), verotoxina ou Shiga-toxina (VT ou Stx) e o fator necrosante citotóxico (CNF) (BRITO et al., 2001).

Ao menos cinco categorias de cepas de *E. coli* envolvidas na doença intestinal são reconhecidas com base nas diferenças entre os aspectos clínicos e epidemiológicos e nos determinantes específicos de virulência: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC). A *E. coli* com aderência difusa (DAEC) tem sido reconhecida como a sexta classe de *E. coli* diarréica (HA; CHOI; CHAE; 2003). Dentre estas categorias a ETEC é uma das causas mais importantes de doenças na indústria suinícola, incluindo cepas produtoras de uma ou várias enterotoxinas que causam diarreia secretória em suínos (ZHANG et al., 2007; FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

Duas importantes enterotoxinas associadas à ETEC foram classificadas como termolábeis (LT) e termoestáveis (ST). As toxinas LT são classificadas em dois sorogrupos denominados LTI e LTII, baseados em testes de neutralização (PARMA et al., 2000). Os genes codificadores de LTI e LTII estão associados ao DNA

plasmidial e cromossomal, respectivamente. A LTI difere da LTII ainda por ser neutralizada pelo soro anti-toxina colérica e pode ser subdividida em LTP produzida por *Escherichia coli* isoladas de suínos e a LTh produzida por *Escherichia coli* isoladas de humanos. As LT2 são também subdivididas em LTIIa e LTIIb, que são antigenicamente distintas (LANG et al., 1994; WRAY; WOODWARD, 1997).

Há dois tipos de toxinas termoestáveis, designadas de STa (também chamada de STI ou ST1) e STb (também chamada de STII ou ST2), que diferem entre si estruturalmente e no mecanismo de ação. STa, STb ou ambas são codificadas por genes plasmidiais e estes variam extensamente no tamanho molecular. Estes também podem codificar LT, fatores fimbriais de colonização, determinantes de resistência a antibióticos e colicinas. Há duas variantes de STa, denominadas STIa (também chamada de STap ou STI suína) e STIb (STah ou STI humana) (PARMA et al., 2000).

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) também é chamada de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STE) ou verotoxigênica (VTEC ou STEC). Esta categoria engloba cepas de *E. coli* produtoras de Shiga-toxinas do tipo 1 (Stx1), do tipo 2 (Stx2) e a Shiga toxina variante 2e relacionada a doença do edema em suínos (Stx2e). Estas toxinas atuam inibindo a síntese protéica e são letais para culturas de células Vero, sendo também conhecidas e descritas na literatura como VT1, VT2 e VT2e (FRANK, 1998; ZMEIFEL et al., 2006). Cepas de *E. coli* produtoras de Stx1 são bem conhecidas como patógenos humanos e causadores de doenças graves como colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica, colite ulcerativa e outras doenças (RILEY et al., 1983).

A Shiga toxina variante 2e (Stx2e) que é descrita principalmente em cepas isoladas a partir de amostras de suínos, causa lesões vasculares no intestino, no tecido subcutâneo e no cérebro, levando a formação de edema e a ocorrência de

sintomas neurológicos (FRYDENDAHL, 2002). Estas cepas geralmente pertencem ao sorogrupo O138, O139, O141 e O147, são frequentemente hemolíticas e produzem a toxina STx2e muitas vezes em conjunto com outras enterotoxinas e podem possuir as variantes fimbriais F18ab ou F18ac (FAIRBROTHER; GYLES, 2012; NIEWERTH et al., 2001).

Alguns estudos tem relatado o isolamento de cepas de *E. coli* Stx2e positivas em humanos com diarreia e síndrome hemolítico-urêmica e associações entre cepas Stx2e do sorogrupo O101 isoladas de suínos e humanos têm sido avaliadas. O risco de transmissão de cepas de *E. coli* Stx2e a partir de suínos doentes ou saudáveis para os seres humanos não está descartada (ZMEIFEL et al., 2006).

Somado à produção de toxinas, outro fator de virulência expresso pelas EHEC é uma proteína chamada intimina a qual é responsável pela fixação da *E. coli* às células epiteliais intestinais, causando as lesões descritas como “attaching and effacing” na mucosa intestinal. Intimina é codificada pelo gene cromossomal *Eae* (UGRINOVICH et al., 2007). Este gene está associado com certos tipos de sorotipos, porém não é sorotipo específico (PARMA et al., 2000).

As cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAggEC) foram reconhecidas por produzirem três toxinas potencialmente capazes de estimular a secreção intestinal. A enterotoxina termoestável denominada EAST-1 foi a primeira a ser reconhecida e também a melhor caracterizada (SEARS; KAPRE, 1996). A EAST-1 tem sido detectada não somente em outras cepas de *E. coli* diarreicas mas também em cepas de ETEC e EPEC de suínos (FRYDENDAHL, 2002). Relatos sugerem que esta enterotoxina pode representar um importante determinante da virulência na patogênese da diarreia dos suínos (NGELEKA et al., 2003).

Outro fator de virulência, a adesina envolvida na aderência difusa (AIDA-I) tem sido recentemente associada com a diarreia suína (ZHANG et al., 2007). Foi demonstrada associação entre a AIDA-I a outros dois fatores de virulência da doença do edema e da diarreia pós-desmame: o fator F18 e a toxina variante Stx2e (NIEWERTH et al., 2001). Entretanto nenhum destes potenciais fatores de virulência (Intimina, EAST-1 e AIDA-I) foram bem caracterizados quanto aos seus significados na diarreia suína e estudos dessas associações com outros fatores de virulência ainda são muito limitados (ZHANG et al., 2007).

2.2 *INFECÇÃO EM SUÍNOS*

A diarreia pós-desmame pode afetar animais no final do aleitamento e por todo período de creche, sendo menos severa do que as diarreias neonatais. Observa-se diarreia fluida de coloração amarelada à cinza, com duração de mais de uma semana, causando desidratação e emaciação, podendo atingir a maioria dos leitões de um recinto. Recidivas podem ser observadas até três semanas após o quadro inicial (FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

Dentre os principais fatores que predispõem a diarreia pós-desmame encontram-se o estresse, a queda da imunidade colostrar, troca de ambiente, tensões e brigas entre os leitões. A imaturidade do trato gastrointestinal e a mudança na alimentação, associados à queda da atividade bacteriana gástrica determinada pela diminuição temporária do pH gástrico, bem como a ação parcial da nova dieta, podem causar hipersensibilidade da mucosa intestinal devido ao contato

com os antígenos presentes na ração, e atuar como fatores predisponentes para o aparecimento da doença (NABUURS; VANZIJDERVERELDZ, 1993; MACKINNON, 1997; WRAY; WOODWARD, 1997; FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

No Brasil, com as dietas utilizadas na fase de creche, a mortalidade devido à síndrome da diarreia pós-desmame é baixa, exceto quando há um surto de em que há presença de cepas produtoras de toxina Stx2e, porém a taxa de morbidade é muito variável em função dos fatores de risco da criação. Mas mesmo quando a diarreia é transitória e sem aumento da taxa de mortalidade, há redução no ganho de peso diário dos leitões e piora da conversão alimentar (MORES, MORENO, 2012).

Apesar da sorotipagem ocupar uma posição central na história deste patógeno, o diagnóstico da infecção por *E. coli* em suínos tem sido focado cada vez mais na identificação dos fatores de virulência específicos (CHENG et al., 2006). As cepas *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) precisam se aderir nas células da mucosa epitelial do intestino delgado e produzir enterotoxinas para causar doença. As ETEC causadoras da diarreia pós-desmame se aderem através das fímbrias F4 e/ou F18 que mediam a adesão das bactérias aos receptores específicos presentes sobre a superfície dos enterócitos do intestino delgado, levando à colonização bacteriana e posterior produção de enterotoxinas (LT, STa, e / ou STb) que afetam a troca de água e o equilíbrio de eletrólitos (DE LA FÉ RODRÍGUEZ et al., 2011, FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

Para que a adesão e a doença ocorram, além da presença das fímbrias é necessária a presença do receptor nos enterócitos dos animais. Existe uma diferença importante entre a adesão das ETEC com fímbrias F4 e com fímbrias F18. Os receptores da fímbria F4 são totalmente expressados nos animais desde o

nascimento até a idade adulta, fazendo com que animais de qualquer idade sejam susceptíveis às infecções por ETEC positivas para fímbria F4. Já os receptores da fímbria F18, importantes não só na patogênese da diarreia pós-desmame como também na doença do edema, não são totalmente expressados nos animais até os 20 dias de idade, causando infecções apenas em animais com idade superior há 20 dias, normalmente 5 a 14 dias após o desmame (NAGY et al., 1992). Alguns animais não possuem o receptor da fímbria F4 (K88), sendo estes animais naturalmente resistentes às infecções por ETEC positiva para fímbria F4 (K88) (FAIRBROTHER; GYLES, 2012).

A diarreia pós-desmame pode também ser causada por cepas enteropatogênicas (EPEC), que se ligam ao epitélio intestinal usando outra proteína de membrana, a intimina, porém os mecanismos de como estas cepas causam diarreia ainda não são muito conhecidos.

A doença do edema, causada pela *E. coli* patotipo VTEC também pode possuir a fímbria F18. Quando as cepas são capazes de produzir a toxina Stx2e, e esta se distribui na corrente sanguínea e atinge as células endoteliais de diferentes tecidos. O achado mais consistente em estudos envolvendo a inoculação experimental com toxina purificada ou infecção experimental é uma angiopatia degenerativa em pequenas artérias e arteríolas. O fluido encontrado nos diferentes tecidos em animais doentes apresenta baixa concentração proteica e pode ser resultado do aumento da permeabilidade vascular (FAIRBROTHER, 1992; FAUBERT; DROLET, 1992; FAIRBROTHER; GYLES, 2012). As alterações macroscópicas são caracterizadas por edema subcutâneo, sendo mais frequente que em alguns tecidos como no mesocólon, submucosa do estômago e bexiga (FAUBERT; DROLET, 1992). Quanto ao diagnóstico da doença do edema, a

detecção da toxina ou de seu gene codificador nas cepas de *E. coli* presentes no intestino é importante para a confirmação do envolvimento deste agente, possibilitando assim a prevenção e controle da infecção (WOODWARD; CARROL; WRAY, 1992).

A doença do edema afeta principalmente animais desmamados, podendo ocorrer casos esporádicos durante período de recria e terminação. Pode afetar todo o rebanho e normalmente o primeiro sinal observado é a morte súbita de alguns animais sem sintomas aparentes de doença. Alguns animais afetados se tornam inapetentes, desenvolvendo inchaço nas pálpebras e têmporas, emitindo um som característico e apresentando sintomas nervosos e sinais de insuficiência respiratória (OANH et al., 2010; OANH et al. 2012; FAIRBROTHER; GYLES, 2012)

Sobre o tratamento destas infecções, não é fácil de obter dados precisos sobre o uso de antimicrobianos e ocorrência de enfermidades nos suínos, mas alguns países como a Dinamarca possuem um programa de monitoramento do uso de antimicrobianos, sendo que de 2000 a 2008 a causa que mais exigiu tratamentos antimicrobianos foram as infecções gastrointestinais em leitões desmamados, e nestes casos o principal agente envolvido foi a *E. coli* (AARESTRUP; DURAN; BURCH, 2008).

Figura 1: À esquerda diarreia pós-desmame em animais na fase de creche, sendo o agente causador posteriormente identificado como *E. coli* ETEC. À direita animal da baia onde foi observada a diarreia apresentando posterior com sinais de diarreia.

Fonte: MORENO, 2015

2.3 CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE

Os métodos convencionais para detecção de toxinas são representados por provas biológicas em modelos animais (camundongo, suíno ou coelho), utilizadas para detecção de enterotoxinas termoestáveis (ST) ou enterotoxinas termolábeis (LT), ação das toxinas em cultivo celular para detecção de enterotoxinas termolábeis (LT) e Shiga toxinas (STx), além de testes sorológicos (WOODWARD et al., 1990; MAINIL et al., 1991). No entanto, os métodos convencionais têm sido menos utilizados nos últimos anos por serem mais trabalhosas, exigirem o uso de animais além de apresentarem maior tempo para sua execução (WOODWARD; CARROL; WRAY, 1992).

Os métodos de detecção baseados na identificação dos genes codificadores das toxinas e das fímbrias envolvidas nos quadros causados pela *E. coli* são os mais utilizados e representam o principal avanço no diagnóstico molecular das infecções por *E. coli* pela sua boa sensibilidade e especificidade (CHENG et al., 2006). As técnicas baseadas em hibridização, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e PCR em tempo real tem sido aplicadas com sucesso na diferenciação de diversos isolados patogênicos (OSEK, 2000; ZMEIFEL et al., 2006).

Nos últimos anos, destaca-se uma preocupação com relação ao aumento de bactérias resistentes aos antimicrobianos (WANG et al., 2011), em especial, *Escherichia coli*, na qual se relata altas taxas de resistência aos antibióticos na suinocultura (YANG et al., 2004). Este fato indica que a falta de restrição sobre o uso de antimicrobianos na produção de suínos, resultou na disseminação de cepas resistentes a múltiplas drogas, o que ocasiona preocupação pela saúde pública (YANG et al., 2004; TANG et al., 2011). Estudos apontam que resistência às drogas usadas para o tratamento de animais com doença do edema é comum nas cepas Stx2e (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005).

A resistência deste agente a antimicrobianos é avaliada através de testes de sensibilidade. Nestes casos pode-se empregar a determinação do halo de inibição pela prova de disco-difusão (Kirby-Bauer) ou a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do teste de microdiluição em caldo ou diluição em agar. Em laboratórios de diagnóstico em medicina veterinária o teste de disco difusão é o mais usado, devido principalmente ao baixo custo e maior simplicidade de execução. A determinação da concentração inibitória mínima, no entanto, oferece resultados mais confiáveis e permite a avaliação das concentrações de

antimicrobianos que inibem o crescimento do agente e estes valores podem ser correlacionadas com as doses terapêuticas (GALES; REIS; JONES, 2001).

O presente estudo propõe em linhas gerais a avaliação da ocorrência de *E. coli* ETEC em suínos desmamados provenientes de diferentes regiões do Brasil e a caracterização genotípica e fenotípica das cepas de *E. coli* isoladas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Com base no que foi exposto na revisão de literatura o presente projeto tem como objetivos específicos:

- Determinar a presença dos fatores de virulência associados à diarreia pós-desmame em cepas de *E. coli* provenientes de suínos através da PCR.
- Selecionar um grupo de cepas positivas para fimbrias F4 e/ou F18 e estabelecer o perfil de resistência das mesmas através da determinação da concentração inibitória mínima.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram avaliados 621 animais de 21 a 40 dias de vida, provenientes de 52 granjas de suínos dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Paraná, São Paulo, Goiás e Minas Gerais entre Janeiro de 2012 e Janeiro de 2013.

Foram coletados suabes retais de pelo menos 10 animais apresentando quadro clínico de diarreia pós-desmame por granja. Os suabes foram refrigerados e mantidos em meio de transporte de Stuart até a chegada ao laboratório de Sanidade Suína e Virologia- VPS-FMVZ-USP.

4.2 ISOLAMENTO E REPIQUE DAS CEPAS

Os suabes fecais foram semeados em Agar MacConkey e em caldo Luria Bertani e incubados a 37° C por 18 horas. Após este período, de cada suíno avaliado, foi coletado 500 µl do caldo Luria Bertani para extração do DNA e pesquisa dos genes codificadores dos fatores de virulência mais comuns nesta fase (fimbrias F4, F18 e toxinas STa, STb, LT e VT_{e2}).

A partir da placa de ágar MacConkey dos animais que apresentaram resultado positivo para fimbria F4 e/ou F18 no PCR realizado no caldo foram selecionadas três colônias que foram submetidas à identificação bioquímica através

do painel para identificação de enterobactérias da Probac do Brasil e submetidas individualmente a PCR para pesquisa dos genes propostos.

Figura 2 – Fluxograma ilustrando as principais etapas do estudo.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ATRAVÉS DA PCR

A extração do DNA bacteriano empregado na PCR foi realizada através do método descrito por Boom et al. (1990).

Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado a um microtubo 40 pmoles de cada primer (ZHANG et al., 2007), 2 unidades da enzima Taq DNA polimerase, 5 µL do tampão da enzima [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 5 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. Para amplificação dos genes pesquisados o termociclador foi programado para 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72° por 5 minutos. A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo para o gene do fator mencionado e um controle negativo.

Quadro 1 – Distribuição dos genes nas diferentes reações e tamanho dos fragmentos amplificados.

Reação 1	Primer	Tamanho (pb)
STb	GCTACAAATGCCTATGCATCTACACA CATGCTCCAGCAGTACCATCTCTAAC	150
LT	ACGGCGTTACTATCCTGTCTATGTGC TTGGTCTCGGTCAGATATGTGATTCT	290
F4	TGAATGACCTGACCAATGGTGGAAACC GCGTTTACTCTTTGAATCTGTCCGAG	500
Reação 2		Tamanho (pb)
F18	TGGCACTGTAGGAGATACCATTCAGC GGTTTGACCTTTCAGTTGAGCAG	380
STa	GTCAGTCAACTGAATCACTTGACTCT CATGGAGCACAGGCAGGATTACAACA	190
VTe2	CGGTATCCTATTCCCAGGAGTTTACG GTCTTCCGGCGTCATCGTATAAACAG	700

Os produtos de PCR (10 μ L) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com 0,7 μ L de BlueGreen® (LGC Biotecnologia). Os fragmentos amplificados foram visualizadas no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder.

4.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Perfil de sensibilidade antimicrobiana

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados foram analisados por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo teste de microdiluição em caldo conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008).

Microdiluição em caldo

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se o painel Sensititre (BOPO6F– Trek Diagnostics Systems, Ohio/ EUA). Os princípios testados foram: ampicilina (AMP), clindamicina (CLI), clortetraciclina (CTET), danofloxacin (DANO), enrofloxacin (ENRO), florfenicol (FFN), gentamicina (GEN), neomicina (NEO), oxitetraciclina (OXY), penicilina (PEN), sulfadimetoxina (SDM), espectinomicina (SPE), trimetoprima / sulfametoxazole (STX), tiamulina (TIA), tilmicossina (TIL), tulatromicina (TULA), tilosina (TYLT), ceftiofur (XNL) and enrofloxacin (ENO).

O inóculo bacteriano utilizado no teste de concentração inibitória mínima foi preparado a partir de uma cepa isolada e cultivada em caldo cérebro-coração (BHI) incubado a 37°C por 18-24 horas. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro (0,150 a 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada contém aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL.

Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1: 1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco-BBL, Detroit, MI/USA) de maneira a obter uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL e então, 50 µl desta suspensão foram distribuídos em cada poço da placa. Após distribuição do inóculo na placa, esta foi selada com adesivo fornecido pelo próprio fabricante e incubada a 37 °C por 24 horas em aerobiose.

O resultado do teste de microdiluição fornece a concentração inibitória mínima, que pode ser traduzida como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo nos poços da microplaca. O crescimento pode ser detectado pela visualização a olho nu de um “botão” no fundo do poço em “u” da placa, denotando o crescimento e a consequente precipitação das células bacterianas ao fundo.

A cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle de qualidade como preconizado pelo manual do CLSI documento VET01-A4 e suplemento VET01-S2. Os pontos de corte empregados na análise dos resultados foram provenientes do suplemento VET01-S2.

Quadro 2 – Critérios utilizados para avaliação dos resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Antimicrobianos	Sensível µg/mL	Intermediário µg/mL	Resistente µg/mL	Sigla
Ampicillina	≤0,25	0,5	≥1	AMP
Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8	TIO
Clindamicina	≤ 0.5	1-2	≥ 4	CLI
Clortetraciclina	≤2	4	≥ 8	CTET
Cotrimoxazol	≤ 2/38	-	>2/38	SXT
Danofloxacina	≤ 0.25	-	-	DAN
Enrofloxacina	≤ 0.5	1	≥ 2	ENO
Florfenicol	≤ 2	4	≥ 8	FFN
Gentamicina	≤ 2	4	≥ 8	GEN
Neomicina	≤ 8	-	-	NEO
Oxytetraciclina	≤2	4	≥ 8	OXY
Espectinomicona	≤ 32	-	≥ 64	SPE
Sulfadimetoxina	≤ 256	-	>256	SDM
Tiamulina	≤ 16	-	≥ 32	TIA
Tilmicosina	≤ 8	16	≥ 32	TIL
Tulatromicina	≤ 16	32	≥ 64	TUL
Tilosina	≤ 1	2-4	> 4	TYLT

O CIM50 e o CIM 90 representam as concentrações capazes de inibir o crescimento visível de 50% e 90% das amostras, respectivamente.

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para avaliação dos perfis obtidos foi utilizado o programa Bionumerics 6.6 (Applied Maths). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA), que foi representado pela forma de dendrograma.

4.6 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (DI)

Os resultados obtidos através do perfil bioquímico e da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), com a seguinte fórmula:

$$DI = \frac{1 - [\sum nj(nj-1)]}{N(N-1)}$$

Onde N é o número de amostra da população teste, s é o número de diferentes tipos e n_j é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocadas em diferentes grupos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

A partir do isolamento de *Escherichia coli* em 621 animais foram identificados 144 animais positivos para fímbria F4 e / ou F18 na cultura de fezes (23,2%). O número de animais positivos apenas para fímbria F4 foi 54 (8,7%), para a fímbria F18 foi 54 (8,7%) e para as duas fímbrias foi 32 (5,1%). A tabela 1 apresenta a frequência de todos os genes pesquisados dentre os 621 animais avaliados no estudo. Dos animais observados, 321 animais foram positivos para pelo menos um fator de virulência.

Dentre as 52 granjas observadas, 88,5% (46/52) das granjas tiveram pelo menos um animal positivo para os fatores de virulência e apenas 6 não tiveram nenhum animal positivo para algum fator de virulência (11,5% - 6/52), sendo que houve granjas positivas em todos os estados estudados como pode ser observado no gráfico 2.

A partir dos animais positivos para as fímbrias F4 e / ou F18 foram avaliadas pela PCR três colônias individualizadas no ágar MacConkey. A partir do teste das colônias individualizadas foram selecionadas 148 cepas positivas para as fímbrias F4 e/ou F18 e representando o máximo de granjas possíveis. Estas colônias foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima pela microdiluição em caldo.

As 148 cepas foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através da microdiluição em placa. Os resultados obtidos, os valores da CIM50, CIM 90 e as porcentagens de resistência são apresentados na tabela 1.

Gráfico 1 – Ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência em STa, STb, LT, VT_e, F4 e F18 em culturas de *E. coli* de 321 suínos desmamados positivos para pelo menos um dos fatores de virulência.

Gráfico 2 – Distribuição das granjas positivas dentre estados avaliados.

Tabela 1 – Ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência em STa, STb, LT, VTe, F4 e F18 em culturas de *E. coli* de 621 suínos desmamados.

Perfis	Nº Animais	%
STa	50	8,1
STb	58	9,3
LT	5	0,8
F18	1	0,2
F4	1	0,2
VTe2	6	1,0
STa/STb	26	4,2
STa/STb/F18	18	2,9
STa/STb/F18/F4	11	1,8
STa/STb/F18/VTe2	1	0,2
STa/STb/F4	13	2,1
STa/STb/LT	13	2,1
STa/STb/LT/F18	12	1,9
STa/STb/LT/F4	14	2,3
STa/STb/LT/F18/F4	9	1,4
STa/STb/LT/F18/VTe2	1	0,2
STa/LT	2	0,3
STa/LT/F4	2	0,3
STa/LT/F18/F4	11	1,8
STa/F18	21	3,4
STa/F18/VTe2	4	0,6
STa/F4	2	0,3
STa/VTe2	4	0,6
STb/F4	7	1,1
STb/LT	13	2,1
STb/LT/F4	14	2,3
LT/F4	1	0,2
LT/F18/F4	1	0,2
Negativo	300	48,3

Figura 3 – Análise das cepas de *E. coli* isoladas de suínos de acordo com os genes de virulência detectados através da PCR, padrões de resistência em cada perfil e dados de origem das cepas.

Tabela 2 – Perfis de virulência identificados a partir da detecção dos genes de virulência.

Perfis	Cepas	Fatores de Virulência
P1	35	F4, STb, LT
P2	4	F4, LT
P3	2	F18, STa, STb, LT
P4	16	F4, F18, STa, STb, LT
P5	14	F4, STa, STb, LT
P6	10	F4, STa, STb
P7	3	F4, STa
P8	2	F4
P9	1	F18, STb, VTE
P10	1	F18, STb, LT
P11	18	F18, STa, STb
P12	41	F18, STa
P13	1	F18, F4, STa

Na figura 3 são apresentados os perfis de virulência, sendo que foram observados 13 diferentes perfis de virulência. O índice discriminatório (ID) da determinação do perfil de resistência foi igual a 0,831.

Dentre as cepas avaliadas o perfil mais comum de virulência foi o F18 / STa, com frequência observada de 27,7% (41/148), seguido pelo perfil F4 / STb / LT (23,6% - 35/148) como pode ser visto na tabela 2.

Todas as 148 cepas testadas foram resistentes a tilosina, clindamicina, tiamulina, tilmicosina e sulfadimetoxina (Tabela 4). A frequência de cepas resistentes foi elevada também para o oxitetraciclina, a clortetraciclina e a danofloxacina (82,4%

- 122/148), ampicilina (77,7% - 115/148) e ao florfenicol (73% - 108/148). Considerando-se o fato de 100% das cepas terem apresentado resistência a mais de três classes de antimicrobianos, incluindo dois macrolídeos (tilmicosina e tilosina), uma pleuromutilina (tiamulina), uma lincosamida (clindamicina) e uma sulfa (sulfadimetoxina), pode-se concluir que todas as cepas de *E.coli* do presente estudo foram multirresistentes.

As menores taxas de resistência foram observadas frente ao ceftiofur (4,0%-6/148), neomicina (30,4% - 45/148) e gentamicina (31% - 46/148). Nenhum antimicrobiano foi capaz de inibir o crescimento de 100% das cepas testadas dentro dos valores de corte preconizados pelo CLSI.

Tabela 3 – Distribuição dos valores de MIC obtidos dentre as 148 cepas avaliadas, valores de MIC50, MIC90 e frequência de cepas resistentes.

Antimicrobianos		Número de cepas*- Total							CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %	
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	>16	>16	77,7	
Ampicilina	0	1	2	15	12	3	1	114				
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	>8		0,5	1	4,0	
Ceftiofur	20	85	32	4	1	0	6					
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	>16	>16	100	
Clindamicina	0	0	0	0	0	0	0	148				
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	>8			>8	>8	82,4	
Clortetraciclina	1	13	11	1	0	122						
CIM (µg/mL)	≤2/38	>2/38							>2/38	>2/38	64,8	
Cotrimoxazol	52	96										
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	>1				>1	>1	82,4	
Danofloxacina	13	13	20	21	81							
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	2	>2				2	>2	52,7
Enrofloxacin	15	14	27	13	23	56						
CIM (µg/mL)	≤8	16	32	64	>64				>64	>64	64,8	
Espectinomycin	5	29	18	7	89							
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	>8		>8	>8	73,0	
Florfenicol	0	0	2	7	31	18	90					
CIM (µg/mL)	≤1	2	4	8	16	>16				≤1	>16	31,0
Gentamicin	89	8	5	5	5	36						
CIM (µg/mL)	≤4	8	16	32	>32				≤4	>32	30,4	
Neomycin	96	7	1	8	36							
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	>8				>8	>8	82,4
Oxitetracycline	0	16	9	1	0	122						
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	>8	>8	>8	100	
Penicillin	0	0	0	0	0	0	1	147				
CIM (µg/mL)	≤256	>256							≤256	>256	100	
Sulfadimethoxine	0	148										
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	16	32	>32	>32	>32	100	
Tiamulin	0	0	0	0	0	0	1	147				
CIM (µg/mL)	≤4	8	16	32	64	>64				>64	>64	100
Tilmicosin	0	0	0	1	8	139						
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	16	32	>32	>32	>32	100	
Tilosin	0	0	0	0	0	0	0	148				
CIM (µg/mL)	≤1	2	4	8	16	32	64	>64	64	>64	48,0	
Tulatromycin	0	0	1	15	23	18	32	39				

*Células de preenchidas de cinza claro com uma barra na lateral esquerda indicam cepas resistentes aos antimicrobianos segundo os pontos de corte utilizados.

Tabela 4 – Frequência de cepas resistentes às diferentes classes de antimicrobianos.

Classe	Antimicrobiano	Nº	(%)
Beta lactâmicos	Ampicilina	115	77,7
	Ceftiofur	6	4,0
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	122	82,4
	Clortetraciclina	122	82,4
Fluorquinolonas	Danofloxacina	122	82,4
	Enrofloxacina	78	52,7
Aminoglicosídeos	Gentamicina	46	31,0
	Neomicina	45	30,4
	Espectinomicina	96	64,8
Fenicois	Florfenicol	108	73,0
Sulfas	Sulfadimetoxina	148	100,0
	Cotrimoxazol	96	64,8
Lincosamidas	Clindamicina	148	100,0
Pleuromutilinas	Tiamulina	148	100,0
Macrolídeos	Tilmicosina	148	100,0
	Tilosina	148	100,0
	Tulatromicina	71	48,0

Gráfico 3 – Porcentagem de cepas resistentes aos diferentes antimicrobianos dentre as 148 cepas de *E. coli* testadas.

O gráfico 3 ilustra a porcentagem de cepas resistentes de acordo com o antimicrobiano testado.

Figura 4 – Análise das cepas de *E. coli* isoladas de suínos de acordo com o perfil de resistência à antimicrobianos.

Tabela 5 – Perfis de resistência identificados a partir de determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos frente às cepas de *E. coli* isoladas de suínos.

(continua)

Perfis	Cepas	Antimicrobianos
P1	1	TIO, AMP
P2	1	TIO, AMP, SPE
P3	1	AMP, GEN, FFN
P4	2	AMP, DANO, ENRO
P5	1	AMP, DANO
P6	1	AMP, DANO, SPE
P7	2	DANO, FFN, ENRO
P8	1	DANO, SXT, SPE, ENRO
P9	1	DANO, SXT, FFN, SPE, ENRO
P10	2	DANO, SXT, SPE
P11	4	AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN, SPE
P12	1	AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN, SPE, ENRO
P13	2	AMP, SXT, TUL, GEN, FFN, SPE
P14	1	AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, SPE, ENRO
P15	1	AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, SPE
P16	1	AMP, DANO, TUL, GEN, FFN, NEO, SPE, ENRO
P17	1	SXT, TUL, FFN, SPE
P18	5	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, FFN, NEO, SPE
P19	1	CTET, OXI AMP, DANO, SXT, FFN, NEO, SPE
P20	1	CTET, OXI, DANO, SXT, TUL, FFN, NEO, SPE
P21	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, NEO, SPE, ENRO
P22	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, NEO, SPE
P23	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, FFN, NEO, SPE, ENRO
P24	1	TIO, CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, FFN, NEO, SPE, ENRO
P25	1	CTET, OXY, AMP, DANO, TUL, FFN, NEO, SPE, ENRO
P26	1	CTET, OXY, DANO, SXT, TUL, FFN, SPE, ENRO
P27	1	TIO, CTET, OXY, DANO, SXT, TUL, FFN, SPE, ENRO
P28	3	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, FFN, SPE
P29	7	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, FFN, SPE, ENRO
P30	2	CTET, OXY, AMP, DANO, FFN, NEO, SPE, ENRO
P31	5	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, FFN, NEO, SPE, ENRO
P32	1	CTET, OXY, DANO, SXT, FFN, NEO, SPE, ENRO
P33	2	CTET, OXY, AMP, DANO, FFN, SPE, ENRO
P34	8	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, FFN, SPE, ENRO
P35	1	CTET, OXY, SXT, FFN, SPE
P36	1	CTET, OXY, AMP, SXT, FFN, SPE,
P37	2	CTET, OXY, DANO, SXT, FFN, SPE
P38	3	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, FFN, SPE
P39	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, GEN, FFN, NEO, ENRO
P40	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, FFN, NEO, ENRO
P41	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, FFN, NEO
P42	3	CTET, OXY, AMP, DANO, TUL, GEN, FFN, ENRO

(conclusão)

Perfis	Cepas	Antimicrobianos
P43	1	CTET, OXY, AMP, DANO, TUL, FFN, ENRO
P44	2	CTET, OXY, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN, ENRO
P45	3	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN, ENRO
P46	2	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN, NEO, ENRO
P47	4	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN, SPE, ENRO
P48	5	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN, NEO, SPE, ENRO
P49	4	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, GEN, FFN, SPE, ENRO
P50	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, GEN, FFN, NEO, SPE, ENRO
P51	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, GEN, SPE, ENRO
P52	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN
P53	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, FFN, SPE
P54	1	CTET, OXY, AMP, SXT, TUL, GEN, FFN, SPE
P55	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, GEN, NEO, ENRO
P56	1	CTET, OXY, AMP, DANO, TUL, GEN, NEO, SPE, ENRO
P57	1	TIO, CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, ENRO
P58	1	TIO, CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, SPE, ENRO
P59	2	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, ENRO
P60	1	CTET, OXY, DANO, SXT, SPE, ENRO
P61	1	AMP, DANO, SXT, FFN, NEO, SPE, ENRO
P62	1	CTET, OXY, SXT, TUL, GEN, FFN, NEO, SPE
P63	1	CTET, OXY, DANO, FFN, ENRO
P64	1	CTET, OXY, DANO, FFN
P65	2	CTET, OXY, DANO, TUL, FFN
P66	1	CTET, OXY, DANO, TUL, FFN, ENRO
P67	2	CTET, OXY, AMP, DANO, TUL, FFN
P68	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SXT, TUL, FFN
P69	1	CTET, OXY, AMP, DANO, TUL, FFN, NEO
P70	1	CTET, OXY, AMP, DANO, FFN
P71	1	CTET, OXY, DANO, TUL, ENRO
P72	1	CTET, OXY, AMP, TUL, FFN
P73	1	CTET, OXY, AMP, FFN
P74	1	CTET, OXY, AMP, SXT, FFN
P75	1	CTET, OXY, AMP, GEN, FFN, SPE
P76	1	CTET, OXY, AMP, TUL, GEN, FFN, NEO
P77	1	CTET, OXY, AMP, TUL, GEN
P78	6	CTET, OXY, AMP, NEO, SPE
P79	1	CTET, OXY, AMP, NEO
P80	1	CTET, OXY, AMP, DANO, SPE
P81	2	CTET, OXY
P82	7	CTET, OXY, DANO

Tabela 6 – Distribuição das 148 cepas de *E. coli* isoladas de suínos em relação à resistência antimicrobiana e à presença dos genes codificadores para as fímbrias F4 e F18.

Classe	Antimicrobiano	F4 (63)		F18 (68)		F4 e F18 (17)	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Beta lactâmicos	Ampicilina	53	84,1	48	70,5	14	82,3
	Ceftiofur	5	7,9	0	0	1	5,8
Tetraciclínas	Oxitetraciclina	49	77,7	61	89,7	12	70,5
	Clortetraciclina	49	77,7	61	89,7	12	70,5
Fluorquinolonas	Danofloxacin	52	82,5	55	80,9	15	88,2
	Enrofloxacin	35	55,5	34	50,0	9	52,9
Aminoglicosídeos	Gentamicina	23	36,5	21	30,9	2	11,7
	Neomicina	21	33,3	17	25,0	7	41,1
	Espectinomicina	47	74,6	37	54,4	12	70,5
Fenicóis	Florfenicol	50	79,3	47	69,1	11	64,7
Sulfas	Sulfadimetoxina	63	100	68	100	17	100
	Cotrimoxazol	48	76,2	34	50	14	82,3
Lincosamidas	Clindamicina	63	100	68	100	17	100
Pleuromutilinas	Tiamulina	63	100	68	100	17	100
Macrolídeos	Tilmicosina	63	100	68	100	17	100
	Tilosina	63	100	68	100	17	100
	Tulatromicina	27	42,8	37	54,4	7	41,1

Gráfico 4 – Distribuição das 148 cepas de *E. coli* isoladas de suínos em relação à resistência antimicrobiana e à presença dos genes codificadores para as fímbrias F4 e F18.

Na tabela 5 e na figura 4 são apresentados os perfis de resistência, sendo que foram observados 82 diferentes perfis de resistência à antimicrobianos. O índice discriminatório (ID) da determinação do perfil de resistência foi igual a 0,985.

Na tabela 6 é apresentada a frequência de resistência aos antimicrobianos em relação à presença dos genes codificadores para as fímbrias F4 e F18.

Das cepas 6 cepas resistentes ao ceftiofur, 5 delas (83,3%) apresentavam os genes codificadores para a fímbria F4 e a outra cepa apresentou genes codificadores para ambas as fímbrias (F4 e F18). A porcentagem de cepas

resistentes aos diferentes antimicrobianos se distribuiu de maneira bastante uniforme, sendo que no caso da gentamicina, 36,5% (23/63) das cepas com fímbria F4 foram resistentes à gentamicina, 30,9% (21/68) das cepas que apresentavam o gene codificador para a fímbria F18 foram resistentes e apenas das 11,7% (2/17) das cepas que apresentavam o gene codificador para ambas as fímbrias (F4 e F18) foram resistentes.

O gráfico 4 ilustra o número de cepas resistentes de acordo com o antimicrobiano testado e com a presença dos genes codificadores das fímbrias.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A diarreia pós-desmame é um importante problema econômico na suinocultura mundial, tendo como uma das principais causas, a infecção por cepas de *E. coli* enterotoxigências. No presente estudo foi possível detectar 51,7% dos 621 animais com diarreia avaliados, infectados por cepas de *E. coli* positivas para toxinas e/ou fimbrias características do patotipo ETEC. Considerando-se as fimbrias F4 e F18 como fatores de virulência essenciais para adesão das cepas de *E. coli* toxigênicas, verificou-se a presença de 144 animais positivos para fímbria F4 e / ou F18 na cultura de fezes (23,2%). O número de animais positivos apenas para fímbria F4 foi 54 (8,7%), para a fímbria F18 foi 54 (8,7%) e para as duas fimbrias foi 32 (5,1%). A participação destas fimbrias na patogenia da diarreia pós-desmame é amplamente estudada e descrita na literatura mundial e por este motivo sua presença foi utilizada como critério para seleção das cepas de maior potencial de virulência submetidas a determinação do perfil de resistência a antimicrobianos.

Atualmente a resistência a antimicrobianos tem sido descrita como um desafio global pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A ideia de que o uso de antimicrobianos em medicina humana seja um dos principais causadores do aumento e da disseminação dos genes de resistência é amplamente aceita na comunidade científica, no entanto, há vários indicadores de que o uso de antimicrobianos em saúde animal também tem uma grande contribuição para este quadro (BARTON, 2014).

O uso de destes medicamentos em suinocultura industrial é muito intenso e representa uma grande parcela das vendas de antimicrobianos em todo o mercado

farmacêutico veterinário. Este uso ocorre em geral de três formas, como promotores de crescimento, como profiláticos (ou metafiláticos) e com fins terapêuticos. (BARTON, 2014). Visando o controle e a prevenção da diarreia pós-desmame o uso de antimicrobianos pode ocorrer das três formas citadas. A via de administração mais frequente é a via oral, incluindo a droga através da ração ou da água geralmente em tratamentos que abrangem todo o lote de animais. Estudos indicam que a administração de antimicrobianos via oral aumenta o risco de seleção de resistência em cepas de *E. coli*, tanto patogênicas como da microbiota, aumentando o risco de transmissão de cepas resistentes e dos genes codificadores dos mecanismos de resistência ao homem tornando este tema além de um problema econômico, um problema de saúde pública (BARTON, 2014; BUROW et al. 2014).

Segundo estudo realizado por Boerlin et al. (2005) a epidemiologia e a distribuição dos genes de resistência à antimicrobianos varia significativamente entre as cepas de *E. coli* causadoras de diarreia pós-desmame em leitões em relação às cepas comensais, sendo que as cepas virulentas apresentam maiores frequências de resistência, levantando a possibilidade de que o uso repetitivo de agentes terapêuticos levem à uma diferente pressão seletiva, que poderia estar ligada ao aumento da resistência à antimicrobianos. A associação positiva entre a presença dos genes de virulência e a resistência a alguns antimicrobianos está em alguns casos relacionada à presença destes elementos genéticos nos mesmos plasmídeos.

Choi et al. (2001) avaliando cepas de *E. coli* isolada de leitões com diarreia pós-desmame na Coreia descreveu uma alta taxa de resistência à ampicilina, (96,4% - 81/84), tiamulina (96,4% - 81/84), tilosina (92,8% - 78/84), cotrimoxazol (89,3% - 75/84), tetraciclina (84,5%- 71/84) e espectinomicina (77,4% - 65/84) o que está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, porém no

estudo Coreano a resistência a danofloxacin (46.4%- 39/84) foi bem inferior a observada no Brasil (82,4% - 122/148).

Apesar de a resistência aos beta-lactâmicos e a disseminação de plasmídeos carreando as beta-lactamases de amplo espectro ser um tema de grande preocupação em todo o mundo, poucas cepas do presente estudo apresentaram resistência ao ceftiofur (4%- 6/148). Este dado está de acordo com outros autores que avaliaram cepas de ETEC de origem suína como Choi et al. (2001) que detectaram 3,5% (3/84) de resistência ao ceftiofur. Esta baixa frequência deve estar relacionada ao uso ainda limitado deste princípio ativo em grandes sistemas de produção, devido à administração injetável e ao custo mais elevado em relação a drogas mais antigas.

No Brasil, há poucos trabalhos sobre resistência em cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia usando a metodologia de microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima. Em estudo realizado com 600 cepas de *E. coli* isoladas de leitões lactentes com diarreia no Estado de São Paulo, Baccaro et al. (2002), observaram elevada frequência de resistência especialmente ao cloranfenicol (96,8%), oxitetraciclina (97%), norfloxacin (92%), gentamicina (86%), cotrimoxazol (87%) e ampicilina (87%), e baixa resistência à enrofloxacin (19%). Comparando estes dados com o do presente estudo, chama a atenção queda na resistência a gentamicina (de 86% em 2002 para 31% em 2013) o aumento na resistência a enrofloxacin (de 19% em 2002 para 52,7% em 2013). Esta mudança de perfil nos últimos 11 anos pode estar relacionada à redução no uso da gentamicina pela alta taxa de resistência que se observava na época (década de 1990) e por ser uma droga antiga em medicina veterinária, e pelo

aumento no uso das fluorquinolonas, que eram relativamente novas em 2002 e que tiveram uma redução no custo e ampliação no uso desde então.

Luppi et al. (2015) analisando 442 cepas de *E. coli* positiva para os genes codificadores de fímbria F4 isoladas de suínos na Itália de 2002 há 2011 mostrou que houve um crescimento na resistência às fluorquinolonas também neste país, passando de 14,5% de resistência para enrofloxacin em 2002 para 89,3% em 2011. A resistência à gentamicina, no entanto, não decresceu, representando 63,6% em 2002 e 85,7% em 2011. Neste estudo a resistência a danofloxacin em 2011 foi de 80%, florfenicol 64,3%, cotrimoxazol 89,3% e contra tetraciclina alcançou 100%, dados semelhantes ao observado no Brasil. Chama a atenção ainda no estudo conduzido por Luppi et al. (2015), o crescimento da multirresistência a pelo menos 9 dos antimicrobianos testados, que passou de 0% em 2002 a 38% das cepas em 2011.

Burow et al. (2014) descreve que o tratamento oral em massa de suínos saudáveis e enfermos eleva o risco do aparecimento de cepas de *E. coli* multirresistentes, porém pontua que se fazem necessários mais estudos para que se mostre a relação entre a dosagem e efeitos longitudinais do tratamento. No presente estudo todas as 148 cepas testadas apresentaram resistência a macrolídeos (tilmicosina e tilosina), pleuromutilina (tiamulina), lincosamida (clindamicina) e sulfa (sulfadimetoxina), caracterizando 100% de multirresistência segundo os padrões propostos por Magiorakos et al. (2012).

O uso muitas vezes indiscriminado de antimicrobianos certamente facilita a seleção de cepas bacterianas resistentes, multirresistentes e pan-resistentes (AARESTRUP; DURAN; BURCH, 2008). Este fato influenciará não apenas a

maneira como tratamos e trataremos os animais, mas também terá um importante efeito na saúde humana das próximas gerações (BARTON, 2014).

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- As cepas de *E. coli* enterotoxigênicas estão disseminadas nos animais desmamados das criações de suínos no Brasil.
- Todas as cepas de *E. coli* enterotoxigênicas estudadas foram resistentes a tilmicosina, tilosina, tiamulina, clindamicina e sulfadimetoxina.
- O antimicrobiano com menor taxa de resistência no presente estudo foi o ceftiofur, apesar de não ser a droga mais indicada para tratamento da diarreia pós-desmame.
- Todas as cepas avaliadas foram caracterizadas como multirresistentes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; DURAN, C. O.; BURCH, D. G. S, Antimicrobial resistance in swine production. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 9, n. 2, p. 135–48, 2008.

AARESTRUP, F. M.; JORSAL, S. E.; AHRENS, P.; JENSEN, N. E.; MEYLING, A. Molecular characterization of Escherichia coli strains isolated from pigs with edema disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 20-24, 1997.

BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de Escherichia coli isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.

BARTON, M. D. Impact of antibiotic use in the swine industry. **Current Opinion In Microbiology**, v. 19, p. 9–15, jun 2014.

BOERLIN, P.; TRAVIS, R.; GYLES, C. L.; et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of Escherichia coli isolates from swine in Ontario. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6753, 2005.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; Wertheim-van Dillen, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de Escherichia coli isoladas de leitões com diarreia após o desmame. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 43, p. 133-137, 2000.

BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C.; PIFFER, I. A.; LEITE, S. S.; SILVA, A. B. Virulência de *Escherichia coli* O139: K82. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 119-122, 2001.

BUROW, E.; SIMONEIT, C.; TENHAGEN, B.; KÄSBOHRER, A. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*--a systematic review. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 4, p. 364–75, 1 mar 2014.

CALDERARO, F. F.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, A. J.; PENA, H. J. F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico.**, v. 68, p. 29-34, 2001.

CHENG, D.; SUN, H.; XU, J.; GAO, S. PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 320–328, 2006.

CHOI, C.; HAM, H. J.; KWON, D.; KIM, J.; CHEON, D. S.; MIN, K.; CHO, W. S.; CHUNG, H. K.; JUNG, T.; JUNG, K.; CHAE, C. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 1, p. 71-73, 2002.

DE LA FÉ RODRÍGUEZ; P. Y.; CODDENS, A.; DEL FAVA, E.; ABRAHANTES J. C.; SHKEDY, Z.; MARTIN, L. O. M.; MUÑOZ, E. C.; DUCHATEAU, L.; COX, E.; GODDEERIS, B. M. High prevalence of F4+ and F18+ *Escherichia coli* in Cuban piggeries as determined by serological survey. **Tropical Animal Health Production**, v. 43, n. 5, p. 937-46. 2011.

FAIRBROTHER, J. M. Enteric cobacillosis. In: LEMAN, A. D.; STRAW, B.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.) **Diseases of Swine**. 7. ed. Ames: The Yowa State University, 1992. p. 489-97.

FAIRBROTHER, J. M.; GYLES C. L.; Cobacillosis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, G. W. S. (Eds.) **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. 723-49.

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E.; GYLES, C. L. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, p. 17-39, 2005.

FAUBERT, C.; DROLET, R. Hemorrhagic gastroenteritis caused by Escherichia coli in piglets: clinical, pathological and microbiological findings. **Canadian Veterinary Journal**, v. 33, p. 251–256, 1992.

FRANK, J. How the ribosome works. **American Science**, v. 86, p. 428-439, 1998.

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

GALES, A. C; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 183–190, 2001.

GARABAL, J. I.; GONZALEZ, E. A.; VASQUEZ, F.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E. Serogroups of Escherichia coli isolated from piglets in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 48, p. 113-123, 1996.

GYLES, C. L. Escherichia coli in domestic animals and human. **Wallingford: CAB International**, 1994. 672 p.

HA, S. K.; CHOI, C.; CHAE, C. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among Escherichia coli isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 378–381, 2003.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, p.2465-2466, 1988.

IMBERECHTS, H.; GREVE, H. D.; LINTERMANS, P. The pathogenesis of edema disease in pigs: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 31, p. 221-233, 1992.

LANG, A. L.; TSAI, Y.; MAYER, C. L.; PATTON, K. C.; PALMER, C. J. Multiplex PCR for detection of the heat – labile toxin gene and Shiga – like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60 n. 9, p. 3145–3149, 1994.

LEVINE, M. M.; XU, J.; KAPER, J. B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, I.K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Journal Infection Disease**, v.156, p.175-182, 1987.

LUPPI, A; BONILAURO, P.; DOTTORI, M.; et al. Antimicrobial resistance of f4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy. **Transboundary And Emerging Diseases**, v. 62, n. 1, p. 67–71, fev 2015.

MACKINNON, J.D. Enteritis in the young pig caused by *Escherichia coli*. **The Pig Journal**, v. 41, p. 227–255, 1997.

MAINIL, M. G.; MOSELEY, S. L.; SCHNEIDER, R. A.; SUTCH, K.; CASEY, A.; MOON, H. W. Hybridization of bovine isolates with gene probes for four enterotoxins (StxP, StxH, STx, LT) and one adhesion factor(K99). **Veterinary Research**, v. 47, n. 5, p. 1145–1148, 1991.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G., HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMEIER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar 2012.

MÓRES N.; MORENO, A. M.; Síndrome da diarreia pós-desmame (colibacilose do desmame). In: SOBESTIANSK, J.; BARCELLOS, D. (Eds.) **Doença dos Suínos. 2ª Edição**. Goiânia: Canône Editorial, 2012. p. 265-69.

NABUURS, M. J. A.; VANZIJDERVERELD, F. G. Clinical and microbiological field studies in the Netherlands of diarrhoea in pigs at weaning. **Research in Veterinary Science**, v. 55, p. 70–77, 1993.

NAGY, B.; CASEY, T. A.; WHIPP S. C., MOON H. W. Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p.1285-1294.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Suceptibility tests for bactéria isolated from animals; **Aproved Standard- Second Edition**. NCCLS document M31-A3. 2008. USA.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPLEYARD, G.; MIDDLETON, D. M.; FAIRBROTHER, J. M. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 242-252, 2003.

NIEWERTH, U.; FREY. A.; VOSS, T.; BOUGUE'NEC, C. L.; BALJER, G.; FRANKE, S.; SCHMIDT, M. A. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 143-149, 2001.

OANH, T. K. N.; NGUYEN, V. H.; GREVE, H. D.; GODDEERIS, B. M. Protection of Piglets against Edema Disease by Maternal Immunization with Stx2e Toxoid. **American Society for Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 469–473, 2012.

OANH, T. K. N.; NGUYEN, V. K.; DO, T. N.; GODDEERIS, B. M.; GREVE, H. D. *Escherichia coli* strains causing edema disease in northern Vietnam share an

identical verotoxin 2e. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 8, p. 1797-1804, 2010.

OSEK, J. Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p.211-222, 2000.

PARMA, A. E.; SANZ, M. E.; VIÑAS, M. R.; CICUTA, M. E.; BLANCO, J. E.; BOEHRINGER, S. I.; VENA, M. M.; ROIBON, W. R.; BENITEZ, M. C.; BLANCO, J.; BLANCO, M. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 269-276, 2000.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology**, v. 11, p. 450–479, 1998.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.;BLAKE, P. A. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal Medicine**, v. 12, p. 681-685, 1983.

SEARS, C. L.; KAPRE, J. B. Enteric bacterial toxin: mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews**, v. 60, n. 1, p. 186-199, 1996.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 4, p. 134-163, 2007.

TANG, X.; TAN, C.; ZHANG, X.; ZHAO, Z.; XIA, X.; WU, B.; GUO, A.; ZHOU, R.; CHEN, H. Antimicrobial resistances of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from swine in China. **Microbial Pathogenesis**, v. 50, p. 207-212, 2011.

TRABULSI, R. L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005, 780 p.

UGRINOVICH, L. A.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-

producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 297–306, 2007.

VAN DEN BROECK, W.; COX, E.; OUDEGA, B.; GODDEERIS, B. M. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 223-244, 2000.

WANG, X. M.; LIAO, X. P.; LIU, S. G.; ZHANG, W. J.; JIANG, H. X.; ZHANG, M. J.; ZHU, H. Q.; SUN, Y.; SUN, J.; LI, A. L.; LIU, Y. H. Serotypes, virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 687-692, 2011.

WOODWARD, M. J.; CARROLL, P. J.; WRAY, C. Detection of entero – and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 31, p. 251–261, 1992.

WOODWARD, M. J.; KEARSLEY, R.; WRAY, C.; ROEDER, P. L. DNA probes for the detection of toxin genes in *Escherichia coli* Isolated from diarrhoeal disease in cattle and pigs. **Veterinary Microbiology**, v.22, p.277 – 290, 1990.

WRAY, C.; WOODWARD, M. J. *Escherichia coli* infections on farm animals. In: SUSSMAN, M. (Ed.) **Escherichia coli: Mechanisms of Virulence**. Cambridge: Cambridge University, p. 49-84. 1997.

YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, D. G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial resistance *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal of clinical Microbiology**, v. 42, p. 3483-3489, 2004.

ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 145–152, 2007.

ZMEIFEL, C.; SCHUMACHER, S.; BEUTIN, L.; BLANCO, J.; STEPHAN, R. Virulence profiles of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 328-332, 2006.