CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS GENÉTICOS EM AMOSTRAS
DE ESCHERICHIA COLI DE ORIGEM SUÍNA

MARIA DE FÁTIMA MARTINS
Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1987

CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS GENÉTICOS EM AMOSTRAS
DE *Escherichia coli* DE ORIGEM SUÍNA

MARIA DE FÁTIMA MARTINS

Aprovada em: 09/02/88

Comissão julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de AZevedo	ESALQ/USP
Profa. Dra. Aline Kleiner Pizzirani	ESALQ/USP
Prof. Dr. Tomomasa Yano	UNICAMP

Prof. Dr. João Lúcio de AZevedo
Orientador

*À minha mãe, ICE, que acompanhou
passo a passo, o desenrrolar des
te trabalho, compartilhando as
dificuldades e vitórias, sempre
com um gesto de amor e solidariede
dade.*

DEDICO

*Ao Pedro, companheiro do dia
a dia, pelo exemplo de com-
preensão e incentivo.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial:

Aos Professores Dr. João Lúcio de Azevedo, Dr. Tomomasa Yano e Dr. Vanderley Dias da Silveira, pela orientação, colaboração e amizade.

Aos Médicos Veterinários Dr. Bruno Cardoso Sorrensen, Dr. Fernando Farinha, Dr. Manoel Portugal e Dr. Márcio Hipólito pela colaboração nas análises microbiológicas preliminares e pelo consentimento de uso do laboratório do Setor de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantã e Instituto Biológico de São Paulo.

Ao Professor Anibal Santana Moretti pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em especial ao Departamento de Produção Animal, na pessoa de seu Chefe, Dr. Esleibe Ghion, por ter permitido meu afastamento para a realização do curso e trabalhos laboratoriais, e também pela confiança e amizade.

A Professora Marilda Carlos Vidatto pela colaboração e constante estímulo.

Aos Professores Dr. Tomomasa Yano, Dra. Elza Luna e Donizete Ferencile, pela revisão cuidadosa do manuscrito.

- As estagiárias do Setor de Microbiologia do Instituto Biológico e ao Sr. Carlos Rigetti do Instituto Butantã de São Paulo, pela colaboração na caracterização bioquímica da *E. coli*.
- A estagiária Marcina Garcia pela valiosa ajuda no laboratório e pela sua amizade constante.
- Ao estagiário Gilson Manfio pela colaboração nos experimentos de caracterização de peso molecular dos plasmídios.
- Aos Professores Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, Dra. Lucila Costalatti Rici, Professora Silvia M. Gatti, Dra. Marlene Braide Serafim, Professora Celli P, de Almeida e Professor Domingos S. Leite pela cordialidade com que me receberam, estímulo e amizade.
- Aos amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Sr. Manoel, Estela, Izildinha, Fabiana, Valéria, Maeve; Francisco, Marcelo, Gonçala, Natalícia, Mirtes e Maria Helena pelo carinho e incentivo que demonstraram no decorrer deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1. A <i>Escherichia coli</i> e o seu papel na flora intestinal de suínos neonatos	06
2.2. A produção de enterotoxinas por amostras de <i>E. coli</i>	07
2.3. Colonização do epitélio de amostras de <i>E. coli</i>	12
2.4. Produção de colicinas por amostras de <i>E. coli</i>	14
2.5. Resistência genética a antibióticos por amostras de <i>E. coli</i>	16
2.6. Plasmídios	19
2.6.1. Plasmídios que codificam para fatores de colonização e enterotoxinas em amostras de <i>E. coli</i>	20
2.6.2. Plasmídios colicinogênicos	24
2.6.3. Plasmídios de resistência R em amostras de <i>E. coli</i>	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Amostras bacterianas	29
3.1.1. Identificação e caracterização bioquímica das enterobactérias	30
3.1.2. <i>Escherichia coli</i> portadora de plasmídios com pesos moleculares conhecidos.	30
3.2. Meios de cultura, reagentes e soluções	31
3.2.1. Agar MacConckey	31

	Página
3.2.2. Meio EPM	31
3.2.3. Meio Milli	33
3.2.4. Ágar citrato de Simmons.....	34
3.2.5. Caldo nutriente estoque	34
3.2.6. Preparo das enterotoxinas (ST e LT)....	34
3.2.6.1. Meio de CAYE.....	34
3.2.7. Solução azul de Evans a 2%	36
3.2.8. Padronização das hemácias.....	36
3.2.8.1. Solução de ALSEVER	36
3.2.9. Solução de trietanolamina com gelatina e íons Ca^{+2} e Mg^{+2}	36
3.2.9.1. Solução estoque	36
3.2.9.2. Solução para uso	37
3.2.10. Ágar nutriente glicosado.....	37
3.2.11. Meio de Minca	37
3.2.12. Tampão fosfato com salina para microhe- maglutinização.....	38
3.2.13. Tampão salina-fosfato (PBS) 0,1M ph 7,2	38
3.2.14. Meios BHI e BHI ágar	39
3.2.15. Meios TSB e TSA	39
3.2.16. Tampão Tris - EDTA-Borato (TEB) ph 8,2.	39
3.2.17. Tampão salina-fosfato - 0,1M ph 7,2....	40
3.2.18. Agarose	40
3.2.19. Solução para extração de lisoзима.....	41
3.2.20. Soluções para extração de plasmídios...	41
3.2.21. Brometo de etídio.....	42
3.3. Métodos	42
3.3.1. Isolamento de <i>E. coli</i>	42
3.3.2. Pesquisas de enterotoxina termoestável (STa) e termolábil (LT)	43
3.3.2.1. Preparo das enterotoxinas STa e LT	43
3.3.2.2. Teste para a detecção de entero- toxina STa.....	44

	Página
3.3.3. Teste para a detecção de enterotoxina (LT)	44
3.3.4. Pesquisa de antígenos de aderência (K ₈₈ , K ₉₉ e F ₄₁)	46
3.3.4.1. Prova de microhemaglutinação	46
3.3.4.2. Padronização das hemácias...	46
3.3.4.3. Teste de microhemaglutinação manose resistente	47
3.3.5. Determinação da capacidade de produção de bacteriocina	48
3.3.5.1. Caracterização do tipo de bacteriocina produzida.....	49
3.3.6. Manutenção das linhagens bacterianas.	49
3.3.7. Determinação do nível de resistência a antibióticos	50
3.3.8. Eletroforese em gel de agarose.....	53
3.3.8.1. Preparo da placa de gel de agarose.....	53
3.3.8.2. Aplicação das amostras e condições de corrida.....	54
3.3.8.3. Análise eletroforética em gel de agarose para detectar a ocorrência de plasmídios..	55
3.3.9. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios bacterianos.....	56
4. RESULTADOS	57
4.1. Caracterização bioquímica	57
4.2. Pesquisa da enterotoxina STa.....	57
4.3. Pesquisa da enterotoxina termolábil LT	61
4.3.1. Distribuição da produção das enterotoxinas LT e STa nas amostras de fezes de suínos.....	62

4.4. Fatores hemaglutinantes	63
4.5. Determinação da capacidade de produção de bacteriocina e caracterização da mesma.....	63
4.6. Determinação do nível de resistência a antibióticos das amostras de <i>E. coli</i> isoladas de fezes suínas.....	66
4.6.1. Características apresentadas pelas diferentes amostras de <i>E. coli</i> isoladas de suínos	74
4.7. Ocorrência de plasmídios em amostras de <i>E. coli</i> extraídas de fezes suínas.....	74
4.8. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios das amostras de <i>E. coli</i> suína.....	74
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
APÊNDICE	140

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº	Página
01 Determinação da capacidade de produção de bacteriocina de amostras de <i>E. coli</i> de origem suína	65
02 Curva bimodal para o antibiótico tetraciclina.....	69
03 Curva bimodal para o antibiótico estreptomicina	70
04 Curva bimodal para o antibiótico ampicilina	71
05 Curva bimodal para o antibiótico canamicina.....	72
06 Determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de amostras de <i>E. coli</i> de origem suína.....	73
07 Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>E. coli</i>	80
08 Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>E. coli</i>	81
09 Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>E. coli</i>	82

FIGURA Nº

Página

10	Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>Escherichia coli</i>	83
11	Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>Escherichia coli</i>	84
12	Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>Escherichia coli</i>	85
13	Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>Escherichia coli</i>	86
14	Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>Escherichia coli</i>	87
15	Eletroforese em gel de agarose das amostras de <i>Escherichia coli</i>	88
16	Curva obtida através da regressão dos dados de mobilidade eletroforética relativa dos plasmídeos padrões *p307, **RP ₄ , ***pSA, ****pBR322.....	104

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Amostras de <i>Escherichia coli</i> usadas como referência para determinação de peso molecular de plasmídeos.....	31
02	Amostras de <i>E. coli</i> indicadoras de colicina.....	50
03	Drogas ensaiadas (com as respectivas abreviações) na determinação do nível de resistência das amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes suínas na região de Pirassununga.....	51
04	Quantidade e diluições apropriadas das drogas a partir de 10.000 µg/ml resultando nas concentrações finais desejadas....	52
05.	Distribuição de <i>E. coli</i> nas amostras diarréicas e não diarréicas mostrando: fermentação de açúcar e aminoácidos, bem como descarboxilação das mesmas	58
06.	Resultados das provas bioquímicas, incluindo fermentação de carboidratos e descarboxilação de alguns aminoácidos de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes de suínos	59

TABELA Nº

Página

07.	Resultados dos testes em camundongos recém-nascidos realizados em sobrenadantes de amostras de <i>E. coli</i> isoladas de fezes suínas normais e diarrêicas.....	60
08.	Distribuição de enterotoxinas LT procedentes de amostras de fezes diarrêicas e não diarrêicas em leitões neonatos.....	61
09.	Distribuição de LT e ST nas diferentes amostras de fezes suínas.....	62
10.	Capacidade das diferentes amostras de <i>E. coli</i> provenientes de fezes suínas produzirem colicina	64
11.	Distribuição dos vários tipos de bacteriocinas produzido pelas diferentes amostras de <i>E. coli</i> procedentes de fezes suínas.....	64
12.	Nível de resistência às concentrações de tetraciclina de 100 amostras de <i>E. coli</i> isoladas de fezes suínas.....	66
13.	Nível de resistência às concentrações de estreptomicina de 100 amostras de <i>E. coli</i> isoladas de fezes suínas.....	67
14.	Nível de resistência às concentrações de ampicilina de 100 amostras de <i>E. coli</i> isoladas de fezes suínas.....	67

TABELA Nº

Página

15.	Nível de resistências às concentrações de canamicina para 100 amostras de <i>E. coli</i> isoladas de fezes suínas.....	68
16.	Características de nível de resistência apresentadas pelas diferentes amostras de <i>E. coli</i> estudadas.....	75
17.	Designações e estimativas dos pesos moleculares dos plasmídios visualizados nas amostras de <i>E. coli</i> suína.....	89

CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS GENÉTICO EM AMOSTRAS DE
Escherichia coli DE ORIGEM SUÍNA

Autora: MARIA DE FÁTIMA MARTINS

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar 143 amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes suínas (2 semanas de idade), quanto às suas características culturais, crescimento em meio específico, propriedades bioquímicas, produção de enterotoxinas termoestável STa e termolábil LT, fatores de colonização, produção e tipos de colicinas, resistência a antibióticos. As análises eletroforéticas em gel de agarose evidenciaram a presença de plasmídios, sendo que a maioria das amostras possuía mais de um plasmídio por amostra estudada.

Estes plasmídios poderiam estar correlacionados com a produção de enterotoxinas e de bacteriocinas, bem como as resistências múltiplas a antibióticos, apresentadas pelas amostras.

Os resultados deste estudo abrem novas possibilidades para estudos genéticos envolvendo fatores de patogenicidade, seus mecanismos de ação e correlação com a resistên-

cia múltipla a antibióticos em *E. coli* isolada de fezes suínas. Estes dados podem ser de grande utilidade para o diagnóstico da colibacilose e no futuro para a confecção de vacinas, uma vez que a colibacilose acarreta prejuízos para a suinocultura, nesta faixa etária, sendo de difícil controle por métodos convencionais (antibióticoterapia e soroterapia).

CHARACTERIZATION AND GENETICAL ASPECTS OF STRAINS OF
Escherichia coli

Author: MARIA DE FÁTIMA MARTINS

Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

In the present work 143 strains of *Escherichia coli* isolated from faeces of young swine (2 weeks) were studied for their biochemical properties, growth in specific medium, STa (heat stable) and LT (heat labile) enterotoxins production, colonization factors, bacteriocin production and antibiotic resistance marks.

The agarose gel electrophoretic analysis showed the occurrence of plasmids among the strains study. Most of the strains had more than one plasmid and their occurrence could be related with the enterotoxin and bacteriocin production, as well as to multiple antibiotic resistance marks.

The study of the *Escherichia coli* strains isolated from young swine has a major importance to future research of pathogenicity factors and mechanisms of pathogenicity of this group in pigs, raising more information about the variability of strains inhabiting the normal and

diarreic flora of the animal and their profiles of antibiotic resistance and pathogenicity as well as to advance of the colibacillosis diagnosis (wich severely affects the young swine) and to the development of vaccines against it in a near future.

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli*, que usualmente faz parte da flora intestinal do homem e animais domésticos é de interesse tanto médico quanto veterinário. Ela é, por exemplo, causadora da diarreia dos animais jovens, a chamada colibacilose, que se caracteriza por ser uma enfermidade aguda que afeta animais neonatos e geralmente é fatal para suínos jovens na maioria dos casos (SOJKA, 1971).

Nos últimos anos a importação de um elevado número de suínos de diferentes países e de raças selecionadas, tem introduzido numerosas enfermidades, entre elas, a colibacilose suína ocupa posição de destaque. Desta forma, novos tipos de *E. coli* podem ser introduzidos e produzir colibacilose nos suínos (SANCHEZ, 1985).

Muitas pesquisas têm sido realizadas no sentido de distinguir amostras de *E. coli* que vivem, como comensais, no trato intestinal, daquelas reconhecidas como patogênicas. A colibacilose entérica causada por amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) é a forma mais comum, e é caracterizada pela produção de um, ou dois tipos de enterotoxinas.

Uma toxina, denominada termolábil (LT), é inativada pelo aquecimento a 60°C, e outra toxina, denominada termoestável (ST). Em adição à produção de enterotoxinas, a enteropatogenicidade destas amostras de *E. coli* está relacionada à sua capacidade de colonizar o epitélio intestinal.

Esta colonização está sempre associada com a presença de certos antígenos protéicos superficiais, semelhantes a "Fimbria" denominados fatores de colonização ou antígenos de aderência ou simplesmente adesinas. As adesinas conhecidas como K₈₈ e 987P foram descritas em amostras de *E. coli* associadas com a diarreia em suínos (ØRSKOV et alii, 1961; NAGY et alii, 1976, 1977; ISAACSON et alii, 1977).

Os antígenos K₉₉, F₄₁ e F₄₂ estão associados com as *E. coli* encontradas em diarreia de ovino, bovino e suíno (ØRSKOV et alii, 1975; MORRIS et alii, 1982; YANO et alii, 1986).

A análise genética de amostras ETEC isoladas de suínos jovens e neonatos indicou que os determinantes genéticos para a produção de enterotoxinas e elaboração de K₈₈ e K₉₉ foram carregados por plasmídeos transmissíveis (ELWELL & SHIPLEY, 1980).

Determinadas linhagens de *E. coli* podem produzir colicinas, proteínas que geralmente são letais para outras bactérias pertencentes em geral à mesma espécie (FREDERICKI, 1964).

Certas colicinas são codificadas por plasmídios. Diferentes pesquisadores procuram correlacionar a produção de colicina com a enteropatogenicidade da amostra, em particular, a colicina V (BRANDIS & SMARDA, 1971; SMITH, 1974).

No tocante a resistência a antimicrobianos um número cada vez maior de linhagens de *E. coli* apresentam resistência a uma ou mais drogas (WILLINGER, 1981 e CHEN et alii, 1984). Esta resistência às drogas pode ser devido aos genes localizados no cromossomo (resistência cromossômica, como também, pode ocorrer devido a uma resistência extracromossômica. Este segundo tipo de resistência tem sido intensamente pesquisada dada sua enorme importância aplicada. Muitos plasmídios já foram descritos, (plasmídios R), que proporcionam resistência múltipla às drogas na bactéria que o carrega.

Os plasmídios R podem ser transferidos de uma célula para outra com alta frequência, e deste modo conferir resistência a vários antibióticos e quimioterápicos. Desta forma, a proliferação da resistência múltipla às drogas em bactérias é muito comum, não só entre células da mesma espécie, como também em bactérias de gêneros diferentes.

É conhecido o fato de que para obter alimentos sadios de origem animal em quantidades suficientes para alimentar um número cada vez maior de pessoas, tem-se utilizado

substâncias químicas, incluindo medicamentos, como antibióticos. Estes são usados na prevenção ou na terapia em casos de doenças ou como aditivos alimentares para aumentar a eficácia alimentar e o crescimento; em países como o Brasil, onde a avicultura e suinocultura são atividades de produção em grande escala, existe uma alta porcentagem de animais expostos, num ou outro momento de sua vida, e conseqüentemente, os resíduos de tais substâncias chegarão ao consumidor através dos alimentos de origem animal, constituindo-se num grave problema de saúde pública.

Sabendo-se que todos estes fatos mencionados acima, possuem genes codificados por plasmídios, torna-se portanto, de enorme importância, um estudo da influência de plasmídios afetando características de produção de enterotoxinas, colicinas e resistência a antibióticos por populações de suínos com ou sem diarreia.

Tendo em vista esses fatos, o presente trabalho tem como principais objetivos:

- a) Estudo de fatores de virulência em amostras de *E. coli* isoladas de animais com diarreia, em comparação a amostras procedentes de animais clinicamente sadios;

- b) Caracterização bioquímica das linhagens isoladas de *E. coli*, e verificar as propriedades como produção de enterotoxinas STa e LT, capacidade hemaglutinante, produção e caracterização de colicinas e resistência a antibióticos de *E. coli* animal com e sem diarreia;
- c) Verificar a ocorrência de plasmídios em linhagens de *E. coli* de leitões contando com até 2 semanas de idade;
- d) Correlacionar tais plasmídios quando presentes com capacidade de produção de enterotoxinas, colicinas e resistência a antibióticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A *Escherichia coli* E O SEU PAPEL NA FLORA INTESTINAL DE SUÍNOS NEONATOS

Escherichia coli é uma das bactérias mais importantes, e são componentes naturais do segmento posterior do trato intestinal (região do íleo e cólon), do homem e dos animais. Neste local, vivem como comensal em condições favoráveis (MACKOWIAK, 1982). A regulação da flora intestinal de *E. coli* é devida a interações competitivas antagônicas, bacteriocinas e a imunidade local, entre outras (WILLINGER & WEBER, 1978). Sua função principal consiste na regulação de processos intestinais de decomposição e produção de importantes vitaminas do complexo B e de vitamina K.

Estudos realizados em animais axênicos, livres de germes (SPF), sugerem que a flora normal estimula o desenvolvimento das defesas imunológicas, e estes animais, além de serem extremamente sensíveis às infecções bacterianas, são pobres em imunoglobulinas secretoras e séricas (ROSEBURY, 1982; FINEGOLD et alii, 1983).

A proliferação e multiplicação de amostras enteropatogênicas nos intestinos grosso e delgado são múltiplas; entretanto, o estado imunológico do animal é fundamental. Os leitões são mais susceptíveis às formas de diarreia, principalmente aquelas que tem por agente etiológico a bactéria *Escherichia coli* (DRACHMAN, 1974). Estes suínos neonatos são mais sensíveis às diarreias, nas primeiras semanas de vida, e depois, novamente na época do desmame (BERNER, 1980).

Amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), causam uma diarreia de característica aguda em animais recém-nascidos (SOJKA, 1965; BARNUM et alii, 1967; SMITH & DAVIS, 1977; GYLES, 1971; SOJKA, 1975, KOHLER, 1972; FIELD et alii, 1977; HUGHES et alii, 1978; CASTRO et alii, 1984), e essa patologia é motivo de inúmeros trabalhos de pesquisa em virtude da alta mortalidade e morbidade que causam as criações de suínos.

2.2. A PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS POR AMOSTRAS

DE *E. coli*

As *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) elaboram mais de um tipo de enterotoxina; uma delas, um peptídeo de baixo peso molecular, dializável e termoestável denominada ST(STa e STb) (DEAN et alii, 1973; GYLES, 1979) e a outra de alto peso molecular, não dializável, de natureza protéica e termolábil (LT) (CLEMENTS et alii, 1980; SACK, 1980). A enterotoxina LT atualmente, é mais estu-

dada quanto a sua natureza química, características antigênicas e efeitos biológicos do que a enterotoxina ST. A LT de *E. coli* é uma proteína que se assemelha à toxina colérica (*V. cholerae*) tanto farmacologicamente quanto imunologicamente (EVANS et alii, 1972; GYLES, 1974; HEWLETT et alii, 1974; OSBORNE et alii, 1982). Também é formada por duas unidades chamadas de A e B, sendo que as mesmas são biologicamente e imunologicamente distintas entre si (CLEMENTS et alii, 1978; 1980). A enterotoxina LT se liga ao gangliosídeo GM₁, na membrana das células das vilosidades intestinais, à semelhança da toxina colérica e estimula a enzima adenil ciclase que leva a um aumento do AMP cíclico intracelular. Sendo que esta alteração provoca uma modificação do equilíbrio hidrosalino, o qual ocasiona em perda de água e eletrólitos provocando a diarreia.

Supõe-se que exista uma estrutura semelhante para a enterotoxina LT de *E. coli*, com afinidade pelo gangliosídeo GM₁ provocando alterações funcionais nas células intestinais, com conseqüente aumento do AMP cíclico intracelular (KANTOR et alii, 1974; HONDA et alii, 1981; STEPHEN & PETROWSKI, 1981; OSBORNE et alii, 1982). Os mesmos autores também verificaram que as enterotoxinas LT de origens humana e suína e a enterotoxina colérica, apresentavam relações antigênicas. Porém, existiam em cada uma delas determinantes antigênicos específicos, sendo que, tais diferenças antigênicas não parece influir nos mecanismos destas toxinas.

A enterotoxina ST_a foi purificada (ALDERETE & ROBERTSON, 1978; TAKEDA et alii, 1979; STAPLES & GIANELLA, 1979), bem como foi determinada sua natureza química. É um peptídeo, com peso molecular estimado ao redor de 1.500 daltons, sendo que estes dados são válidos para a enterotoxina detectável pelo teste do comundongo recém-nascido (CRN) (DEAN et alii, 1973), que é chamado ST_a. Este foi assim denominado porque existe uma outra forma de enterotoxina termoestável denominada ST_b, que é ativa somente em alça ligada de leitões com 5 a 7 semanas de idade (GYLES, 1979).

Os mecanismos pelos quais ST_b é capaz de causar diarreia em suínos são desconhecidos, porém, a ST_a é capaz de ativar a guanil ciclase que leva a um aumento do GMP cíclico intracelular (FIELD et alii, 1978; HUGLES et alii, 1978; NEWSOME et alii, 1978; GIANELLA & DRAKE, 1979; GREENBERG et alii, 1980; GUERRANT et alii, 1980).

A enterotoxina ST_a é considerada, não imunogênica, nas condições naturais, sendo capaz de induzir a formação de anticorpos anti ST_a quando inoculada e acoplada a um antígeno completo, sendo considerada como um hapteno (GREENBERG & GUERRANT, 1981).

Apesar da enterotoxina ST_a estar envolvida em casos de diarreia no homem e em animais, devido a esta não imunogenicidade, existem dúvidas a respeito destas propriedades (JACKS & WU, 1974; KLIPSTEIN et alii, 1976; FIELDS et

alii, 1978; MOSELEY et alii, 1983), e isto constitui-se num empecilho para melhor compreensão de suas propriedades biológicas, merecendo melhores estudos.

Existem vários testes para a detecção da enterotoxina STa, o teste inicialmente utilizado foi o de alça ligada de intestino de coelho (EVANS et alii, 1973), porém o teste mais utilizado e que é considerado clássico na detecção de STa é o teste do comundongo recém-nascido (CRN), proposto por DEAN et alii (1972). O teste de DEAN et alii (1973) esclareceu a capacidade da enterotoxina STa promover aumento de líquido na luz intestinal, devido a ativação da enzima guanil ciclase e mais recentemente estudos envolvendo um maior influxo de cálcio e aumento do GMPc em células basófilas leucêmicas de rato (KNOOP et alii, 1983) e em outros cultivos celulares (INOVE et alii, 1983).

Testes sorológicos foram desenvolvidos para detecção de ST. Esses testes consistem no acoplamento de uma proteína carregadora à toxina, que confere antigenicidade. Este permite a elaboração de um antisoro que facilita a utilização de um teste de radioimunoensaio de considerável sensibilidade (FRANTZ & ROBERTSON, 1981). Outro teste de radioimunoensaio utilizado é o que determina a quantidade de GMP cíclico formado através da ativação da enzima adenil ciclase pela toxina ST em células de mucosa intestinal de rato (WALDMAN et alii, 1984).

A enterotoxina LT foi inicialmente pesquisada pelo teste tradicional de alça ligada em coelho (DE et alii, 1956). Um outro teste utilizado consiste na verificação do aumento de permeabilidade capilar (PF), decorrente da ação de enterotoxinas (EVANS et alii, 1973). Métodos para detecção da enterotoxina são utilizados e se baseiam na reação cruzada entre LT de *E. coli* e a toxina colérica. EVANS et alii (1977) desenvolveram o método da imunohemólise passiva em tubo, posteriormente modificado por SERAFIM et alii (1979). Métodos de radioimunoensaio (GREENBERG et alii, 1977), imunoenzimáticos (SVENNERHOLM & HOLMGREEN, 1978), método de Biken (HONDA et alii, 1981) e o método da imunohemólise (WEILER et alii, 1975; CASTRO et alii, 1980; YANO et alii, 1982). Estes testes sorológicos são empregados até o presente e propostos para a detecção de LT.

Os laboratórios especializados, atualmente têm utilizado ensaios em cultura de tecido, para a detecção de LT. Estes testes basearam-se na capacidade desta enterotoxina, induzir as alterações morfológicas em células tumorais de adrenal de camundongo de amostras Y_1 (DONTA et alii, 1974), em células de ovário de hamster chinês (CHO) (GUERRANT & BRUTON, 1977), e em células Vero (rins de macaco verde) (SPEIRS et alii, 1977), estas três linhagens celulares são bastante sensíveis à detecção da enterotoxina LT. Seu emprego torna-se vantajoso devido a especificidade e rapidez dos testes com ela realizados.

Testes mais sofisticados foram desenvolvidos e estão relacionados à tecnologia do DNA recombinante, através de ensaios envolvendo os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas ST e/ou LT (MOSELEY et alii, 1980; HILL et alii, 1983; BEERY et alii, 1984). Endonucleases de restrição são utilizadas para fragmentar o DNA que codifica enterotoxina LT e/ou ST que são utilizadas na hibridação de seqüências homólogas de DNA.

2.3. COLONIZAÇÃO DO EPITÉLIO POR AMOSTRAS DE *E. coli*

Em adição à produção de enterotoxinas, a enteropatogenicidade das *E. coli* estão relacionadas à sua capacidade de colonizar o epitélio intestinal. Esta colonização está sempre associada com a presença de certos antígenos proteicos, superficiais que são semelhantes a "pillus". Estes são chamados de fimbrias, ou adesinas ou antígenos de aderência ou colonização (DUGUID et alii, 1955; BRINTON, 1965; JONES & RUTTER, 1974; EVANS et alii, 1978; GAASTRA & GRRAF, 1982).

Os fatores de colonização associado com as amostras enteropatogênicas de *E. coli* para diferentes espécies animais são antigenicamente distintas, porém eles compartilham com algumas propriedades químicas e biológicas, devido ao aumento da retenção e da proliferação da *E. coli* enterotoxigênicas no intestino delgado, superior e inferior de huma-

nos e de animais infectados. Estes antígenos de aderência promovem uma hemaglutinação dos eritrócitos humanos ou animais na presença de D-manose (STIRM *et alii*, 1967; SMITH *et alii*, 1971; JONES *et alii*, 1974; LEVINE *et alii*, 1980; CRAVIO-
to *et alii*, 1982).

O primeiro fator de colonização descrito foi o antígeno K₈₈ nas amostras de *E. coli* enterotoxigênicas de leitões (ØRSKOV *et alii*, 1961; JONES *et alii*, 1972; SMITH & LINGWOOD, 1972; MOON *et alii*, 1980) e apresenta três variantes sorológicas do K₈₈ já descritos. K_{88ab}, K_{88ac} e K_{88ad} e caracterizados imunologicamente (ØRSKOV *et alii*, 1961; GUINEE *et alii*, 1976; GAASTRA *et alii*, 1979; KLEMM, 1981; GAASTRA & GRAAF, 1982). Para o antígeno K₈₈ existe um receptor específico, as células epiteliais do intestino dos suínos a qual parece ser determinada por um locus gênico dominante, herdado de forma mendeliana simples (SELLWOOD, 1982).

A presença do antígeno K₉₉ foi relatada por MOON *et alii* (1970) em amostras enterotoxigênicas (ETEC) envolvidas na diarreia neonatal de bovinos. Os antígenos F₄₁ e F₄₂ associados com a *E. coli* foram encontrados em diarreia de origem bovina, ovina e suína (MORRIS *et alii*, 1982; YANO *et alii*, 1986).

Um outro tipo de adesina que merece destaque é a 987P, que ao contrário das outras adesinas, não demonstrou

atividade hemaglutinante frente a vários tipos de hemácias, e pode ser detectado "in vitro", através de provas de soroaglutinação utilizando soros específicos (NAGY *et alii*, 1976, 1977; ISAACSON *et alii*, 1977).

2.4. PRODUÇÃO DE COLICINAS POR AMOSTRAS DE *E. coli*

Certas *E. coli* são capazes de produzir uma substância antimicrobiana que liberadas no meio, lisa, outras bactérias da mesma espécie. Apenas uma pequena proporção das células de uma população são produtoras ativas destas bacteriocinas (GRATIA, 1925; FREDERICQ, 1964).

Estas substâncias, por terem sido descobertas em *E. coli* foram denominadas de colicinas. Posteriormente, verificou-se que este fenômeno era mais freqüente e a ocorrência também em *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, entre outras.

O termo bacteriocina foi proposto, genericamente, para estas substâncias antimicrobianas. As colicinas possuem relações evolutivas com outras estruturas como fimbria, toxinas e proteínas fagocíticas (BRANDIS & SMARDA, 1971).

As bacteriocinas mais estudadas são as colicinas que têm natureza protéica e a semelhança dos fagos são adsorvidas por receptores específicos na parede celular de células

las sensíveis. Estes receptores não existem nas células resistentes (BRANDIS & SMARDA, 1971).

Células colicinogênicas, isto é, bactérias produtoras de colicina, uma vez perdendo esta capacidade não podem recuperá-la, a não ser por contato com outras células colicinogênicas. Todas as colicinas estudadas são proteínas e codificadas por plasmídios transferíveis, chamados Plasmídios Colicinogênicos (col) (SMITH, 1974; SMITH & HUGGINS, 1976; STUART, 1980).

As colicinas são classificadas em função de seu espectro de atividade e sua análise às vezes é um pouco complicada, devido a presença de mais de um fator col em uma célula. São classificadas em um sistema de tipos designados pelas letras: A, B, E, I, K, V. Um método alternativo de classificação é a determinação da atividade das colicinas, contra um grupo de derivados de uma amostra, originalmente, sensível a cada derivado resistente a uma série de colicinas. Este sistema comparado, constitui a base da classificação atual das colicinas.

As células colicinogênicas são imunes a sua própria colicina, uma vez que não possuem receptores específicos. Esta colicina parece conferir à bactéria, a capacidade de sobrevivência no trato digestivo de uma variedade de animais. Essas observações foram comparadas por trabalhos de SMITH & HUGGINS (1976), OZANNE et alii (1977).

Existe na literatura, trabalhos que tentam correlacionar a capacidade de produzir colicina, com o poder de causar enteropatogenicidade entre as origens colibacilares (SALAPKA, 1971; DJONNE, 1985), porém existem muitas dúvidas e controvérsias a respeito do papel patogênico desempenhado pela bactéria *E. coli* produtora da colicina, sendo que este assunto merece ser mais estudado.

2.5. RESISTÊNCIA GENÉTICA A ANTIBIÓTICOS POR AMOSTRAS DE *E. coli*

O uso de drogas no combate de infecções bacterianas tornou-se rotineiro após a Segunda Guerra Mundial. Com o tempo surgiram amostras bacterianas geneticamente resistentes às drogas originais, e pela consequência, as infecções foram sendo tratadas com outras drogas, sendo que mais de uma droga era utilizada por tratamento.

Em *Shiguella*, foi demonstrado que tais resistências poderiam ser transferidas a outras bactérias (OCHIAI et alii, 1959; AKIBA et alii, 1960). Esta resistência múltipla também foi relatada na Europa (DATTA, 1962). Atualmente, o número de amostras patogênicas, taxa de resistência a drogas, e o número de casos de infecção em populações humanas e animais, têm levado a sérios problemas de resistência bacteriana a drogas.

MITSUHRASHI et alii (1960, 1961, 1967), esboçaram uma analogia entre os agentes que transferiam resistência a drogas. Estes agentes foram posteriormente chamados fator R, e de fator sexual "F" da *E. coli* K₁₂.

Os elementos genéticos que determinam a resistência simples ou múltipla às drogas antimicrobianas transferíveis por conjugação foram previamente denominados fatores "R" (WATANABE, 1963), sendo depois chamados "plasmídios R". O termo plasmídio foi introduzido por LEDEBERG (1952). Foi aceito como um termo genérico para referir-se a elementos extracromossômicos. Estes podem se replicar autonomamente na célula hospedeira, funcionando como um replicon, ou eventualmente, integrar-se covalentemente ao cromossomo bacteriano, passando a duplicar-se juntamente com ele (BUKHARI et alii, 1977; BRODA, 1979; NOVICK, 1976, 1980; CAMPBELL, 1981).

O mecanismo pelo qual os fatores "R" conferem resistência às drogas é de grande interesse, principalmente, nas áreas de veterinária e de zootecnia, que fazem uso de antibióticos a nível curativo ou terapêutico. São também utilizados como potencializadores da dieta animal, neste caso, atuando como promotores do crescimento. Este uso abusivo vem redundando em problemas no combate a infecções, quer seja no homem ou animais, principalmente os procedentes de origem entérica (MORENO, 1970, 1973; LOPES, 1978; TOLBERT, 1981; LANGLOIS et alii, 1984; FURTADO & PEREIRA, 1985).

Nos Estados Unidos atualmente, metade da carne ovina encontrada no mercado, é proveniente de animais alimentados com antibióticos, 70% da carne bovina, 90% da carne suína e 100% da carne de frango consumida é de animal alimentado com rações contendo antibióticos (BIRD, 1980; FALCÃO et alii, 1982).

No Brasil, os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento em diversas criações de animais, e também a nível profilático. No entanto, não existe um controle rigoroso, no emprego destes medicamentos, ao contrário do existente na Inglaterra, Alemanha Oriental, Holanda, Tchecoslováquia e Países Escandinavos, nos quais existe uma proibição da adição de qualquer medicamento utilizado, em medicina humana em rações para animais destinados ao abate.

Tem-se observado nos últimos anos, aumento de populações de bactérias intestinais isoladas de diferentes fontes resistentes às várias drogas antimicrobianas (MORENO, 1970; LOPES, 1978; BOTINO, 1981; GLOCK, 1981; SILVA, 1983; VIDOTO et alii, 1986; SILVEIRA, 1986). Este aumento da resistência às drogas pode ser atribuído ao uso abusivo de antibióticos, tanto a terapêutica humana quanto na veterinária e, no aditivo da ração. Desta forma podendo incrementar a distribuição de bactérias entéricas resistentes às drogas.

2.6. PLASMÍDIOS

Atualmente, os plasmídios desempenham um papel chave na descoberta dos elementos bacterianos transmissíveis, os quais provaram ser úteis na elucidação dos mecanismos responsáveis por uma variedade de rearranjos cromossômicos nas bactérias (CAMPBELL, 1981; DATTA & HUGGES, 1983). O estudo dos plasmídios bacterianos despertam interesse crescente no que diz respeito ao papel destes elementos extracromossômicos na conjugação bacteriana, nas mudanças genéticas, nas resistências a antibióticos, na produção de enterotoxinas e colicinas, na resistência sérica e na capacidade de aderência. Essas características são determinadas por genes carregados por plasmídios, em bactérias de importância médica, veterinária, zootécnica, industrial e outras (BRINTON, 1971; GYLES et alii, 1977; ELWELL & SHIPLEY, 1980; HARNETT & GYLES, 1985).

As técnicas de clonagem do DNA forneceram um entendimento mais detalhado dos plasmídios como moléculas, incluindo sua estrutura, replicação, transferência conjugativa e herança. Portanto, os plasmídios bacterianos desempenharam e continuam a desempenhar, um papel central na pesquisa biológica.

Em 1959, a natureza plasmidial era determinada apenas a partir de seus efeitos genéticos; logo após esta data, plasmídios de DNA foram visualizados em gradientes (MAR

MUR et alii, 1961) e o "pili" conjugativo foi observado através de microscopia eletrônica (BRINTON et alii, 1964).

Correlações foram efetuadas entre plasmídios e fagos, e os fatores "R" foram classificados, juntamente com o F e o λ , como elementos genéticos ou episômos que podem existir no estado autônomo ou integrado no cromossomo de sua bactéria hospedeira (JACOB & WOLLMAN, 1958). Posteriormente, o termo "episômo" para designar uma classe de elementos genéticos, não mostrou ser eficiente, pois os plasmídios, não necessariamente, integram-se com os cromossomos do hospedeiro e o seu modo de interação difere dos λ (HAYES, 1969).

2.6.1. Plasmídios que codificam para fatores de colonização e enterotoxinas em amostras de *E. coli*

A análise genética de linhagens de *E. coli* (ETEC) isoladas de suínos jovens e leitões com diarreia, indicaram que os determinantes genéticos para a produção de enterotoxinas e elaboração de antígenos de aderência K₈₈ e K₉₉ eram carregados por genes localizados em plasmídios (SMITH, 1974; SMITH & LINGWOOD, 1971; GYLES & PALCHANDHURI, 1977; MOON et alii, 1980).

Numa série de experimentos SMITH & LINGWOOD, (1971), explicaram a natureza transmissível destes fatores de

virulência (plasmídios) e inoculadas em suínos jovens e sua habilidade para produzir diarreia foi observada, determinando-se que a presença do plasmídio responsável pela produção da enterotoxina (ENT) e do plasmídio K₈₈ eram suficientes para converter algumas linhagens de *E. coli* de flora normal de suínos fenotipicamente saudáveis em enteropatogênica, com estes animais exibindo o fenótipo diarreico. A presença de somente ENT ou K₈₈, não foi o suficiente para converter uma linhagem avirulenta, embora linhagens que expressassem o K₈₈ algumas vezes, levavam a uma forma suave de diarreia.

Amostras de *E. coli*, são freqüentemente capazes de produzir uma hemolisina, no entanto, constatou-se o ganho ou perda de plasmídios mediadores da produção de hemolisina (Plasmídios HLy). Estes não possuem efeitos na capacidade dessas linhagens de causarem diarreia. Foi observado que a aquisição de plasmídios ENT e K₈₈, não foi suficiente para converter todas as linhagens de *E. coli* num estado enteropatogênico. Portanto, outros fatores plasmídicos ou cromossômicos devem estar envolvidos na expressão ENT e K₈₈, como fatores de virulência da *E. coli* enteropatogênica são freqüentemente encontrados em plasmídios (ØRSKOV & ØRSKOV, 1966; AFFONSO, 1981; SILVEIRA, 1986).

As análises plasmidiais iniciais das enterotoxinas (ETEC) de *E. coli* indicavam que estas produziam ST sozinha ou ST e LT. Em linhagens de *E. coli* (ETEC) ST⁺ e LT⁺, os

genes para a toxina eram carregados em uma molécula plasmídica simples. Análises físicas e genéticas de vários destes plasmídios, de linhagens suínas e humanas indicavam que estes eram relativamente homogêneos, com peso molecular entre 55 e 66.10⁶ megadaltons, e uma fração molar adicional de guanina e citosina de 0,50 (GYLES et alii, 1974; SO et alii, 1974).

Linhagens de *E. coli* que elaboram apenas enterotoxina termoestável ST tem sido implicadas nas doenças diarreicas em humanos (GYLES et alii, 1974). A hibridação DNA - DNA com dois destes plasmídios mostrou que estes possuíam homologia com o plasmídio suíno ST⁺LT em relação ao seu tamanho e ao conteúdo de citosina-guanina (GYLES et alii, 1974; SO et alii, 1975).

Durante os estudos iniciais da transferência do determinante K₈₈ (ØRSKOV et alii, 1975) observaram que a transferência do K₈₈ e uma linhagem F de *E. coli*, resultou na inibição da fertilidade "F".

A atividade de transferência, pode ser separada dos genes K₈₈, sugerindo que este fator semelhante ao fator "F", pode ser um plasmídio independente que possa mobilizar o plasmídio K₈₈. Através de estudo de microscopia eletrônica, sugeriu-se que o antígeno K₈₈, dos genes de transferência, poderia residir em um plasmídio composto de 50 megadaltons, que pode se dissociar em um plasmídio de 10 megadaltons, carregando o gene estrutural do K₈₈ e um plasmídio de transfe-

rência de 40 megadaltons. Os fenótipos definitivos não podem ser caracterizados desde que os diferentes plasmídios não possam ser isolados, como uma única espécie molecular, em separados revestimentos celulares. SO et alii (1975) relataram pesos moleculares de 43 a 47 megadaltons para dois plasmídios K₈₈, transferidos para linhagens hospedeiras de *E. coli* K₁₂.

O K₈₈ab (MOOI et alii, 1979) e o K₈₈ac (SMITH & PARSELL, 1975) têm sido isolados por clonagem molecular. Estes últimos autores afirmaram que a clonagem do determinante K₈₈ab resultou num aumento de quatro vezes na produção de K₈₈ a 37°C; entretanto, a expressão era altamente dependente da orientação do fragmento quimérico. Por deleção "in vitro", o tamanho do fragmento de K₈₈ab foi reduzido a 4,3 megadaltons. As proteínas sintetizadas por este plasmídio quimérico foram analisadas em um sistema de minicélulas e contudo seu mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido, se todos os outros polipeptídeos sintetizados nas minicélulas a partir do plasmídio quimérico estão envolvidos na expressão do K₈₈.

O fator de colonização K₉₉ foi localizado em um plasmídio conjugativo de peso molecular de 52 megadaltons (SMITH et alii, 1972). Quanto aos genes para a produção de F₄₁ e 987P existem fortes indícios de que sua localização é cromossômica.

A aplicação da genética molecular ao estudo de fatores de colonização e enterotoxinas carregadas por genes lo

calizados em plasmídios de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) es tã sendo utilizado em casos de diarreia que se constitui num sério problema econômico em criações de suínos, principalmente dos jovens, que são os mais acometidos na primeira semana de vida. O uso desta tecnologia no estudo destes e outros fatores virulentos, muito irão acrescentar para o entendimento dos mecanismos das doenças diarreicas, abrindo novas possibilidades para diagnósticos, tratamentos e produção de vacinas.

2.6.2. Plasmídios colicinogênicos

Os plasmídios colicinogênicos (plasmídios col) e suas colicinas são bem estudados (HARDY, 1975). Estes plasmídios podem ser classificados em 2 grupos principais, à semelhança dos fatores "F"; alguns são grandes, com cerca de 60 megadaltons ou mais, são conjugativos e presentes em pequeno número de cópias na célula, enquanto, outros são pequenos, ao redor de 5 megadaltons, não são conjugativos, e produzem um grande número de cópias por células e alguns estão muito relacionados aos plasmídios que determinam outras funções. Um exemplo é dado por BRANDIS & SMARDA (1971), OZANNE et alii (1977), DJONNE (1985) que tentaram correlacionar a produção de enterotoxinas e antígenos de aderência simultaneamente à produção de colicinas.

HARDY (1975), utilizou vários critérios incluindo o tamanho da molécula do plasmídio ao redor de 5 a 60

megadaltons e sugeriu que cada grupo descendeu de um único plasmídeo ancestral. SMITH (1974) foi o primeiro a observar que uma significativa proporção de linhagens de *E. coli*, associadas com a bacteremia no homem e nos animais, produziam colicinas V, indicando que o plasmídeo col V confere a *E. coli* hospedeira, uma maior capacidade de sobreviver no sangue, fluido peritonal e nos tratos alimentares de uma variedade de animais de testes.

A reintrodução do plasmídeo col V em linhagens derivadas livres por conjugação, restaurou a virulência ao nível original, levando ao estabelecimento de uma associação entre os plasmídios especificadores de síntese de colicina V e a um aumento da propriedade de virulência na *E. coli*, embora a colicina V por si só, não seja tóxica para os animais. Isso foi confirmado por trabalhos envolvendo culturas de sobrenadantes que possuíam atividade de colicina, levando a um aumento de permeabilidade vascular e produção de uma resposta inflamatória em coelhos; no entanto, o relacionamento entre a atividade da colicina V e a virulência nas linhagens de *E. coli* indicaram que a produção de colicina não era essencial para o aumento da virulência (SMITH & HUGGINS, 1976; OSANNE et alii, 1977; KAECKENBEECK et alii, 1977).

Estudos posteriores envolvendo uma estreita ligação entre os genes para a biossíntese da colicina V e a virulência no plasmídeo col V sugerem que estes genes podem in-

teragir para uma vantagem seletiva mútua, e a produção de colicina V pode ser utilizada como uma marcação útil para a seleção de determinantes virulentos que ocorrem naturalmente nos isolados de *E. coli* (BINNS et alii, 1979; STUART et alii, 1980).

WILLIAMS (1979), estudou plasmídio col V quanto a sua capacidade de especificar um mecanismo eficiente de retirada do ferro, porque este pode desempenhar importante papel na patogenicidade de *E. coli*. Constatou que existe uma associação entre plasmídios col V e o ferro, demonstrando que alguns plasmídios col V especificam um novo sistema de captação do ferro, contribuindo para a patogenicidade das linhagens invasoras de *E. coli*. A maneira como estão interrelacionados; se individualmente, ou em conjunto, com os vários fatores da célula hospedeira e como esta interação irá contribuir para a virulência geral das linhagens de *E. coli* precisam ser melhores estudadas.

2.6.3. Plasmídios de resistência R em amostras de *E. coli*

Plasmídios R são elementos genéticos extracromossômicos que conferem resistência a várias drogas antimicrobianas como antibióticos, quimioterápicos e sais de metais pesados (WATANABE et alii, 1964; SMITH, 1962, 1967; SMITH & DAVIS, 1967).

Originalmente estes elementos foram encontrados em espécies de *Shigella* no Japão (WATANABE, 1963) e posteriormente em todo o mundo.

Muitos estudos de plasmídios de resistência foram originários de bactérias procedentes de diferentes hospitais ou de criatórios animais e a distribuição abrange todos os grupos de bactérias entéricas que são consideradas atualmente, a origem para a resistência às drogas entre todos os organismos (COATLES & HOOPES, 1980; O'BRIEN et alii, 1980; CAMPBELL, 1981).

Os mecanismos bioquímicos de resistência conferidos pelo plasmídio R, são geralmente, diferentes daqueles encontrados em genes de resistência cromossômica (MITSUHASHI et alii, 1961; SMITH, 1962, 1975, 1977; WATANABE, 1963; LINTON, 1977).

A resistência mediada por plasmídios R é devido principalmente a síntese de proteínas as quais podem enzimaticamente destruir as drogas, modificar o antibiótico para uma forma inativa, modificar o sítio alvo ou interagir com o envelope celular com a finalidade de torná-lo impermeável ao antibiótico (MITSUHASHI, 1976).

Plasmídios R podem conferir resistência a uma droga, ou carrear resistência múltipla a mais de 10 drogas diferentes, determinando portanto, uma resistência múltipla e

disseminando por intermédio de plasmídios (conjugação e transformação), marcas de resistência para outras bactérias (WATANABE, 1963; LOKEN et alii, 1971; POHL et alii, 1972).

Certos genes envolvidos na resistência dos antibióticos em bactérias, em particular a *E. coli*, tem a capacidade de serem transpostos de uma molécula de DNA para outra, podendo mover-se de plasmídio para plasmídio ou de plasmídio para cromossomo (HEDGES & JACOB, 1974; COHEN, 1976; BUKHARI et alii, 1977; COHEN & SHAPIRO, 1980) observaram que a transferência de genes, que confere resistência a ampicilina de um plasmídio receptor, chamado de transposon.

Através da dissociação do plasmídio R em segmentos que transportam genes, para as funções de transferência como um grande número de genes que confere resistência para diferentes antibióticos, numa simples molécula de DNA plasmidial, e que acarreta conseqüências indesejáveis, não são para os animais portadores destas bactérias, como para o homem, podendo este ter sua flora intestinal alterada, pela disseminação dos plasmídios R.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram utilizadas 143 amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões diarrêicos e não diarrêicos contando até 15 dias de idade.

Como controle positivo para a produção de enterotoxinas STa e LT foram utilizadas as amostras de *E. coli* 40T e como controle negativo, não enterotoxigênico, foi utilizada a amostra de *E. coli* K₁₂-606.

Amostras de *E. coli* utilizadas no presente trabalho foram isoladas através da coleta de fezes, fazendo uso de "swabs" esterilizados, retirados diretamente da cavidade anal dos animais.

As amostras de fezes suínas foram coletadas nas instalações suínas do CIZIP, Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em Pirassununga-SP.

3.1.1. Identificação e caracterização bioquímica das enterobactérias

As coproculturas tiveram como sequência a semeadura do material em placas de Petri contendo o meio de MacConkey, e selecionadas em ágar triplice, açúcar e ferro (TSI), colônias fermentadoras e não fermentadoras da lactose. Esta etapa foi efetuada no setor de Microbiologia e Imunologia Comunitária do Instituto Butantã de São Paulo.

A caracterização bioquímica dos microrganismos foram efetuadas por testes bioquímicos propostos por EDWARDS & EWING (1972) e FONTES (1982) que forneceram informações quanto a produção de gás, a partir da glicose produção de: indol, urease, e triptofano desaminase, VM/VP, H₂S, L-lisina descarboxilase, motilidade, utilização do citrato de SIMMONS. Este trabalho foi realizado no Setor de Microbiologia do Instituto Biológico, em São Paulo.

3.1.2. *Escherichia coli* portadora de plasmídios com pesos moleculares conhecidos

As amostras de *E. coli*, com plasmídios referência para pesos moleculares, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Wanderley Dias da Silveira da UNICAMP e estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1. Amostras de *Escherichia coli* usadas como referência para determinação de peso molecular de plasmídios.

Amostra	
K-12 (pSA)	portadora do plasmídio pSA PM - 23 Mdal
K-12 (RP4)	portadora do plasmídio RP4 PM - 36 Mdal
K-12 (pBR322)	portadora do plasmídio pBR322 PM - 2,2 Mdal
K-12 (p307)	portadora do plasmídio p307 PM - 54 Mdal

PM - peso molecular

Mdal- megadaltons

3.2. MEIOS DE CULTURA, REAGENTES E SOLUÇÕES

Estão descritos os meios de cultura formulados e as soluções utilizadas, bem como a maneira de prepará-los, e todos os meios a menos que indicados de outra maneira, foram autoclavados a 120°C por 15 minutos.

3.2.1. Ágar MacConckey

O meio de cultura utilizado foi o meio de MacConckey ágar nº 3 - Oxoid.

3.2.2. Meio EPM (FONTES, CF, 1982)

Composição e preparo do meio

a) Base

Triptona

10g

Extrato de carne	2g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)	2g
L. triptofano	1g
Solução alcoólica de azul de bromotimol a 15%	2 ml
Ágar	11g
Água destilada, q.s.p.	1000 ml

Todos os componentes foram adicionados à água sendo a mistura aquecida até fusão do ágar. O pH do meio foi ajustado a 7,4. Esterilizou-se em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

b) Solução de indicador e substratos

Citrato de ferro amoniacal	2g
Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3, 5\text{H}_2\text{O}$)	2g
Glicose	10g
Uréia	40g
Água destilada	85 ml

A mistura foi aquecida em banho-maria a 65°C , com agitação constante, até completa dissolução e esterilizada à mesma temperatura durante 1 hora.

c) Preparo final do meio

Base (a)	1000 ml
Solução (b)	17,5 ml

Após resfriamento da base (a), aproximadamente a 65°C , ela foi adicionada assepticamente à solução (b).

O meio foi então distribuído em volume de 4ml, em tubos de 12x120mm esterilizados, deixando-se solidificar em posição inclinada de maneira a obter uma base de no mínimo 3,5cm. Posteriormente foi feito o controle de esterilidade. O meio pronto apresentou-se de cor verde.

3.2.3. Meio Milli (Motilidade, Indol, Lisina) (FONTES, 1982)

Composição e preparo do meio.

Extrato de levedura	3g
Peptona	10g
Triptona	10g
L. lisina	10g
Glicose	1g
Bromocresol púrpura	0,02g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Adicionaram-se a todos os componentes a água destilada e aqueceu-se a mistura até a dissolução do agar. Ajustou-se o pH do meio a 6,5 e procedeu-se a esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuiu-se o meio em volume de 4ml, em tubos de 12x120mm esterilizados, deixando-se solidificar em posição vertical. O pH final foi de 6,5 a 25°C .

3.2.4. Ágar citrato de Simmons (DIFCO, Lab.)

Sulfato de magnésio	0,2g
Fosfato de amônio monobásico	1g
Fosfato de potássio dibásico	1g
Citrato de sódio	5g
Ágar	15g
Azul de bromotimol	0,08g
Água destilada	1000ml

3.2.5. Caldo nutriente estoque

As linhagens bacterianas foram mantidas em tubos de rosca em meio de Infusão Cérebro e Coração (BHI, Difco, Laboratories), adicionado de 15% de Glicerol (ECIBRA) mantidas a -20°C.

3.2.6. Preparo das enterotoxinas (ST e LT)

3.2.6.1. Meio de CAYE (EVANS et alii, 1977)

Composição:

Solução A

Extrato de levedura	1,2g
Água destilada	50ml

Preparo: Dissolveu-se e esterilizou-se em autoclave 121°C durante 15 minutos.

Solução B

Casaminoácido	4g
Cloreto de sódio	0,5g
Fosfato dibásico de potássio	1,74g
Água destilada	150 ml
pH final	8,5

Preparo: Dissolveram-se todos os componentes e ajustou-se o pH com NaOH 0,1N. Esterilizou-se em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Solução C - Solução de sais

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
$\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05g
H_2SO_4 0,01M	10 ml

As duas soluções (A e B) foram preparadas separadamente e o pH da solução B foi ajustado para 8,5 com NaOH 1N. Após a autoclavação, as duas soluções foram misturadas e para cada 200 ml de meio foram adicionados 0,2ml da solução de sais e distribuiu-se 3ml em tubos de ensaio 18x180mm esterilizados.

3.2.7. Solução de azul de Evans a 2%

Azul de Evans	2g
Água destilada	1000ml

Preparo: Dissolveu-se o corante na água e guardou-se em frasco âmbar.

3.2.8. Padronização das hemácias

3.2.8.1. Solução de Alsever (LIMA & SILVA, 1970)

Glicose	2,05g
Citrato de sódio	0,80g
Cloreto de sódio	0,42g
Água destilada	1000ml

Preparo: Dissolveu-se os componentes, ajustou-se o valor de pH para 6,1 com uma solução de ácido cítrico a 5%. Esterilizou-se por aquecimento a 100°C por 30 minutos. Usou-se partes iguais de sangue e solução Alsever.

3.2.9. Solução de trietanolamina com gelatina e ions Ca^{+2} e Mg^{+2}

3.2.9.1. Solução estoque

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,232g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2g
NaCl	75g
Trietanolamina	34.7g (ou 28ml)
Água destilada	1000ml

Preparo: Dissolveu-se os sais em água destilada e adicionou-se Trietanolamina. Ajustou-se o pH da solução a 7,4 com HCl 1,0N e completou-se o volume para 1000ml. Conservou-se sob refrigeração.

3.2.9.2. Solução para o uso

Diluiu-se a solução estoque a 1:10 e acrescentou-se 0,05% de gelatina.

3.2.10. Ágar nutriente glicosado (JONES & RUTHER, 1974)

KH_2PO_4	0,45g
Na_2HPO_4	0,81g
Ágar	8g
Caldo simples	1000ml

Preparo: Dissolveram-se todas as substâncias em 1 litro de caldo simples e autoclavou-se a 121°C por 20 minutos. Preparou-se uma solução de glicose a 10% e filtrou-se. Adicionou-se ao meio antes da distribuição em placas para uma concentração final a 0,1%.

3.2.11. Meio de Minca (GUINNE et alii, 1976)

a) Solução de sais

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1g
$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0135g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04g

Preparo: Dissolveu-se em 100ml de água esterilizada por filtração.

b) Composição do meio

KH_2PO_4	1,36g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,1g
Casaminoácido	1g
Ágar	12g

Preparo: Dissolveu-se em 1 litro de água destilada e autoclavou-se a 121°C por 15 a 20 minutos.

Adicionou-se com assepsia, 1 ml da solução de sais e distribuiu-se em placas de Petri.

3.2.12. Tampão fosfato com salina para microhemaglutinação

KH_2PO_4	1M
KH_2PO_4	1M
Salina	3M
Tampão fosfato	50ML-1M
Salina	50ML-1M

Preparo: completou-se com água para 1 litro em pH 7,4.

3.2.13. Tampão salina - fosfato(PBS) 0,1M pH 7,2

Solução A

Na_2HPO_4	1,42g
Água destilada q.s.p.	1000ml

Solução B:

KH_2PO_4	1,36g
Água destilada q.s.p.	1000ml
NaCl	8,5g

As duas soluções (A e B) foram preparadas separadamente, o pH da solução A, foi medido e ajustado para 7,2 com solução B, adicionando-se em seguida, o cloreto de sódio para concentração final de 0,85%.

3.2.14. Meios BHI e BHI ágar

O meio de cultura infusão de cérebro coração (BHI) usados foi de procedência da Difco Laboratories.

Para o preparo do meio BHI sólido foram adicionados ao BHI líquido, 1,5% de ágar.

3.2.15. Meios TSB e TSA

O meio Trypticase Soya Broth (TSB) foi de marca BBL.

Para o preparo do meio TSA foram adicionados ao TSB, 1,5% de ágar.

3.2.16. Tampão Tris-EDTA - Borato (TEB) pH 8,2

O tampão foi preparado 5 vezes concentrado conforme a fórmula:

Trizma Base	54,00g
Na ₂ -EDTA	4,65g
Ácido bórico	27,50g
Água bidestilada	1000,0 ml

Inicialmente o Na₂-EDTA foi dissolvido a quente em aproximadamente 600 ml de água bidestilada e a seguir adicionado o Trizma-Base e o ácido bórico. Após completa dissolução destes, o volume foi completado para 1000ml de água bidestilada. No momento de uso o tampão foi diluído 5 vezes e confirmado seu pH.

3.2.17. Tampão Salina-Fosfato (PBS) 0,1M pH 7,2

Solução A:

Na ₂ HPO ₄	1M
----------------------------------	----

Solução B:

KH ₂ PO ₄	1M
---------------------------------	----

NaCl

As duas soluções foram preparadas separadamente, o pH da solução A ajustado para 7,4 com a solução B, adicionando-se a seguir, o cloreto de sódio para uma concentração final de 0,85%.

3.2.18. Agarose

Agarose (SIGMA, tipo II) a 0,6% em tampão TEB pH 8,2.

3.2.19. Solução para extração de lisozima
(ALDERTON & FEVOLD, 1946).

Suspensão de bentonita 10%	150 ml
Clara de ovo	1000 ml
Tampão salina fosfato pH 7,5; 0,5M	300 ml
Solução de piridina 5%	900 ml
HCl	5 %
NaCl	5 %
NaHCO ₃	5 %
NaOH	1 N

3.2.20. Soluções para extração de plasmídios
(BIRNBOIM & DOLY, 1979)

Solução I:

Lisozima	4 mg/ml
Glicose	50 mM
Na ₂ -EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM

Solução II:

NaOH	0,2 N
SDS	1,0 %

Solução III:

Acetato de sódio 3M pH 4,8

Solução IV:

Acetato de sódio	0,1 M
Tris-HCl 0,005 M pH 8,0	

Solução para ressuspensão:

Sacarose	50%
Azul de bromofenol	0,05%
Tampão TEB pH 8,2.	

3.2.21. Brometo de etídio

Solução estoque

20 mg - 50 ml TEB

Solução para revelação (0,4 ug/ml) -

0,3 ml da solução estoque em 300 ml de TEB.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Isolamento de *E. coli*

Para o isolamento de *E. coli*, as amostras foram assepticamente semeadas em agar MacConckey em placas de Petri e incubadas a 37°C por 18 horas. No final do período de incubação selecionavam-se três colônias lactose positivas e uma colônia lactose negativa. As colônias suspeitas de serem *E. coli* eram semeadas em tubos contendo triplice açúcar e ferro-TSI (Difco). Após 24 horas de incubação a 37°C os tubos de TSI que apresentavam coloração amarela, presença de gás e ausência de produção de H₂S eram submetidos a testes bioquímicos propostos por EDWARDS & EWING (1972) e FONTES (1980), sendo que estes testes incluíam informações quanto à fermenta-

ção da glicose com a produção de ácido e gás, produção de indol, VM/VP, urease, triptofano desaminase, L-lisina descarboxilase, motilidade e citrato de SIMMONS. Foram empregadas as provas bioquímicas de descarboxilação e ornitina e fermentação da sacarose e dulcitol, para o estudo mais detalhado de *E. coli*.

Os testes bioquímicos foram realizados a 37°C e observados por 72 horas. Os meios utilizados obtidos na forma desidratada (Difco) e reconstituídos de acordo com as especificações do fabricante.

Todas as colônias de *E. coli* utilizadas nos ensaios foram mantidas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI), acrescidos de glicerol, conforme indicado em 3.2.5 e armazenadas em freezer a -20°C.

3.3.2. Pesquisa de enterotoxinas termoestável (STa) e termolábil (LT)

3.3.2.1. Preparo das enterotoxinas STa e LT

Para o preparo das enterotoxinas STa e LT cada amostra isolada foi cultivada em frascos (Erlenmeyers de 120 ml) contendo 10 ml do meio "Casamino Acids - Yeast Extract" (CAYE) (EVANS et alii, 1973). Estes foram incubados a 37°C, por 18 horas com agitação (150 rpm). Após este tempo as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm, por 40 minutos. Os sobrenadantes foram retirados evitando-se ressuspender o mate-

rial sedimentado. Estes foram mantidos a -20°C até o momento de serem ensaiados.

3.3.2.2. Teste para a detecção de enterotoxina STa

Com a finalidade de detectar a produção de enterotoxina STa foi utilizado o teste do camundongo recém-nascido (CRN) conforme descrito por DEAN et alii (1972). Este teste avalia a atividade da enterotoxina STa, a nível intestinal pelo acúmulo de líquido no lúmen intestinal do camundongo, provocado pela ação da enterotoxina.

Para a realização do teste do CRN, foram utilizados para cada material examinado, lotes de 3 camundongos com 2 a 4 dias de idade. Foi coletado 0,1 ml do sobrenadante a ser ensaiado ao qual adicionava-se uma gota de solução de azul de EVANS a 2%. Esta mistura era injetada por via esofágica de cada camundongo. Após 2 a 3 horas os animais foram sacrificados com éter sulfúrico, necropsiados e seus intestinos separados das carcaças, com o auxílio de uma pinça. Os intestinos, bem como as carcaças eram pesados individualmente e calculada a relação entre peso dos intestinos e peso das carcaças (PI/PC).

O teste era considerado positivo quando apresentava relação maior ou igual a 0,85

3.3.3.3. Teste para a detecção de enterotoxina LT

Para a detecção da enterotoxina LT foi utiliza

do o teste de imunohemólise radial (IHR), segundo metodologia proposta por YANO et alii (1982), com alterações referentes a substituição do tampão veronal, por tampão trietanolamina, contendo Ca^{+2} e Mg^{+2} , pH 7,4, conforme recomendação dos autores.

Foram utilizadas para a realização do teste placas de agarose com hemácias, do seguinte modo: uma alíquota de suspensão de hemácias padronizadas a 5% era misturada a 90 ml de agarose (SIGMA) a 1%, fundida e resfriada a 45°C, contendo 0,04% de azida sódica para obter agarose com 0,5% de hemácias.

Após homogeneização, a mistura era colocada em placas de plástico em quantidade suficiente para obtenção de uma camada de 0,5 cm de espessura, e deixadas a temperatura ambiente para solidificar. Após a solidificação eram feitos orifícios de 4mm de diâmetro distante um do outro, aproximadamente 2,5 cm obtendo-se em média 35 orifícios por placa.

A cada orifício era adicionado inicialmente 20 ml de extrato de cultura. As placas eram colocadas em câmara úmida e deixadas a temperatura ambiente por um período de 2 a 3 horas para que ocorresse a difusão dos estratos.

A seguir 20 μ l de antitoxina colérica ou anti LT diluída a 1:10 eram adicionados a cada orifício, e novamente as placas eram colocadas em câmara úmida a temperatura ambiente por 4 horas. Após esse tempo cobriu-se a superfície das placas com complemento diluído 1:10 em tampão Trietanolamina, e as placas eram incubadas a 37°C em câmara úmida por mais 4 horas. Decorrido este período o excesso de complemento era des

prezado e procedia - se a leitura dos halos de hemólise.

O teste era considerado positivo quando apresentava halo de hemólise maior ou igual a 5 mm.

3.3.4. Pesquisa de antígenos de aderência

(K₈₈, K₉₉, F₄₁)

As pesquisas destes tipos de antígenos de aderência foram feitas através de testes presuntivos, representados por provas de microhemaglutinação, realizados com hemácias de cavalo, cobaia, carneiro e humano, suspensas em solução de salina fosfatada contendo 0,5% de D Manose.

3.3.4.1. Prova de microhemaglutinação

As amostras de *Escherichia coli* a serem examinadas foram cultivadas em TSB ("Trypticase Soy Broth", DIFCO) por 24 horas a 37°C.

As suspensões bacterianas a partir daí foram semeadas (0,2ml) em meios de cultura agar glicose (nutriente glicosado) e meio de Minca semeados em placas de Petri por 24 horas para crescimento das colônias a 37°C.

3.3.4.2. Padronização das hemácias

As hemácias foram coletadas no dia do teste utilizando-se solução de Alsever como conservante e anticoagulante. As hemácias foram lavadas 3 vezes com PBS, com 0,5% de

D manose. Para a sua padronização foi tomada uma suspensão de hemácias de tal forma que quando diluída a 1:10 em água destilada fornecesse uma leitura espectrofotométrica de $A_{550} = 0,42$ ou seja 1.10^9 hemácias de carneiro, cavalo, coabaia e humana, foram coletadas de modo semelhante podendo ser utilizadas até 20 dias após a coleta, desde que conservadas a 40C.

3.3.4.3. Teste de microhemaglutinação manose resistente

Para a execução dos testes foram utilizadas placas de microtítulos (Falcon plastics) de base côncava com 96 orifícios, fazendo-se uso de micropipetas (Oxford), suspensões bacterianas de *Escherichia coli* das amostras em estudos, foram diluídas em série à razão de 2, nas placas de microtítulos, em volumes de 50 ml, utilizando-se como diluente PBS acrescido de 0,5% de D. Manose. Sobre estas diluições colocou-se igual volume de hemácias preparadas e padronizadas da maneira descrita em 3.3.4.2.

Durante toda a realização do teste, os componentes da reação foram mantidos em banho-de-gelo, conforme recomendado por RUTTER & JONES (1973). Após uma hora de incubação nestas condições, procedeu-se a leitura do teste.

3.3.5. Determinação da capacidade de produção de bacteriocina

Para verificar se as amostras de *Escherichia coli* possuíam a capacidade de produção de bacteriocina, estas foram pré-cultivadas em meio BHI ou meio TSB a 37°C por 18 a 20 horas. As culturas a seguir foram semeadas através de multi-alça (17 alças) em placas de Petri contendo meio TSA. Estas placas foram incubadas a 37°C por 18 a 20 horas.

Após este período, as placas foram invertidas, e nas tampas das mesmas foi adicionado 3,0 ml de clorofórmio e estas foram mantidas com o mesmo por aproximadamente 30 minutos, resultando em morte das bactérias e decorrido este período, as placas foram mantidas entreabertas em incubadora a 37°C ou aproximadamente 60 minutos para que todo o clorofórmio residual evaporasse.

Em cada uma das placas foram inoculados, 0,1ml da amostra indicadora de *E. coli* 22 R 80 (linhagem padrão colicina sensível) que tinha sido cultivada previamente em meio BHI líquido por 18 a 20 horas a 37°C para verificar se pelo menos uma amostra apresentava sensibilidade a algum tipo de bacteriocina. Estas placas foram incubadas a 37°C por 18 a 20 horas e a produção de bacteriocina visualizada pela presença de halo de inibição de crescimento da bactéria indicadora.

3.3.5.1. Caracterização do tipo de bacteriocina produzida

Para caracterizar tipo de bacteriocina produzida pelas amostras, estas foram cultivadas em meio BHI líquido por 18 a 20 horas a 37°C e em seguida com o auxílio de uma multi-alça de platina (4 alças) foram semeadas em placas contendo meio TSA sólido. Estas placas foram deixadas a temperatura ambiente por 3 horas e em seguida incubadas a 37°C por mais 15 horas. Após este período, as colônias foram mortas com o vapor de clorofórmio de acordo com o descrito no item 3.3.5.

Foram utilizadas 9 diferentes tipos de amostras indicadoras de bacteriocina, amostras estas existentes no Departamento de Microbiologia da UNICAMP, pré - cultivadas por 18 a 20 horas a 37°C em meio BHI líquido objetivando visualizar se havia sensibilidade a um determinado tipo de bacteriocina (Tabela 2).

3.3.6. Manutenção das linhagens bacterianas

Todas as amostras bacterianas eram mantidas em tubo de rosca contendo a solução estoque acrescido de glicerol à temperatura de -20°C. As subculturas eram feitas transferindo-se pequena porção de cultura estoque para tubos contendo 3 ml do meio TSB líquido.

Tabela 2. Amostras de *E. coli* indicadoras de colicina.

Amostra indicadora		Colicinas							
		B	Ei	E2	E3	Ia	Ib	K	V
22 R 80	K-12 RCW *	S	S	S	S	S	S	S	S
20 R 996	K-12 ROW-B	R	S	S	S	S	S	S	S
20 R 675	K-12 col E1	S	R	S	S	S	S	S	S
20 R 676	K-12 Col E2	S	S	R	S	S	S	S	S
22 R 71	K-12 Col I	S	S	S	S	R	R	S	R
22 R 82	K-12 Col Ia	S	S	S	S	R	S	S	S
22 R 83	K-12 Col Ib	S	S	S	S	S	R	S	S
20 R 914	K-12 ROW-K	S	S	S	S	S	S	R	S
20 R 915	K-12 V	R	S	S	S	S	S	S	R

* Linhagem padrão colicina sensível

S - sensível; R - resistente.

3.3.7. Determinação do nível de resistência a antibióticos

As drogas empregadas na presente pesquisa foram de procedência Sigma. As soluções dos antibióticos empregados foram preparados no dia de uso e continha 10.000 μ l por ml. As drogas foram dissolvidas de acordo com Index Merck (Tabela 3), imediatamente antes de serem diluídas para que as concentrações finais fossem obtidas.

Tabela 3. Drogas ensaiadas (com as respectivas abreviações) na determinação do nível de resistência das amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes suínas na região de Pirassununga.

Drogas *	Abreviação	Dissolução **
Tetraciclina	TC	álcool metílico 1.10 em água esterilizada
Estreptomicina	SM	água destilada esterilizada
Ampicilina	AP	água destilada esterilizada
Canamicina	KM	água destilada esterilizada

* Todas as drogas utilizadas foram de procedência Sigma

** De acordo com Index Merck

As drogas foram testadas em meio sólido, e o meio de cultura empregado (TSA) foi fundido e mantido a 60°C e a droga adicionada foi homogeneizada na placa com auxílio de movimentos circulares lentos (em forma de oito).

Estas placas antes de serem utilizadas foram mantidas a 37°C, por 6 horas com finalidade de ocorrer a difusão da droga no meio.

As concentrações utilizadas de cada droga e as quantidades dos componentes empregados na obtenção das diferentes concentrações estão sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidade e diluições apropriadas das drogas a partir de solução de 10.000 µg/ml resultando nas concentrações finais desejadas.

Quantidade da solução adicionada	Diluição da solução da droga	Concentração final da droga/placa (µg/ml)
0,1 ml	10^{-2}	1
0,2 ml	10^{-2}	2
0,5 ml	10^{-2}	5
1,0 ml	10^{-2}	10
0,2 ml	10^{-1}	20
0,5 ml	10^{-1}	50
0,1 ml	10^{-1}	100
0,2 ml	S/D	200
0,5 ml	S/D	500
0,1 ml	S/D	1000

Em tubos contendo BHI foram semeadas amostras individuais de *E. coli*, e as mesmas crescidas por 18 a 20 horas a 37°C; após este período, com o auxílio de multi-alça as mesmas foram semeadas em meio TSA contendo antibiótico em diferentes concentrações.

O nível de resistência de cada amostra para cada droga, foi determinado pela maior concentração da droga na qual a amostra bacteriana ainda apresentasse crescimento.

Após o período de incubação de 24 horas, procedeu-se a observação do crescimento das amostras. Na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e nível de resistência das linhagens, utilizou-se o seguinte critério: quando não havia o seu crescimento impedido, por exemplo, para uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, esta era considerada a CMI para essa linhagem, enquanto que, seu nível de resistência seria a concentração imediatamente inferior, ou seja, 5 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.8. Eletroforese em gel de agarose

3.3.8.1. Preparo da placa de gel de agarose

A agarose usada foi de procedência SIGMA tipo II, na concentração de 0,6% em tampão TEB. Foi fundida em um forno de micro-ondas e vertida com todo o cuidado para evitar formação de bolhas de ar, em uma placa de vidro em posição horizontal.

Numa das extremidades foi colocado um espaçador de acrílico contendo 12 dentes, medindo (14,2 x 1,5 x 0,6 cm) e preso com o auxílio de garra especial. A agarose a 45°C era então vertida na placa de vidro com vedação lateral a uma distância de 1,5 mm acima da placa de vidro. O conjunto era mantido à temperatura ambiente e após solidificação do gel de agarose, o pente era retirado cuidadosamente e a placa de vidro colocada em uma cuba de acrílico preenchida com tampão TEB para realização da eletroforese horizontal.

3.3.8.2. Aplicação das amostras e condições de corrida

Antes da aplicação das amostras nas canaletas do gel de agarose, este foi submetido, por um período de 30 minutos, a uma corrente de 20-30 mA para que houvesse migração de íons ou para detectar a presença de partículas que porventura estivessem presentes no mesmo.

As amostras eram aplicadas nas canaletas do gel 50 µl de cada amostra ressuspendidas em tampão com o auxílio de uma micropipeta.

Inicialmente a mistura era submetida a uma corrente elétrica de 10 mA por cerca de 15 minutos, até que todo o corante saísse da canaleta e penetrasse no gel, e em seguida a corrente era levada para 50 mA por aproximadamente 2 horas ou até que o corante atingisse a solução tampão contida na parte inferior da cuba. Posteriormente, o gel foi retirado cuidadosamente da cuba de eletroforese e era corado com uma solução de brometo de etídio preparado em água destilada (concentração final de 0,4 µg/ml) por um período de 30 a 45 minutos).

A visualização das bandas de DNA foi obtida com o transiluminador de luz ultravioleta, e as fotografias realizadas com o tempo de exposição de 1 segundo e o filme utilizado foi Panatomic X 32 ASA com filtro vermelho.

3.3.8.3. Análise eletroforética em gel de agarose para detectar a ocorrência de plasmídios

Foi utilizado o método descrito por BIRBOIM & DOLY (1970), modificado para a visualização dos plasmídios existentes nas amostras de *E. coli* coletadas de fezes de suínos.

As amostras testadas foram cultivadas em 20ml de meio BHI por 18 a 20 horas (37°C) e daí foram transferidos para tubos Eppendorff, em seguida centrifugados a 12.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante desprezado.

Os sedimentos obtidos foram ressuspensos com o auxílio de uma micropipeta em 100 µl da solução I (item 3.2.20) e mantidos em banho-de-gelo picado por 30 minutos, em seguida adicionou-se através das paredes dos tubos 200 µl da solução II sobre esta solução. Misturando-se estas soluções através da inversão e realizadas o mais lentamente possível (cerca de 7 vezes), colocando-se os mesmos de novo no banho-de-gelo no máximo por 5 minutos.

Decorrido este período, foi adicionado aos tubos 150 µl da solução III, os quais foram novamente agitados e invertidos lentamente e após colocação em banho-de-gelo por 90 minutos.

A seguir os tubos foram centrifugados (12.000 rpm por 5 minutos), e 400 µl dos sobrenadantes transferidos para outros tubos previamente resfriados em gelo e o sedimento desprezado.

Os tubos que continham os sobrenadantes foram adicionados 2,5 volumes de etanol P.A. (-20°C) estes foram homogenizados e mantidos a -20°C por 2 horas. Após este período foram centrifugados (12.000 rpm) por 5 minutos, os sobrenadantes desprezados e o sedimento resultante ressuspensionado em 10 µl de solução.

3.3.9. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios bacterianos

Os pesos moleculares dos plasmídios bacterianos foram estimados com base na mobilidade eletroforética, em comparação com a migração de plasmídios com pesos moleculares conhecidos.

O método utilizado foi o de MEYERS et alii (1976) que tem por base a relação inversa entre a migração e o peso molecular dos plasmídios, sendo utilizado plasmídios de peso molecular conhecido determinando-se portanto o logaritmo da migração e o logaritmo do peso molecular dos plasmídios referências.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Os resultados referentes ao isolamento e atividade bioquímica das 143 amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas diarrêicas e não diarrêicas, onde colônias fermentadoras de lactose foram submetidas a provas bioquímicas. O resultado bioquímico das amostras estão apresentados no Apêndice. Todas as amostras testadas fermentaram a lisina. A arginina e a ornitina foram descarboxiladas por 94,4% e 91,6% das amostras. Nenhuma das amostras testadas fermentou sacarose ou dulcitol (Tabelas 5 e 6, respectivamente).

4.2. PESQUISA DA ENTEROTOXINA STa

Na Tabela 7, encontram-se os resultados do teste do camundongo recém-nascido (CRN) para a detecção de enterotoxina STa. Quando uma das amostras apresentava relação PI/PC (Peso intestino/Peso carcaça) superior a 0,07, este resultado foi considerado como sendo suspeito. Foram observa-

Tabela 5. Distribuição de *E. coli* nas amostras diarreicas e não diarreicas mostrando: fermentação de açúcar e aminoácidos, bem como descarboxilação das mesmas.

Tipos e número de amostras estudadas	Substrato*						
	LAC	LIS	ARG	ORN	SAC	DULC	
	+	-	+	-	+	-	+
Fezes diarreicas (5)	4	1	5	0	4	1	5
Fezes não diarreicas (138)	126	12	138	0	131	7	126
Total (143)	130	13	143	0	135	8	131
							12
							0
							143
							0
							143

*LAC = lactose; LIS = lisina; ARG = arginina; ORG = ornitina; SAC = sacarose; DULC = dulcitol.

Tabela 6. Resultados das provas bioquímicas, incluindo fermentação de carboidratos e descarboxilação de alguns aminoácidos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de suínos.

Provas	Nº positivos/total		Nº negativos/total	
	Nº Linhagens	%	Nº Linhagens	%
Indol	143	100	0	0
V.M.	143	100	0	0
V.P.	0	0	143	100
Citrato Simmonds	0	0	143	100
H ₂ S	0	0	143	100
Urease	0	0	143	100
F.A.	0	0	143	100
Motilidade	126	88,11	17	11,89
Glicose (gás)	143	100	0	0
Lactose	143	90,9	13	9,1
Lisina	143	100	0	0
Arginina	135	94,4	8	5,59
Ornitina	131	91,6	12	8,40
Sacarose	0	0	143	100
Dulcitol	143	100	0	0

dos, que das 143 amostras, somente uma produziu enterotoxina detectável por este método, sendo que esta amostra era procedente de fezes não diarréica. Duas linhagens isoladas de fezes não diarréicas apresentaram $PI/PC > 0,07$, e segundo a metodologia de DEAN et alii (1973), estas podem ser consideradas como sendo linhagens suspeitas.

Tabela 7. Resultados dos testes em camundongos recém-nascidos realizados em sobrenadantes de amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas normais e diarréicas.

Animais estudados	$PI/PC^{**} \geq 0,09$		$0,07 \leq PI/PC \leq 0,09$	
	Nº casos	%	Nº casos	%
Diarréicos (5)*	0	0	0	0
Normais (138)*	1	0,72	2	1,44
Total (143)*	1	0,69	2	1,39

* Nº de casos

**Relação entre o peso dos intestinos e o peso da carcaça.

4.3. PESQUISA DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL (LT)

A enterotoxina LT foi pesquisada pelo teste da imunohemólise radial (IHR). Foi constatado que das 143 amostras estudadas, 15 (10,48%) produziram esta enterotoxina e destas 3 amostras (2,17%) eram procedentes de fezes diarrêicas. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Distribuição de enterotoxinas LT procedentes de amostras de fezes diarrêicas e não diarrêicas em leitões neonatos.

Amostras	LT ⁺ (a)	Total examinado (b)	% de amostras positivas (c)
Diarrêicas	3	5	60
Não diarrêicas	12	138	8,69
Total	15	143	10,48 (d)

(a) Número de amostras produtoras de enterotoxina LT.

(b) Total de amostras examinadas dentro de cada tipo de amostra (diarrêica ou não diarrêica).

(c) Porcentagem de amostras examinadas em relação ao total de cada tipo de amostra

(d) Porcentagem total de amostras independente do tipo testado.

4.3.1. Distribuição da produção das enterotoxinas

LT e STa nas amostras de fezes de suínos

No presente estudo ocorreram amostras capazes de produzir ST, mas nãoLT, e vice versa, sendo que linhagens não foram encontradas produzindo as duas conjuntamente. Foi constatado que amostras de fezes diarrêicas apresentaram habilidade para produção de enterotoxina LT, mas não para enterotoxina STa. As amostras de fezes não diarrêicas apresentavam capacidade individual na produção de enterotoxinas STa e LT. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Distribuição de LT e STa nas diferentes amostras de fezes suínas.

Animais estudados	LT ⁺	%	ST ⁺	%	Total amostras positivas
Diarrêicos (5)	3	60	0	0	03
Normais (138)	12	8,69	1	0,72	13
Total (143)	15 (a)	10,48	1 (b)	0,69	16 (c)

(a) Número de amostras produtoras da enterotoxina LT em relação ao número total de amostras examinadas.

(b) Número e amostras produtoras da enterotoxina ST em relação ao número total de amostras examinadas.

(c) Total de amostras (LT e ST) que apresentaram o seguinte perfil: LT⁺, ST⁻ ou LT⁻, ST⁺.

4.4. FATORES HEMAGLUTINANTES

Os resultados do teste de hemaglutinação com hemácias, carneiro, cavalo, cobaio e humano na presença de D-manose em amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas diarrêicas e não diarrêicas, cultivadas nos meios de Minca e nutriente glicosado, nenhuma amostra apresentou capacidade hemaglutinante, independente dos meios de cultivo utilizados e da espécie doadora das hemácias.

4.5. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA E CARACTERIZAÇÃO DA MESMA .

Verificou-se que das 102 amostras estudadas de *E. coli* de suínos, 27, ou seja (26,4%) era produtora de bacteriocinas, sendo estas caracterizadas por intermédio de amostras indicadoras descritas no item 3.3.7, (Tabela 2) como colicinas tipos E₁, E₃, I_a, I_b; K e V. Os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11 indicam o número de bactérias produtoras de colicina, sua porcentagem em fezes diarrêicas e não diarrêicas e sua tipificação. A Figura 1 demonstra os halos de inibição produzido nas bactérias sensíveis a colicinas.

Tabela 10. Capacidade das diferentes amostras de *E. coli* provenientes de fezes suínas produzirem colicina.

Tipos de fezes suínas	Col ⁺ a		Col ⁻ b	
	Nº	%	Nº	%
Diarrêicas (5)	04	80	01	20
Normais (102)	23	22,54	79	77,46
Total (107)	27	26,47	80	73,53

(a) Col⁺ = amostra produtora de colicina

(b) Col⁻ = amostra não produtora de colicina.

Tabela 11. Distribuição dos vários tipos de bacteriocinas produzido pelas diferentes amostras de *E. coli* provenientes de fezes suínas.

Modelo de produção de bacteriocina	Amostra diarréica Nº	Amostra não diarréica Nº	Total de amostras produtoras
Col V, K, I _A , I _B	1	0	1
Col E ₁ , E ₂ , E ₃ , I _a , I _b , k	0	3	3
Col V, E ₁	0	2	2
Col V, E ₂	2	4	6
Col V	1	7	8
Col E ₃	0	2	2
Col E ₁	0	3	3
Col K	0	2	2

Nº - número de amostras produtoras de bacteriocinas e sua classificação.

Figura 1. Determinação da capacidade de produção de bacteriocina de amostras de *E. coli* de origem suína. A seta indica a região de inibição do crescimento da amostra sensível.

4.6. DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DAS AMOSTRAS DE *E. coli* ISOLADAS DE FEZES SUÍNAS

Os resultados do teste de determinação do nível de resistência às drogas das amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas de acordo com o método de diluição em tubos, descritos no item 3.3.8, estão apresentados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15. Estes resultados estão relacionados a níveis de resistência a tetraciclina, estreptomicina, ampicilina e canamicina e dizem respeito a concentrações utilizadas.

Tabela 12. Nível de resistência às concentrações de tetraciclina de 100 amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Número de amostras resistentes	%
1	8	8,0
2	17	17,0
5	11	11,0
10	7	7,0
20	1	1,0
50	1	1,0
100	5	5,0
200	15	15,0
500	28	28,0
1000	7	7,0
Total	100	100,0

Tabela 13. Nível de resistência às concentrações de estreptomicina de 100 amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Nº de amostras resistentes	%
1	1	1,0
2	2	2,0
5	6	6,0
10	13	13,0
20	24	24,0
50	6	6,0
100	10	10,0
200	12	12,0
500	15	15,0
1000	11	11,0
Total	100	100,0

Tabela 14. Nível de resistência às concentrações de ampicilina de 100 amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas.

Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)	Nº de amostras resistentes	%
1	27	27,0
2	33	33,0
5	20	20,0
10	5	5,0
20	2	2,0
50	1	1,0
100	3	3,0
200	1	1,0
500	5	5,0
1000	3	3,0
Total	100	100,0

Tabela 15. Nível de resistência às concentrações de canamicina de 100 amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Nº de amostras resistentes	%
1	2	2,0
2	5	5,0
5	3	3,0
10	24	24,0
20	19	19,0
50	24	24,0
100	7	7,0
200	2	2,0
500	1	1,0
1000	13	13,0
Total	100	100,0

Os resultados do teste de sensibilidade e resistência às drogas apresentados pelas diferentes amostras de *E. coli* são mostradas nas Figuras 2, 3, 4 e 5 de acordo com as curvas bimodais, considerando-se como resistentes as amostras que cresceram em 100 μg ou mais para a tetraciclina, estreptomicina e ampicilina e 1000 $\mu\text{g/ml}$ para a canamicina. A Figura 6 demonstra a concentração inibitória mínima produzida pelas bactérias sensíveis ao antibiótico canamicina.

TETRACICLINA

Figura 2. Curva bimodal para o antibiótico tetraciclina, considerando-se como resistentes as amostras que cresceram com 100 µg/ml ou mais.

ESTREPTOMICINA

Figura 3. Curva bimodal para o antibiótico estreptomicina, considerando-se como resistentes as amostras que cresceram em 100 µg/ml ou mais.

AMPICILINA

Figura 4. Curva bimodal para o antibiótico ampicilina, considerando-se como resistentes as amostras que cresceram em 100 µg/ml ou mais.

CANAMICINA

Figura 5. Curva bimodal para o antibiótico canamicina, considerando-se como resistentes as amostras que cresceram em 1000 µg/ml.

Figura 6. Determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de amostras de *E. coli* de origem suína. A seta indica a região de inibição do crescimento da amostra sensível para as concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ do antibiótico canamicina.

4.6.1. Características apresentadas pelas diferentes amostras de *E. coli* isoladas de suínos

Os perfis estudados de todas as amostras de fezes de suínos, diarréicas e não diarréicas, encontram-se apresentados na Tabela 16.

4.7. OCORRÊNCIA DE PLASMÍDIOS EM AMOSTRAS DE *E. coli* EXTRAÍDAS DE FEZES SUÍNAS

As Figuras 7 a 15, indicam os resultados dos testes eletroforéticos em gel de agarose, para detecção dos diferentes plasmídios presentes em cada amostra.

4.8. ESTIMATIVA DOS PESOS MOLECULARES DOS PLASMÍDIOS DAS AMOSTRAS DE *E. coli* SUÍNA

O número de plasmídios em cada linhagem e suas respectivas migrações, que permitiu calcular seus pesos moleculares, encontram-se na Tabela 17.

Através da corrida eletroforética, os plasmídios de diferentes pesos moleculares podem ser separados numa relação logarítmica inversa ao seu peso molecular em relação à migração relativa dos mesmos.

Tabela 16 : Características de nível de resistência apresentadas pelas diferentes amostras de *E. coli* estudadas.

Amostras	Níveis de resistência (µg/ml)				ST	LT	Lac	Col
	TC	SM	Ap	KM				
Diarréicas								
1	500	1000	2	1000	-	+	-	+
2	500	200	100	20	-	+	+	-
3	10	1	200	5	-	+	+	+
4	5	100	2	20	-	+	+	+
5	0	50	50	2	-	-	+	+
Não diarréicas								
6	500	10	1	50	-	+	+	-
7	1000	1000	500	1000	-	+	+	-
8	500	500	1	20	-	+	+	-
9	5	20	2	20	-	+	+	+
10	1	1000	1	50	-	+	+	+
11	1	500	50	2	-	+	+	+
12	500	500	1	20	-	+	+	-
13	2	20	1	10	-	+	+	-
14	500	50	1	20	-	+	+	+
15	2	10	2	100	-	+	+	+
16	1	1000	1	20	-	+	+	-
17	1	200	1	20	-	+	+	+
18*	1	200	2	20	+	-	+	-
19*	2	50	2	10	+	-	+	-
20**	500	500	1	20	+	-	+	-
21	100	200	2	1	-	-	+	+
22	2	10	1	2	-	-	+	+

Cont.

* amostras consideradas suspeitas na produção da enterotoxina ST_a .

** amostra considerada produtora da enterotoxina ST_a .

Tabela 16. Continuação.

Amostras	Níveis de resistência (µg/ml)				ST	LT	Lac	Col
	TC	SM	Ap	KM				
Não diarreicas								
23	500	500	500	10	-	-	+	-
24	200	1000	1	20	-	-	+	-
25	1	50	< 1	20	-	-	-	-
26	5	20	< 1	2	-	-	+	-
27	500	50	2	20	-	-	+	-
28	< 1	10	< 1	2	-	-	+	-
29	200	200	1	1000	-	-	+	-
30	2	20	1	20	-	-	+	-
31	500	100	2	100	-	-	+	-
32	500	500	2	1000	-	-	+	-
33	1	10	2	50	-	-	-	-
34	2	20	5	50	-	-	+	-
35	2	5	2	20	-	-	+	-
36	2	500	2	1000	-	-	+	-
37	500	200	20	100	-	-	+	-
38	500	500	2	100	-	-	+	-
39	2	20	2	20	-	-	-	-
40	200	200	2	20	-	-	+	-
41	1000	100	2	50	-	-	+	-
42	2	20	2	50	-	-	+	-
43	1000	500	5	100	-	-	+	-
44	10	50	2	100	-	-	+	-
45	500	200	2	20	-	-	-	-
46	100	500	200	50	-	-	-	+

Cont.

Tabela 16. Continuação.

Amostras	Níveis de resistência (µg/ml)				ST	LT	Lac	Col
	TC	SM	Ap	KM				
Não diarreicas								
47	50	2	50	2	-	-	+	+
48	10	500	20	50	-	-	+	+
49	100	10	500	100	-	-	-	+
50	200	20	1	10	-	-	+	+
51	2	5	2	1	-	-	+	+
52	500	500	500	1000	-	-	+	+
53	500	20	2	20	-	-	+	+
54	500	500	1	20	-	-	-	+
55	500	50	1	20	-	-	+	+
56	2	200	50	100	-	-	+	+
57	100	1000	10	5	-	-	+	+
58	20	10	2	20	-	-	+	+
59	2	1	5	50	-	-	+	+
60	5	50	5	50	-	-	+	+
61	500	200	50	20	-	-	+	-
62	500	500	1	20	-	-	+	-
63	0	20	1	10	-	-	+	-
64	200	1000	50	10	-	-	+	-
65	1	20	1	10	-	-	+	-
66	100	10	20	10	-	-	+	-
67	1	20	1	10	-	-	-	-
68	500	500	2	1000	-	-	+	-
69	1000	200	2	50	-	-	+	-
70	10	50	2	100	-	-	+	-

Cont.

Tabela 16. Continuação.

Amostras	Níveis de resistência (µg/ml)				ST	LT	Lac	Col
	TC	SM	Ap	KM				
Não diarreicas								
71	200	20	1000	50	-	-	+	-
72	5	500	2	50	-	-	+	-
73	500	20	10	50	-	-	+	-
74	1	500	10	50	-	-	+	-
75	1000	200	1	50	-	-	+	-
76	1	50	2	10	-	-	+	-
77	1	500	1	5	-	-	+	-
78	2	2	1	50	-	-	+	-
79	200	20	1	20	-	-	+	-
80	10	20	1	20	-	-	+	-
81	5	1000	1	1000	-	-	-	-
82	1	500	1	5	-	-	-	-
83	2	100	10	10	-	-	+	-
84	5	5	2	20	-	-	+	-
85	200	200	1	50	-	-	+	-
86	1	200	2	1000	-	-	+	-
87	5	50	100	50	-	-	-	-
88	1	10	1	5	-	-	+	-
89	10	10	1	20	-	-	-	-
90	2	100	10	50	-	-	+	-
91	100	200	1000	20	-	-	+	-

Cont.

Tabela 16. Continuação.

Amostras	Níveis de resistência (µg/ml)				ST	LT	Lac	Col
	TC	SM	Ap	KM				
Não diarreicas								
92	200	10	2	100	-	-	+	-
93	100	500	5	20	-	-	+	-
94	500	20	2	50	-	-	+	-
95	5	10	1	2	-	-	+	-
96	200	100	50	10	-	-	+	-
97	50	2	20	2	-	-	-	-
98	10	1000	100	500	-	-	+	-
99	20	200	20	50	-	-	+	-
100	1000	5	50	100	-	-	+	-

LEGENDA: TC - Tetraciclina

SM - Estreptomicina

Ap - Ampicilina

KM - Canamicina

ST - Enterotoxina termo estável (STa)

LT - Enterotoxina termo lábil (LT)

Lac - lactose

Bac - produção de bactericina

+ - resposta positiva

- - resposta negativa

< - menor

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

- Canaleta 1. amostra 58
- Canaleta 2. amostra 17
- Canaleta 3. amostra 29
- Canaleta 4. amostra 50
- Canaleta 5. amostra 42
- Canaleta 6. amostra 43
- Canaleta 7. plasmídios referências p307, pSA, RP₄, pBR322
- Canaleta 8. amostra 6
- Canaleta 9. amostra 30
- Canaleta 10. amostra 10
- Canaleta 11. amostra 38
- Canaleta 12. amostra 78

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

- Canaleta 1. amostra 11
- Canaleta 2. amostra 37
- Canaleta 3. amostra 21
- Canaleta 4. amostra 99
- Canaleta 5. amostra 75
- Canaleta 6. amostra 4
- Canaleta 7. plasmídios referências p307, pSA, RP₄, pBR322
- Canaleta 8. amostra 15
- Canaleta 9. amostra 84
- Canaleta 10. amostra 91
- Canaleta 11. amostra 20
- Canaleta 12. amostra 25.

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

- Canaleta 1. amostra 14
- Canaleta 2. amostra 35
- Canaleta 3. amostra 33
- Canaleta 4. amostra 22
- Canaleta 5. amostra 63
- Canaleta 6. amostra 71
- Canaleta 7. plasmídios referências p307, pSA, RP₄, pBR322
- Canaleta 8. amostra 5
- Canaleta 9. amostra 76
- Canaleta 10. amostra 80
- Canaleta 11. amostra 79
- Canaleta 12. amostra 64.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

Canaleta 1. amostra 3

Canaleta 2. amostra 12

Canaleta 3. amostra 67

Canaleta 4. amostra 96

Canaleta 5. amostra 16

Canaleta 6. plasmídios referências p307, pSA, RP₄, pBR322

Canaleta 7. amostra 27

Canaleta 8. amostra 19

Canaleta 9. amostra 7

Canaleta 10. amostra 18

Canaleta 11. amostra 55

Canaleta 12. amostra 56.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

- Canaleta 1. amostra 62
- Canaleta 2. amostra 32
- Canaleta 3. amostra 34
- Canaleta 4. amostra 45
- Canaleta 5. amostra 66
- Canaleta 6. plasmídios referências p307, pSA, RP₄, pBR322
- Canaleta 7. amostra 28
- Canaleta 8. amostra 59
- Canaleta 9. amostra 49
- Canaleta 10. amostra 70
- Canaleta 11. amostra 13
- Canaleta 12. amostra 57.

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

- Canaleta 1. amostra 2
- Canaleta 2. amostra 94
- Canaleta 3. amostra 48
- Canaleta 4. amostra 100
- Canaleta 5. amostra 65
- Canaleta 6. amostra 39
- Canaleta 7. plasmídios referências p307, pSA, RP₄, pBR322
- Canaleta 8. amostra 60
- Canaleta 9. amostra 52
- Canaleta 10. amostra 44
- Canaleta 11. amostra 46
- Canaleta 12. amostra 31.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

- Canaleta 1. amostra 98
- Canaleta 2. amostra 36
- Canaleta 3. amostra 97
- Canaleta 4. amostra 1
- Canaleta 5. amostra 8
- Canaleta 6. amostra 90
- Canaleta 7. plasmídios referências p307, pSA, RP₄, pBR322
- Canaleta 8. amostra 89
- Canaleta 9. amostra 9
- Canaleta 10. amostra 41
- Canaleta 11. amostra 93
- Canaleta 12. amostra 23

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

Canaleta	1. amostra 61
Canaleta	2. amostra 77
Canaleta	3. amostra 68
Canaleta	4. amostra 69
Canaleta	5. amostra 72
Canaleta	6. amostra 53
Canaleta	7. plasmídios referências p307, pSA, RP ₄ , pBR322
Canaleta	8. amostra 54
Canaleta	9. amostra 24
Canaleta	10. amostra 40
Canaleta	11. amostra 50
Canaleta	12. amostra 86.

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose das amostras de *Escherichia coli*

- Canaleta 1. amostra 25
- Canaleta 2. amostra 47
- Canaleta 3. amostra 85
- Canaleta 4. amostra 81
- Canaleta 5. amostra 26
- Canaleta 6. amostra 92
- Canaleta 7. plasmídios referências p307, pSA, RP₄, pBR322
- Canaleta 8. amostra 51
- Canaleta 9. amostra 58
- Canaleta 10. amostra 73
- Canaleta 11. amostra 87
- Canaleta 12. amostra 82

Tabela 17. Designações e estimativas dos pesos moleculares dos plasmídios visualizados nas amostras de *Escherichia coli* suína.

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular ($\times 10^6$ D)
58	pMFWS ₅₈ a	61,47
		58,45
		54,59
		22,04
		20,52
17	pMFWS ₁₇ a	60,94
		54,59
		46,04
		39,94
		27,32
		23,61
		21,68
		18,94
		18,30
29	pMFWS ₂₉ a	60,94
		54,59
		46,04
		39,94
		27,32
		23,61
		21,68
		18,94
		18,30
50	pMFWS ₅₀ a	20,84

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídeos/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
42	pMFWS ₄₂	a
		b
		c
		d
		e
		f
43	pMFWS ₄₃	57,29
		46,04
		27,32
6	pMFWS ₆	23,19
		21,33
		19,34
43	pMFWS ₄₃	a
		b
		43,53
		38,07
		36,38
6	pMFWS ₆	a
		b
		c
		d
30	pMFWS ₃₀	52,14
		48,73
		22,41
		17,94
		16,54
10	pMFWS ₁₀	a
		b
		c
		d
		e
38	pMFWS ₃₈	f
		g
		49,93
		27,32
		21,16
78	pMFWS ₇₈	40,60
10	pMFWS ₁₀	a
		b
		c
		d
		e
38	pMFWS ₃₈	f
		g
		49,92
		35,85
		20,83
78	pMFWS ₇₈	18,55
		16,74
		22,99
		40,60
38	pMFWS ₃₈	a
		b
		c
		d
		e
78	pMFWS ₇₈	a
		b
		c
		d
		e
10	pMFWS ₁₀	17,16
		40,60
		55,90
		51,01
		47,90
78	pMFWS ₇₈	a
		b
		c
		d
		e
38	pMFWS ₃₈	30,23

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
11	pMFWS ₁₁ a b c d e f	50,21 32,07 15,20 14,72 13,84 12,58
37	pMFWS ₃₇ a	14,62
21	pMFWS ₂₁ a b	41,87 12,80
99	ausência de plasmídio	
75	pMFWS ₇₅ a b	41,82 36,02
4	pMFWS ₄ a b c d e	56,31 33,00 16,28 15,20 12,92
15	pMFWS ₁₅ a b c d	65,00 56,31 34,23 17,96
84	pMFWS ₈₄ a b c	49,88 37,41 15,75
91	pMFWS ₉₁ a b b	51,60 50,90 15,12
20	pMFWS ₂₀ a	14,84
25	pMFWS ₂₅ a b c	53,07 33,56 15,20

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
14	pMFWS ₁₄ a	75,61
	b	65,30
	c	62,76
	d	45,39
	e	41,45
	f	31,20
	g	24,42
	h	23,40
	i	19,81
	j	16,86
35	pMFWS ₃₅ a	41,45
33	pMFWS ₃₃ a	41,62
22	pMFWS ₂₂ a	40,94
	b	19,56
	c	16,58
63	pMFWS ₆₃ a	43,42
	b	40,94
	c	16,33
	d	15,64
71	pMFWS ₇₁ a	58,60
	b	41,62
	c	38,30
5	pMFWS ₅ a	58,60
	b	51,78
	c	37,46
	d	25,86
	e	23,55
	f	22,41
	g	20,14
	h	18,87
	i	16,45
	j	16,19

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídeo/designação	Peso molecular ($\times 10^6$ D)
76	pMFWS ₇₆	a
		b
		c
		d
		e
		f
		g
80	pMFWS ₈₀	a
		b
		c
		d
79	pMFWS ₇₉	a
		b
64	pMFWS ₆₄	a
		b
		c
		d
		e
		f

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
3	pMDWS ₃ a b c d	41,24 18,17 17,44 16,17
12	pMFWS ₁₂ a	41,52
67	pMFWS ₆₇ a b c d	66,81 60,19 41,10 36,80
96	pMFWS ₉₆ a b c d e f	67,20 52,85 47,96 40,97 19,04 18,50
16	pMFWS ₂₇ a b c	44,25 37,24 35,33
27	pMFWS ₂₇ a b c d e	39,76 19,40 18,75 18,21 15,56
19	pMFWS ₁₉ a b c	63,14 31,60 20,37
7	pMFWS ₇ a	31,04
18	pMFWS ₁₈ a b	47,01 28,86
55	pMFWS ₅₅ a b	59,88 30,60
56	pMFWS ₅₆ a b	66,04 29,88

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídeos/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
62	pMFWS ₆₂	a
		b
		c
32	pMFWS ₃₂	a
		b
		c
		d
34	pMFWS ₃₄	a
		b
		c
		d
		e
		f
		g
45	pMFWS ₄₅	a
		b
		c
		d
66	pMFWS ₆₆	a
		b
		c
		d
28	pMFWS ₂₈	a
		b
		c
		d
		e
59	pMFWS ₅₉	a
		b
		c
		d
		e

Cont.

Tabela 17.Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
49	pMFWS ₁₈	a
		b
		c
		d
70	pMFWS ₇₀	a
		b
		c
		d
		e
		f
		g
13	pMFWS ₁₃	a
		b
		c
		d
		e
57	pMFWS ₅₇	a
		b
		c
		d

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designações	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
2	pMFWS ₂	37,90
94	pMFWS ₉₄	a 36,83
		b 15,47
		c 14,64
48	pMFWS ₄₈	a 54,00
		b 37,71
		c 14,80
		d 14,01
100	pMFWS ₁₀₀	a 51,36
		b 48,68
		c 14,69
		d 13,77
65	pMFWS ₆₅	a 40,02
		b 34,31
39	pMFWS ₃₉	a 49,65
		b 36,83
		c 16,49
		d 15,67
		e 13,62

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designações	Peso molecular ($\times 10^6$ D)
60	pMFWS ₆₀	a
		b
		c
		d
		e
		f
52	pMFWS ₅₂	a
		b
		c
44	pMFWS ₄₄	a
		b
46	pMFWS ₄₆	a
		b
31	pMFWS ₃₁	a
		b
		c

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
98	pMFWS ₉₈ a	63,95
36	pMFWS ₃₆ a	55,00
97	pMFWS ₉₇ a	45,22
	b	9,76
1	pMFWS ₁ a	47,37
8	pMFWS ₈ a	43,96
90	pMFWS ₉₀ a	69,14
	b	37,96
	c	18,97
	d	13,47
89	pMFWS ₈₉ a	13,88
9	pMFWS ₉ a	33,10
	b	15,74
	c	12,20
41	pMFWS ₄₁ a	75,16
	b	73,25
93	pMFWS ₉₃ a	13,97
23	pMFWS ₂₃ a	87,00
	b	75,15
	c	39,32
	d	43,72
	e	22,37
	f	19,19
	g	19,02
	h	16,20
	i	14,12
	j	14,06
	k	12,76

Cont.

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶)
61	pMFWS ₆₁ a	18,40 37,27 16,67
77	pMFWS ₇₇ a b c	14,40 37,94 16,61
68	pMFWS ₆₈ a b c d	64,28 58,35 53,14 36,62
69	pMFWS ₆₉ a	46,22
72	pMFWS ₇₂ a b c	45,52 34,23 32,14
53	pMFWS ₅₃ a b c	53,00 37,00 27,50
54	pMFWS ₅₄ a b c d	49,45 37,27 31,18 18,57

Cont.

Tabela 17 .Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
54	pMFWS ₅₄ e f g	17,02 15,47 14,79
24	pMFWS ₂₄ a b c d e f g	59,00 54,50 38,64 22,67 19,83 19,03 17,31
40	pMFWS ₄₀ a b c	37,94 24,56 17,61
50	pMFWS ₅₀ a b c d e	54,50 36,62 66,25 31,65 19,64
86	pMFWS ₈₆ a b	54,50 36,00
Cont.		

Tabela 17. Continuação...

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
25	não possui	
47	pMFWS ₄₇ a	51,68
	b	35,76
	c	19,63
	d	19,50
	e	14,31
85	pMFWS ₈₅ a	52,45
	b	35,76
	c	10,09
	d	9,41
81	pMFWS ₈₁ a	50,03
	b	36,03
	c	10,77
	d	10,55
26	pMFWS ₂₈ a	38,27
	b	34,85
92	pMFWS ₉₂ a	55,18
	b	33,57
	c	12,73
	d	12,62
	e	98,28

Cont.

Tabela 17. Continuação.

Amostras portadoras	Plasmídios/designação	Peso molecular (x 10 ⁶ D)
51	pMFWS ₅₁	a
		b
		c
		d
		e
		f
58	pMFWS ₅₈	a
73	pMFWS ₇₃	a
87	pMFWS ₈₇	a
		b
82	pMFWS ₈₂	a

A estimativa dos pesos moleculares foi feita como descrita em 3.3.12 e é apresentada na Figura 16.

Figura 16. Curva obtida através da regressão dos dados de mobilidade eletroforética relativa dos plasmídios padrões (*p307, **RP4, ***pSA, **** pBR322. A mobilidade eletroforética do plasmídio p307 foi adotada arbitrariamente como 1.

5. DISCUSSÃO

A caracterização das amostras de *Escherichia coli* de origem suínas estudadas neste presente trabalho, através do comportamento bioquímico para certas características tais como motilidade e habilidade para fermentar a lactose, mostraram uma pequena variação de 88,11% a 90,9% como mostram as Tabelas 6 e 7. Esta característica dificultou o imediato reconhecimento da *E. coli*, porém, estes resultados estão de acordo com os propostos por EDWARDS & EWING (1972) e FONTES (1982).

As amostras estudadas apresentaram um nível elevado de descarboxilação da arginina (94,4%), ornitina (91,6%) e lisina (100%), tanto nas amostras de *E. coli* diarreicas, quanto nas não diarreicas. Esse dado impossibilitou estabelecer uma correlação entre determinadas características bioquímicas para amostras de *E. coli* suína diarreicas ou não, ao contrário, dos resultados demonstrados por HARRY & CHUBB (1967) e HEMSLEY et alii (1967), os quais estabeleceram uma correlação entre amostras de *E. coli* aviária, procedentes de processos infecciosos com uma elevada atividade descarboxiladora de lisina.

A diarreia causada por *E. coli* no homem, e em suíno e bovino, pelas enterotoxinas termolábil (LT) e termoes_tável (STa) (GYLES, 1971, 1979; SMITH & HALLS, 1967; SMITH & LINGWOOD, 1971), através da utilização do teste do camundongo recém-nascido (DEAN et alii, 1972). Para pesquisar STa, apresentou uma frequência pequena. Apenas uma amostra pertencente ao leitão clinicamente normal foi produtora desta enterotoxina. Este dado é novo, pois o esperado era que amostras procedentes de leitões diarreicos apresentassem produção de enterotoxina STa, à semelhança das achadas de MOON et alii, 1970 e UEDA et alii, 1981. Essa enterotoxina está associada aos processos diarreicos em isolados de *E. coli* de leitões e porcos diarreicos. É importante ressaltar que foram encontradas amostras consideradas suspeitas, porém, estas eram procedentes de amostras não diarreicas (Tabela 8).

A produção de enterotoxina termoes_tável STa por *E. coli* procedente de leitões clinicamente sadios apresenta baixa frequência, pois apenas uma amostra de *E. coli* mostrou capacidade. Contudo, conhecendo-se sua natureza plasmidial e sabendo-se que o gene para a produção de STa é um transposon, o bacteriano Tm 1681 o qual é flanqueado por repetições invertidas ISI (SO et alii, 1979). Este dado sugere que a bactéria portadora deste gene para enterotoxina STa pode difundir este plasmídio através da conjugação, ou transformação bacteriana, criando condições favoráveis para a proliferação deste gene entre animais fenotipicamente normais.

Na presente investigação, a produção da enterotoxina LT, foi encontrada em proporções significativas para amostras de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia, entre as 5 amostras analisadas para leitões com diarreia, 3 eram produtoras de LT. Das 138 amostras analisadas para leitões clinicamente sadios, 12 produziram esta enterotoxina, representando apenas 8,69% do total estudado (Tabela 8). Embora, todas as amostras de colibacilos mantidas "in vitro" fossem semeadas em caldo de infusão cérebro coração (BHI-DIFCO Laboratories), acrescido de 15% de glicerol, conforme recomendado por EVANS (1977) e mantidas a -20°C . Contudo estas amostras foram manuseadas diversas vezes para a realização dos diferentes testes de modo que pode ter gerado instabilidade, no que se refere à manutenção do plasmídeo responsável pela síntese desta enterotoxina, sendo este plasmídeo perdido, podendo ter alterado a produção de LT nas amostras. O fato de amostras não diarreicas produzirem a enterotoxina LT pode ser ocasional, pois o mesmo pode ocorrer para o homem (REIS et alii, 1980). Estes dados coincidem com os relatados por GATTI (1983) ao descrever o encontro de apenas uma amostra LT positiva nos sorogrupos O_{35} e O_{141} de suínos. A alta frequência com que detectamos a enterotoxina LT em amostras diarreicas, pode ser um indício de que esta toxina desempenha em maior ou menor grau um papel importante na etiologia da diarreia em leitões, precisando ser melhor investigada e avaliada.

Não foram observadas produção simultânea de enterotoxinas STa e LT nas amostras estudadas (Tabela 9), indicando a possibilidade dos genes que codificam para a produção destas enterotoxinas estarem em plasmídios diferentes. Não foi constatado a presença em nossos experimentos de hemaglutinação manose resistente nas hemácias de vários animais (cobaia, carneiro, cavalo e humano), quando cultivadas em meios sólidos, como Minca ou nutriente glicosado, conforme descrito em 3.2.10 e 3.2.11. Não foi elucidativa a associação de fenótipos produtores de enterotoxinas ST^+ , LT^- ou ST^- , LT^+ em relação à microhemaglutinação manose resistente (MHMR) para as 143 amostras analisadas. Os dados obtidos são discordantes dos propostos por HIRSH (1985) o qual encontrou todas as amostras enteropatogênicas de *E. coli* envolvidas com a diarreia em animais neonatos, que apresentavam hemaglutinação manose resistente.

Em relação à ausência de hemaglutinação pelas amostras estudadas, não significa que elas não tenham mecanismo de aderência. Elas podem ser portadoras de um antígeno que não apresente atividade hemaglutinante, como no caso do 987P (NAGY et alii, 1977), que não é codificado por plasmídios, tendo provavelmente seu locus gênico no genoma bacteriano. A presença do antígeno 987P vem, geralmente, associada a produção de enterotoxina termoestável (STa) e não à enterotoxina termolábil (LT) (GAASTRA & GRAAF, 1982). A enterotoxina termoestável (STa) apresentou baixa ocorrência, sendo mais

significativa a produção de enterotoxina nas amostras estudadas; o que leva a concluir que as amostras estudadas possam ser possuidoras de um novo fator de aderência que não pode ser detectado pelas técnicas utilizadas e conseqüentemente associado à produção de enterotoxinas ST^+ ou LT^- ou ST^- e LT^+ pelas amostras de *E. coli* dos leitões analisadas.

A capacidade das amostras de *E. coli* suínas produzirem colicinas foram investigadas, e revelaram alguns aspectos interessantes; as amostras diarrêicas que também produzem enterotoxina LT apresentaram produção de colicina, numa proporção alta (80%) (Tabela 10). Estes dados confirmam os descritos por BRANDIS & SMARDA (1971), OZANNE et alii (1977) e DJONE (1985), os quais observaram que todas as *E. coli* produtoras de ST, LT e antígenos de aderência são também produtoras de colicinas.

Os resultados obtidos com relação às amostras não diarrêicas (22,54%), podem ser explicados, pela ação da colicina, que parece conferir à bactéria, a capacidade de sobrevivência no trato digestivo de uma série de animais, indicando ser esta, uma característica não essencial. Entre os sistemas de classificação descritos (FREDERICQ, 1964), em função de seu espectro de atividade, a semelhança do que tem sido relatado por vários autores (GYLES, 1971; SARMANOVA & SALAJKA, 1971; QUACKENBUSH & FALKOW, 1979; DAVIES et alii, 1981), a produção de colicina tipo V foi comum nas amostras

de *E. coli* diarrêicas, pois as quatro amostras produtoras de colicina eram tipo V, além de pertencerem simultaneamente a outros tipos. Coincidentemente, as amostras não produtoras de diarrêia, mas produtoras de colicina, tiveram o tipo V como predominante (Tabela 11).

Os resultados obtidos, evidenciam que a ocorrência de colicinas tipo V foi predominante nas amostras e é conhecido que são codificadas por genes localizados em plasmídios conjugativos, em particular a col V (SMITH, 1974; HARNETT, 1985; VIDOTTO et alii, 1986). Estes resultados poderiam explicar a incidência de amostras colicinogênicas, encontradas (26,47%) nas amostras isoladas de leitões neonatos.

Pelos resultados obtidos, referentes aos níveis de resistência (Tabelas 12, 13, 14, 15 e 16) e também as Figuras 2, 3, 4 e 5, confirmou-se a resistência para as drogas ensaiadas. Por outro lado, as resistências observadas para as *E. coli* isoladas de leitões não apresentaram resistência significativa para os isolados de amostras de *E. coli* com diarrêia ou de suínos clinicamente sadios, quanto aos antibióticos testados. Porém a resistência mais alta foi para o antibiótico estreptomicina, seguido da canamicina. Uma possibilidade plausível para explicar esta resistência encontrada por amostras de *E. coli* de flora normal é que estas podem ter adquirido plasmídios de resistência foram transformadas em bactérias indistinguíveis de *E. coli* enterotoxigênica que ocorre naturalmente (FALKOW, 1975).

A bactéria *E. coli* enteropatogênica importante agente etiológico da colibacilose em leitões neonatos, causa diarréia e provoca alta mortalidade e morbidade. Os plasmídios R encontrados em amostras enterotoxigênicas tornam este problema ainda mais grave, porque além de dificultar a múltipla resistência às drogas, apresentam uma maquinaria de transferência íntegra, possibilitando a co-transferência de plasmídios de virulência, não conjugativos, de bactérias patogênicas para não patogênicas. Este fato é agravado quando os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento na suinocultura. Certamente irá contribuir para o aumento da pressão seletiva destas drogas que são usadas indiscriminadamente, favorecendo a seleção de amostras resistentes, dando condições ideais para a propagação dos plasmídios R.

Quase todas as amostras de *E. coli* estudadas apresentaram plasmídios. Amostras localizadas nas Figuras 8 e 15 (primeira e quarta canaleta) não apresentaram nenhum plasmídio. O fato de 98% das amostras estudadas apresentarem plasmídios é condizente com o fato deles serem comuns em bactérias gram-negativas, especialmente nas enterobactérias (NOVICK et alii, 1976; BRODA, 1979; HARDY, 1983).. Estes plasmídios não foram relacionados com a sua função biológica. No entanto, é conhecido que alguns destes plasmídios devem produzir enterotoxinas, fator de aderência, colicinas e resistências a antibióticos (ØRSKOV & ØRSKOV, 1966; SMITH, 1974; GYLES et alii, 1974; ELWELL & SHIPLEY, 1980).

Em todas as amostras de *E. coli* estudadas observou-se uma espantosa heterogeneidade, quanto ao número e tipos de plasmídios. Na amostra 23, canaleta 12, Figura 13, foi observado bandas plasmídiais diferentes, mostrando uma diversificação grande e menor unificação, o que cria condições desfavoráveis para sua interpretação.

Os resultados obtidos com o isolamento dos diferentes plasmídios de *E. coli* de leitões, discordam daqueles obtidos por BAUNGARTNER et alii (1983), quando estes encontraram uma grande homogeneidade entre os plasmídios isolados de *E. coli* de leitões.

OS resultados obtidos neste trabalho demonstram a necessidade de se estudar a ocorrência e quantificar os plasmídios existentes na flora bacteriana normal ou de animais com diarreia. Para melhores esclarecimentos dos mecanismos que levam à disseminação da virulência bacteriana, podem representar um importante apoio epidemiológico a sorologia associada a diagnósticos, na obtenção de vacinas, ou simplesmente fornecer informações mais significativas sobre determinadas linhagens existentes na flora bacteriana, que sob determinadas condições podem desencadear processos patológicos, com a colibacilose, que tantos prejuízos causam a suinocultura nacional.

6. CONCLUSÕES

1. Amostras de *E. coli* isoladas de fezes suínas diarréicas e clinicamente sadias apresentaram variação no comportamento bioquímico, para características como fermentação da lactose, de motilidade, descarboxilação da arginina, ornitina e lisina.

2. Amostras de *E. coli* isoladas de leitões neonatos, independente de serem procedentes de amostras diarréicas ou de flora intestinal normal produziram enterotoxinas LT e STa, através dos métodos padrões empregados na sua detecção.

3. Não foi possível detectar um antígeno de aderência que apresentasse hemaglutinação manose resistente para as hemácias testadas (humana, cavalo, cobaio e carneiro).

4. Algumas amostras de *E. coli* suína diarréicas e clinicamente sadias, apresentaram-se produtoras de colicinas, e o tipo predominante foi o V.

5. Amostras de *E. coli* suína diarréicas e não diarréicas mostraram níveis de resistência elevado para os antibióticos estreptomicina, canamicina e tetraciclina.

6. Plasmídios isolados de *E. coli* suína com e sem diarréia apresentaram alta heterogeneidade quanto à quantidade e peso molecular, o que dificultou relacioná-los com a capacidade de produção de enterotoxinas, produção de colicinas e resistência a antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, M.H.T. Isolamento de um plasmídeo responsável pela síntese simultânea da enterotoxina ST e do fator de colonização CFA/1 em *Escherichia coli*. São Paulo, 1981. (Doutorado - Escola de Medicina/USP).
- AKIBA, T.; KOYAMA, K.; ISHIKI, Y.; KIMURA, S.; FUKUSHIMA, T. On the mechanism of the development of multiple drug-resistance clones of *Shigella*. Jap. J. Microbiol., Tokyo, 4: 219-227, 1960. Apud WATANABE, T., op. cit. (32).
- ALDERETE, J.F. & ROBERTSON, D.C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun., 19: 1021-1030, 1978.
- ALDERTON, G.A. & FEVOLD, H.L. Isolation of lysozyme from egg. Journal Biol. Chem., 164: 290-292, 1946.
- BARNUM, D.A.; GLANTZ, P.J.; MOON, H.W. Colibacillosis, Ciba Veterinary Monograph Series, Ciba Foundation, Summit, N. J., 1967.
- BAUMGARTNER, A.O.; NICOLET, D.; BRAUN, R. Zbl. Vet. Med. B., 30: 288-296, 1983.

- BEERY, J.T.; DOYLE, M.P.; HIGLEY, N.A. Cytotoxic activity of *Escherichia coli* 0157:H7 cultura, filtrate on the mouse colon and Kidney. Curr. Microbiol., 11:335-342, 1984. 1984.
- BERNER, H. Memórias del VI Congresso IPVS. Copenhagen, 1980. p.136-142.
- BINNS, M.M.; DAVIES, D.L.; HARDY, K.G. Cloned fragments of the plasmid col V, IK₉₄ specifying virulence an serum resistance. Nature, 279:778-781, 1979.
- BIRD, H.R. Chick growth response to dietary antibiotics remains undiminished after 30 years. Feedstuff, 50(40): 16, 24, 1980.
- BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screenigg recombinant plasmid DNA. Nucleic. Ac. Res., 2:1513-1522, 1979.
- BOTINO, J.A. Determinação da atividade "in vitro" da flavomicina 2% sobre amostras de *Escherichia coli* isoladas do trato intestinal de aves. Determinações da C.M.I. In: 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA. Anais, 1981. p. 441-447.
- BRANDIS, H. & SMARDA, J. Bacteriocine und bacteriocin ahnliche substanzen. VEB Gustav. Fisher Verlag, Jena, 1971.
- BRINTON, C.C. The properties of sex pilli the viral nature of "conjugal" genetic transfer systems, and some possible approaches to the control of bacterial drug resistance. Crit. Rev. Microbiol., 1: 105-106, 1971.

- BRINTON, C.C.; GEMSKI, P.; CARNANAN, J. A new type of bacterial pilus genetically controlled by the heredity factor of *E. coli* K₁₂ and its role in chromosomal transfer. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 52:776-783, 1964.
- BRINTON JR., C.J. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. Trans. N.Y. Acad. Sci., 27:1003-1054, 1965.
- BRODA, P. Plasmids. Oxford, W.H. Freeman and Company, 1979. p.196-199.
- BUKHARI, A.I.; SAPINS, J.A.; ADHYA, S.L. DNA insertion elements, plasmids, and episomes. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
- CAMPBELL, D.A. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. Annual Review Microbiol., 35: 55-83, 1981.
- 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. Pesq. Vet. Bras., 4: 109-114, 1984.
- CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B.; GOMES, J.A.; GATTI, M.S.V. Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 12: 714-717, 1980.

- CHEN, C.; KUME, T.; NAKAZAWA, M.; TSUBAKI, S. *Escherichia coli* originated from diarrhea of suckling piglets in Taiwan. II. Serological Properties. Kitasato Archives of Experimental Medicina, 57(3):211-220, 1984.
- CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. Immunological cross reactivity between a heat-labile enterotoxin(s) of *Escherichia coli* and subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. Infect. Immun., 21:1036-1039, 1978.
- CLEMENTS, J.D.; YANCEY, R.J.; FINKELSTEIN, R.A. Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. Infect. Immun., 29:91-97, 1980.
- COATES, S.R. & HOOPES, K.H. Sensitivities of *Escherichia coli* isolated from bovine and porcine enteric infections to antimicrobial antibiotics. Am. J. Vet. Res., 41:1882-1883, 1980.
- COHEN, S. Transposable genetic elements and plasmid evolution. Nature, 263:731-738, 1976.
- COHEN, S. & SHAPIRO, J.A. Transposable genetic elements. Scientific American, 242: 36-45, 1980.
- CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S.M.; ROWE, B. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. Infect. Immun., 36: 189-197, 1980.
- DATTA, N. Transmissible drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium*. J. Hyg., Cambridge, 60:301-310, 1962.

- DATTA, N. & HUGHES, V.M. Plasmids of the same Inc. Groups in enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. Nature, 306: 616-617, 1983.
- DAVIES, D.L.; FALKINER, F.R.; HARDY, K.G. Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. Infect. Immunol., 31:574-579, 1981.
- DE, S.N.; BRATTACHARYA, K.; SARKAR, J.K. A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 71: 201-209, 1956.
- DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G.; HARDEN, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1973.
- DJONE, B.K. Colicin production in relation to pathogenicity factors in strains of *Escherichia coli* isolated from the intestinal tract of piglets. Acta Vet. Scand., 26 (2):145-152, 1985.
- DONTA, S.T.; MOON, H.W.; WHIPP, S.C. Detection of heat labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science, Washington, 183: 334-336, 1974.
- DRACHMAN, R.H. Acute infections gastroenteritis pediatric clinics of North America, 21:711-737, 1974.
- DUGUID, J.P.; SMITH, W.; DEMPSTER, G.; EDMUNDS, P.N. Monflagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. J. Pathol. Bacteriol., 70:335-348, 1955.

EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishers, 1972.

ELWELL, L.P. & SHIPLEY, P.L. Plasmid mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. Ann. Rev. Microbiol., 34:465-496, 1980.

EVANS, D.G.; EVANS JR., D.J.; PIERCE, N.F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immunol. 7: 873-880, 1973.

EVANS, D.G.; EVANS JR., D.J.; TJOA, W.; DUPONT, H.L. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. Infect. Immunol., 19: 727-736, 1978.

EVANS JR., D.J.; CHEN, L.C.; CURLIN, G.T.; EVANS, D.G. Stimulation of adeny cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. Nature, 236: 137-138, 1972.

EVANS JR., D.J. & EVANS, D.J. Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune hemolysis. Infect. Immunol., 16: 604 - 609, 1977.

EVANS JR., D.J.; EVANS, D.J. DU PONT, H.L.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. Patterns of loss of enterotoxigenicity by *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: suggestive evidence for an interrelationship with serotype. Infect. Immun. 17: 105-111, 1977.

EVANS JR., D.J. & GORBACH, S.L. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. Infect. Immun., 8: 725-733, 1973.

- FALCÃO, D.P.; LIMA, B.M.; MARINI, E.; SHIMIZU, M. Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de alimentos. Rev. Microbiology, 13: 402-411, 1982.
- FALKOW, S. Infections multiple drug resistance. London, Pion. Ltda., 1975
- FIELD, M.; GRAF JR., J.H.; LAIRD, W.J.; SMITH, P.L. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. "In vitro" effect on guanylate-cyclase activity cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:2800-2804, 1978.
- FIELD, M.; LAIRD, W.J.; GRAF JR., L.H.; SMITH, P.L.; GILL, D. M. Purification and mode of action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (ECST). In: Proceedings of the Thirteenth Joint Conference on Cholera U.S. - Japan Cooperative Medical Science Program Atlanta, 1977. p.29-34
- FINEGOLD, S.M.; SUTTER, V.Z.; MATHISEN, G.E. Normal indigenous intestinal flora. In: Human intestinal microflora in health and disease. D.J. Hentges Academic Press, 1983.
- FONTES, C.F. Proposição de dois novos meios de cultura e de um sistema simplificado para identificação de enterobactérias. São Paulo, 1982. 78p. (Mestrado - Escola Paulista de Medicina/USP).
- FRANCESCHI, A.P.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; SERAFIM, M.B.; PUSTIGLIONE NETO, L. Estudos comparativos entre o teste de alça ligada do intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção de enterotoxina termooestável (ST) produzida por *Escherichia coli*. Rev. Microbiol., 8: 123-128, 1977.

- FRANTZ, J.C. & ROBERTSON, D.C. Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins: development of a radioimmunoassay specific for heat stable enterotoxins with suckling mouse activity. Infect. Immun., 33: 193-198, 1981.
- FREDERICQ, P. Colicines et colicinignie. Ann. Inst. Pasteur, 107:7-17, 1964.
- FURTADO, J.S. & PEREIRA, A.D. Sistema coba cepas resistentes a antimicrobianos em 1984. So Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1985. 20p.
- GAASTRA, W. & GRAAF, F.W. Hosp-specific fimbrial adhesins of non invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev., 46: 129-161, 1982.
- GATTI, M.S.V. Fatores de virulncia em amostras de colibactrios enteropatognicos isolados no Brasil. (Mestrado - Escola Paulista de Medicina/USP), 1981.
- GIANELLA, R.A. & DRAKE, K.W. Effect of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. Infect. Immun., 24: 19-23, 1979.
- GLOCK, R.D. Digestive system. In: LEMON, A.D.; GLOCK, R.D.; MENGELING, W.L.; PENNY, R.H.C.; SCHOOL, E.; SSTRAW, B. eds. Diseases of swine. The Iowa State University Press.
- GRATIA, A. Sur in remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacilles. Cr. Soc. Biol., 93:1040 - 1041, 1925.

GREENBERG, H.B.; SACK, D.A.; RODRIGUEZ, W.; SACK, R.B.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; HORSWOOD, R.L.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A. Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Infect. Immun., 17: 541-545, 1977.

GREENBERG, R.N. & GUERRANT, R.L. *E. coli* heat-stable enterotoxin. Pharmac. Therhm., 13:507-531, 1981.

GREENBERG, R.N.; MURAD, F.; CHANG, B.; ROBERTSON, D.C.; GUERRANT, L. Inibition of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by indomethacin and chlorpromazine. Infect. Immun. 29:908-913, 1980.

GUERRANT, R.L. & BRUTON, L.L. Characterization of the chinese hamster ovary cell assay for the enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* and for antitoxin: differential inhibition by a gangliosides specific antisera, and toxoid. J. Infect. Dis., 135:720-728, 1977.

GUERRANT, R.L.; HUGLES, J.M.; CHANG, B.; ROBERTSON, D.C.; MURAD, F. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity, potential receptors and intermediates. J. Infect. Dis., 142:220-228, 1980.

GUINNE, P.A.M.; JARSEN, W.H.; AGTERBERG, C.M. Detection of the K₉₉ antigen by means of agglutination and immunoelectroforesis in *Escherichia coli* isolate from calves and its correlation with enterotoxigenicity. Infect. Immun. 13: 1369-1377, 1976.

GYLES, C.L. Heat.labile and heat.stable forms of the enterotoxin from *Escherichia coli* strains enteropathogenic for pigs. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, 176:314-322, 1971.

GYLES, C.L. Relationship among heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and *V. cholerae*. J. Infect. Dis., 129: 277-283, 1974.

GYLES, C.L. Immunological study of the heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *vibrio cholerae*. Infect. Immun., 9: 564-570, 1974.

GYLES, C.L. Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Can. J. Compar. Med., 43:371-379, 1979.

GYLES, C.L.; SO, M.; FALKOW, S. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 130: 40-49, 1974.

GYLES, C.L.; PALCHANDHURI, S.; MAAS, W.K. Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. Science, 198:198-199, 1977.

GYLES, C.L.; STEVENS, J.B.; CRAVEN, J.A. A study of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with gastro intestinal disease. Canad. J. Comp. Medic., 35:258-266, 1971.

HARDY, K.G. Colicinogeny and related phenomena. Bacteriological Reviews, 39:464-515, 1975.

HARDY, K.G. Bacterial plasmids. Nostrand Reinhold (UK). Co. Ltd., 1983. p.104.

HARNETT, N.M. & GYLES, C.L. Linkage of genes for heat stable enterotoxin drug resistance K₉₉ antigen, and colicine in bovine and porcine strains of enterotoxigenic, *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res., 46:428-433, 1985.

- HARRY, E.G. & CHUBB, H.L. Relationships between certain biochemical characteristics and pathological activity in avian strains of *Escherichia coli*. J. Comp. Path., 74: 180-187, 1967.
- HARRY, E.G. & HEMSLEY, L.A. The association between the presence of septicemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens the occurrence of Coli septicemia. Vet. Record., 77:35-40, 1965a.
- HARRY, E. G. & HEMSLEY, L.A. The relationship between environmental contamination with septicemia strains of *Escherichia coli* and their incidence in chickens. Vet. Record., 77:241-245, 1965b.
- HAYES, W. The genetic of bacteria and their viruses. 2.ed. Oxford, Blackwell, 1969. p.747-48.
- HEDGES, R.W. & JACOB, A.E. Transposition of ampicillin resistance from RP₄ to other replicons. Molec. Gen. Genet., 13:31-40, 1974.
- HEMSLEY, R.V.; BARNUM, D.A.; INGRAM, D.G. Biochemical and serological studies of avian strains of *Escherichia coli*. Avian Dis., 11:90-97, 1967.
- HEWLITT, G.L.; GUERRANT, R.L.; EVANS JR., D.J.; GREENOUGH III, W.B. Toxins of vibrio cholerae and *Escherichia coli* stimulate adeny cyclase in rat fat cells. Nature, 249: 371-373, 1974.
- HILL, W.E.; MADDEN, J.M.; MCCARDELL, B.A.; SHAH, D.S.; JAGOW, J.A.; PAYNE, W.L.; BOUTIN, B.K. Food borne enterotoxigenic *Escherichia coli*: detection and numeration by DNA colony hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 45: 1324 - 1330, 1983.

- HIRSH, D.C. Fimbriae: relation of intestinal bacteria and virulence in animals. Advanc. Vet. Sci., 29:207-238, 1985.
- HONDA, T.; TAGA, S.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 13: 1-5, 1981.
- HONDA, T.; TSEYI, T. TAKEDA, Y.; MINATAMI, T. Immunological non-identity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infec. Immun. 34: 337-340, 1981.
- HUGHES, V.M. & DATTA, N. Conjugative plasmids in bacteria of the "pre antibiotic" era. Nature, 302: 725-726, 1983.
- HUGHES, V.M.; MURAD, F.; CHANG, B.; GUERRANT, R.L. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Nature, 271(5647):755-756, 1978.
- INOWE, T.; OKAMOTO, K.; MORYAMA, T.; TAKAHASHI, T.; SHIMIZU, K.; MIYAMA, A. Effect of yersinia enterocolitica ST on cyclic guanosine 3',5'. Monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells. Microbiol. Immunol., 27 (2): 159-166, 1983.
- ISAACSON, R.E.; NAGY, B.; MOON, H.W. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization an adhesion factor of pig enteropathogens that lack K₈₈. J. Infect. Dis., 135: 531-539, 1977.
- JACKS, T.M. & WU, B. Biochemical properties of *Escherichia coli* low-molecular weight heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., 9: 342-347, 1974.

- JACOB, F. & WOLLMAN, E.L. Les épisomes éléments génétiques ajoutés. C.R. Acad. Sci., 247:154-156, 1958.
- 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., 6: 918-927, 1972.
- JONES, C.W. & RUTTER, J.M. The association of K₈₈ antigen with hemagglutination activity in porcine strains of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 84:135-144, 1974.
- KAECKENBEECK, A.; JOSSE, M.; SCHOENAERS, F. Relations chez les *Escheria coli* d'origine bovine entre le pouvoir enteropathogène l' antigène K₉₉ et l'hémagglutination. Ann. Méd. Vet., 121:239-248, 1977.
- KANTOR, H.S.; TAO, P.; GORBACK, S.L. Stimulation of intestinal adenyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin: comparison of strains from an infant adult with diarrhea. J. Infect. Dis., 129:1-9, 1974.
- KELSRUP, J. & GIBBONS, R.J. Inactivation of bacteriocins in the intestinal canal and oral cavity. J. Bacteriol. 99: 888-890, 1969.
- KLEMM, P. The complete aminoacid sequence of the K₈₈ antigen, a fimbrial protein from *Escherichia coli*. Env. J. Biochem., 116:617-627, 1981.
- KLIPSTEIN, F.A.; LEE, C.S.; ENGERT, R.F. Assay of *Escherichia coli* enterotoxins by in vivo perfusion in the rat jejunum. Infect. Immun., 14: 1004-1010, 1976.

- KNOOP, F.C. & THOMAS, D.D. Stimulation of calcium uptake and cyclic GMP synthesis in rat basophilic leukemic cells by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins. Infect. Immun. 41: 971-977, 1982.
- KOHLER, E.M. Pathogenesis of neonatal enteric colibacillosis of pigs. JAVMA, 160:574-582, 1972.
- LANGLOIS, B.E.; DAWSON, K.A.; STAHLY, T.S.; CROMWELL, G. L. Antibiotic resistance of fecal coliforms from swine fed subtherapeutic and therapeutic levels of chlortetracycline. Journal of Animal Science, 58(3):666-674, 1984.
- LEDERBERG, J. Cell genetics and hereditary symbiosis. Physiol. Rev., 32:403-430, 1952.
- LEVINE, M.M.; RENNELS, M.B.; DAYA, V.; HUGHES, T.P. Hemagglutination and colonization factor in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea. J. Infect. Dis., 141: 733-737, 1980.
- LIMA, A.O. & SILVA, W.D. Imunologia, imunopatologia, alergia: Métodos. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1970. 79p.
- LINTON, A.H. Antibiotics, animals, and man an appraisal of a contents subject. In: WOODBINE, M. (ed.) Antibiotics and antibiotics in agriculture. Butterworths, Woburn, M.A., 1977. p.315-343.
- LOKEN, K.I.; WAGNER, L.W.; HENKE, C.L. Transmissible drug resistance in enterobacteriaceae isolated from calves given antibiotics. Amer. J. Vet. Res., 32:1207-1212, 1971.

- LOPES, C.A.M. Drogas antimicrobianas em nutrição de aves: ganho de peso, conversibilidade alimentar e níveis de resistência de *Escherichia coli*. Botucatu, 1978. 106p. (Livre-Docência-Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP).
- MACKOWIAK, P.A. The normal microbial flora. New England Journal of Medicine, 307:83-93, 1982.
- MARMUR, J.R.; ROWND, S.; FALKOW, L.S.; BARON, C.; SCHULDKRAUT, & DOTY, P. The nature of intergenetic episomal infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47:972-979, 1961.
- MEYERS, J.A.; SANCHES, D.; ELWELL, L.P.; FALKOW, S. Simple agarose electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 127:1529-1537, 1976.
- MITSUHASHI, S. Transmissible drug resistance factor R-Gunma. J. Med. Sci., 14: 169-209, 1965.
- MITSUHASHI, S.K. Genetics of R factors. Antibiotics and Chemotherapycs, 20:133-174, 1976.
- MITSUHASHI, S.; HARADA, K.; HASHIMOTO, H. Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug enteric-bacteria and transmission: of drug resistance to other strains by mixed cultivation. Jap. J. Exp. Med., 30: 176-181, 1960.
- MITSUHASHI, S.; HARADA, K.; KAMEDA, M. On the drug resistance of enteric bacteria to spontaneous and artificial elimination of transferable drug resistance factors. Jpn. J. Microbiol., 31:119-121, 1961.

- MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H.; SUZUKI, K. Drug resistance of enteric bacteria distribution of R factors in *Escherichia coli* strains isolated from livestock. J. Bact., 94:1166-1169, 1967.
- MOOI, F.R.; DE GRAAF, F.K.; VAN EMBDEN, J.D.A. Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that codifies for the K₈₈ab antigen. Nucleic Acids Res., 6:849-865, 1979.
- MOON, H.W.; KOHLER, E.M.; SCHNAIDER, R.A.; WHIPP, S.C. Prevalence of pilus antigens, enterotoxins types and enteropathogenicity among K₈₈ negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. Infect. Immun., 27:222-230, 1980.
- MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ENGSTROM, C.W.; BAETZ, A.L. Response of the rabbit ileal loop to cell free products from *Escherichia coli* enteropathogenic for swine. J. Infect. Dis., 127:182-187, 1970.
- MOON, H.N.; WHIPP, S.C.; SKARTVEDT, S.M. Etiologic diagnosis of diarrhoea disease of calves. Frequency and methods for detecting enterotoxin and K₉₉ antigen production by *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res., 37:1025-1029, 1976.
- MORENO, G. Resistência infecciosa a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. São Paulo, 1970. (Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP).
- MORENO, G. Resistência infecciosa a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32:47-55, 1973.

- MORRIS, J.A.; THORNS, C.J.; SCOTT, A.C.; SOJKA, W.J. Adhesive properties associated with strains of invasive *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 128:2097-2103, 1982.
- MOSELEY, S.L.; HUG, I.; ALIM, A.R.M.A.; SO, M.; SAMADPOUR, MOTALEBI, M.; FALKOW, S. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization. J. Infect. Dis., 142: 892-898, 1980.
- MOSELEY, S.L.; JONATHAN, W.H.; HUG, I.M., ECHEVERRIA, P; FALKOW, S. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 39: 1167-1174, 1983.
- NAGY, B.; MOON, H.W.; ISSAACSON, R.E. Colonization of porcine small intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli* ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K₈₈ and by some acapsular mutants. Infect. Immun., 13: 1214-1220, 1976.
- NAGY, B.; MOON, H.W.; ISAACSON, R.E. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli* selection of piliated forms in vivo, adhesion of piliated forms to epithelial cells in vitro and incidence of a pillus antigen among porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 16: 344-352, 1977.
- NEWSOME, P.M.; BURGESS, M.N.; MERLLAN, N.A. Effect of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on cyclic GMP levels in mouse intestine. Infec. Immun., 22: 290-291, 1978.
- NOVICK, R. Plasmids. Scientific American, 243(6):76-90, 1980.

- NOVICK, R.P.; CLOWES, R.C.; COHEN, S.N.; CURTISS, R.; DATTA, A.; FALKOW, S. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. Bacteriol Rev., 40:168-189, 1976.
- O'BRIEN, T.F.; ROSS, D.G.; GUZMAN, M.A.; MEDEIROS, A.A.; HEDGES, R.W.; BODSTEIN, D. Dissemination of an antibiotic resistance plasmid in hospital patient flora. Antimicrob. Ag. Chemother., 17:537-543, 1980.
- OCHIAI, K.; YAMANAKA, T.; KIMURA, K.; SAMADA, O. Studies on inheritance of drug resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli* strains. Nippon Iji Shimpo, Tokyo, 1861: 34-36, 1959. Apud WATANABE, T., op. cit. (32).
- ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. Episome-carried surface antigen K₈₈ of *Escherichia coli*. 1. Transmission of the determinant of the K₈₈ antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. J. Bacteriol., 91:69-75, 1966.
- ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SMITH, H.W.; SOJKA, W.J. The establishment of K₉₉, a thermolabile transmissible *Escherichia coli* K antigen previously called "kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta Path. Microbiol. Scand., 83:31-36, 1975.
- ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. JANN, B.; JANN, K. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bact. Rev., 41:667-710, 1977.
- ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SOJKA, W.J.; LEACH, J.M. Simultaneous occurrence of *Escherichia coli* B and 10 antigens in strains from diseased swine. Acta Path. Microbiol. Scand., 53: -422, 1961.

- ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SOJKA, W.J.; WITTIG, W. K antigen K₈₈ab (L) e K₈₈ac (L) in *E. coli*. A new antigen: O₁₄₇ and a new K antigen K₈₈ (B). Acta Pathol. Microbiol. Scand., 62:439-447, 1961.
- OSBORNE JR., J.C.; MOSS, J.; FISHMAN, P.H.; NAKAYA, S. Specificity in protein-membrane associations the interaction of ganglioside with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin. Biophys. J., New York, 37:158-160, 1982.
- OZANNE, G.; MATHIEU, L.G.; BARIL, J.P. Production of colicin V in vitro and in vivo and observations on its effects in experimental animals. Infect. Immun., 17:497-503, 1977.
- POHL, P.; ROBAYE, E.; THOMAS, J. Determinants transmissibles de la résistance aux antibiotiques groupés en une structure génétique unique chez les *Escherichia coli* pathogènes et particularités des souches de multirésistance. Ann. Med. Vet., 116:167-187, 1972.
- QUACKENBUSH, R.L. & FALKOW, S. Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 24: 562-564, 1979.
- REIS, M.H.L.; MATOS, D.P.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; TOLEDO, M. R.F.; TRABULSI, L.R. Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes and sources of strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 28: 24-27, 1980.
- REEVES, P.R. The bacteriocins. New York, Springer, 1972. 142p.
- ROSEBURY, T. Microorganisms indigenous man. New York, McGraw-hill, 1982.

- RUTTER, J.M.; JONES, G.W. Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli* - a model for vaccination with a virulence determinant? Nature, 242: 531-533, 1973.
- SANCHEZ, M.S. Tipificação sorológica de cepas de *E. coli* para o suíno. Am. INIA/Ser. Ganadera, 22:85-92, 1985.
- SACK, R.B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* identification and characterization. J. Infect. Dis., 142:279-286, 1980.
- SARMANOVA, Z.; SALAJKA, E. Colicine production of haemolytic *Escherichia coli* isolated from enteric *E. coli* infections in weaning pigs. Acta Vet. Brno., 40:241-246, 1971.
- SELLWOOD, R. *Escherichia coli* associated porcine neonatal diarrhea: antibacterial activities of colostrum from genetically susceptible and resistant sows. Infect. and Immunity, 35:396-401, 1982.
- SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.O.; 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., 24: 606-610, 1979.
- SILVA, M.L.M.; YAMAMOTO, M.A.; SEVERO, N.P.F. Resistência a drogas, lisoglia e produção de colicinas e hemolisinas em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas. Rev. Microbiol., 14: 254-258, 1983.
- SILVEIRA, W.D. Estudo plasmidial em amostras enterotoxigênicas de *Escherichia coli* produtoras do novo fator de colonização F₄₂. Ribeirão Preto, 1986. (Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP).

- SIMÕES, M. Fatores de virulência e sensibilidade a drogas, em colibacilos isolados de suínos com diarreia. São Paulo, 1979. (Mestrado - Escola Paulista de Medicina/USP).
- SMITH, D.H. R factors mediate resistance to mercury, nickel and cobalt. Science, 156:1114-1116, 1967.
- SMITH, D.H. & DAVIS, B.D. Mode of novobiocin in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 93:71-79, 1967.
- SMITH, H.W. The effects of the use of antibiotics on the emergence of antibiotic resistant disease producing organisms in animals antibiotics in agriculture. Proc. Univ. of Nottingham Ninth Easter School in Agr. Sci., 1962. p.374-383.
- SMITH, H.W. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid controlled toxin and a plasmid controlled lethal character closely associated identical with colicin V. J. Gen. Microbiol., 83:95-111, 1974.
- SMITH, H.W. Persistence of tetracycline resistance in pig *E. coli*. Nature, 258: 628, 1975.
- SMITH, H.W. & HALLS, S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. J. Pathol. Bacteriol., 93:499-529, 1967.
- SMITH, H.W. & HUGGINS, M.B. Further observation of the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. J. Gen. Microbiol., 92:335-350, 1976.

- SMITH, H.W. & LINGWOOD, M.A. The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol., 4:301-305, 1971.
- SMITH, H.W. & LINGWOOD, M.A. Observations on the pathogenic properties of the K₈₈, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea. J. Med. Microbiol., 4:497-485, 1971.
- SMITH, H.W. & LINGWOOD, M.A. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical 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., 5:243-250, 1972.
- SMITH, H.W. & PARSELL, Z. Transmissible substrat utilizing ability in Enterobacteriaceae. J. Gen. Microbiol., 87: 129-140, 1975.
- SO, M.; CRANDALL, J.F.; CROSA, J.H.; FALKOW, S. Estrachromosomal determinants which contribute to bacterial pathogenicity. In: SCHELESSINGER, D. (ed.). Microbiol., Washington, American Society for Microbiology, 1974. p.16-26.
- SO, M.; CROSA, J.H.; FALKOW, S. Polynucleotide sequence relationship among Ent plasmids and the relationship between Ent and other plasmids. J. Bact., 121:234-238, 1975.
- SO, M.; HEFFRON, F.; MCCARTHY, B.J. The *E. coli* gene encoding heat-stable toxin is a bacterial transposon flanked by inverted repeats of IS₁. Nature, 277: 453-456, 1979.
- SOJKA, W.J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry Review Series n° 7, Commonwealth Bureau of Animal Health, London, 1965. p.104-154.

- SOJKA, W.J: Enteric diseases in new born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. Vet. Bull., 41: (7):509-522, 1971.
- SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S.; KONOWALCHEK, J. Assay of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin with VERO cells. Infect. Immun., 16: 617-622, 1977.
- STAPLES, S.J. & GIANELLA, R.A. Production and purification of human *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. In: Proceedings of the 15th. Joint Conference of Cholera. National Institutes of Health Bethesda, Md., 1979. p.127-141.
- STEPHEN, J. & PETROWSKI, R.A. Bacterial toxins. Edited by Thomas Nelson and Sons Ltda. England, 1981. 104p.
- STIRM, S.; ØRSKOV, I.; BIRCH A. Episome carried surface antigen K₈₈ of *Escherichia coli* III. Morphology. J.Bacteriol. 93:740-748, 1967.
- STUART, S.J.; GREENWOOD, K.T.; LUKE, K. Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by col V plasmids. J. Bacteriol., 143:35-42, 1980.
- SVENNERHOLM, A.M. & HOLMGREEN, J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁ - Eliza procedure). Curr. Microbiol., New York, 1:19-23, 1978.
- TAKEDA, Y.; TAKEDA, T.; YANO, T.; YAMAMOTO, K.; MIWATANI, T. Purification and partial characterization of heat stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun., 25: 978-85, 1979.
- TOLBERT, P. A different kind of drug abuse. The Ecologist., 11(3): 143-5, 1981.

- TRABULSI, L.R. Revelação de colibacilos associados às diarreias infantis pelo método da infecção experimental da alça ligada do intestino do coelho. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 6: 197-207, 1964.
- UEDA, H.; TERAOKA, N.; ISAYAMA, Y. Etiologic studies on enterotoxigenic *Escherichia coli* among isolates from domestic animals in Japan. Natl. Inst. Anim. Health Q (Jpn) 21: 108-109, 1981.
- VIDOTTO, M.C. Plasmídeos R desreprimidos em amostras enterotóxicas de *Escherichia coli*. São Paulo, 1981. (Mestrado- Escola Paulista de Medicina/USP).
- VIDOTTO, M.C.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A. Estudo genético da patogenicidade em *Escherichia coli* isoladas de suínos na região de Londrina, PR. Separata da Revista Semina:38-43, 1986.
- WALDMAN, S.A.; O'HANLEY, P.; FALKOW, S.; SCHOKLINIK, G.; MURAD, F. A simple, sensitive and specific assay for heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., Chicago. 149:83-89, 1984.
- WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bact. Rev., Baltimore, R7:87-115, 1963.
- WATANABE, T.; NISHIDA, H.; OGATA, C.; ARAI, T.; SATO, S. Episome-mediated transfer of drug resistance in enterobacteriaceae VII. Two types of naturally occurring R factors. J. Bacteriol., 88:716-726, 1964.
- WEILER, E.; MELLETZ, E.W.; BREITENBERGER, P.E. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 54:1310, 1975.

WILLINGER, H. & WEBER, A. *Escherichia coli* infections in domestic animals. Proc. Symp. XII Inst. Congr. Microbiol. Munich, 1978.

WILLIAMS, P.H. Novel iron uptake system specified by col V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 26:925-932, 1979.

WILLINGER, H. *Escherichia coli*. In: BLOBEL, H. & SCHIE, T. Handbuch der bakterieren infektkoen bey tieren. 3. ed. Stuttgard, Geofischer Verlag, 1981. p.257-343.

YANO, T.; LEITE, D.A.; CAMARGO, I.J.B.; CASTRO, A.F.P. A probable new adhesive factor (F₄₂) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. Microb. Immun. 30:495-508, 1986.

YANO, T.; OLIVEIRA, M.S.; FONTES, C.F.; ALMEIDA, C.P.; CASTRO, A.F.P. Detection of heat labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the radial immune hemolysis test: a modification for clinical use. Med. Microbial Immun., 171: 171-178, 1982.

APÉNDICE

Tabela 18. Provas bioquímicas de amostras de *E. coli*.

Amostras	Indol	VM [*]	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glicose (gás)	Lactose
1	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
3	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
4	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
5	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
6	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
7	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
8	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
9	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
10	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
11	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
12	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
13	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
14	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
15	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
16	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
17	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
18	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
19	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
20	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
21	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
22	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
23	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
24	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
25	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

*VM - Vermelho de metila; VP - Voges Proskauer; H₂S - produção de ácido sulfídrico;

FA - fenil alanina

Cont.

Cont.

Tabela 18. Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glicose (gás)	Lactose
26	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
27	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
28	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
29	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
30	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
31	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
32	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
33	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
34	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
35	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
36	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
37	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
38	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
39	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
40	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
41	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
42	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
43	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
44	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
45	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
46	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
47	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
48	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
49	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
50	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Tabela 18. Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glicose (gás)	Lactose
51	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
52	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
53	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
54	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
55	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
56	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
57	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
58	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
59	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
60	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
61	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
62	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
63	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
64	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
65	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
66	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
67	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
68	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
69	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
70	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
71	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
72	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
73	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
74	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
75	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Cont.

Tabela 18.Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glucose (gás)	Lactose
76	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
77	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
78	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
79	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
80	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
81	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
82	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
83	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
84	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
85	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
86	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
87	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
88	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
89	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
90	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
92	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
93	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
94	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
95	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
96	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
97	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
98	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
99	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
100	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Cont.

Tabela 18. Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glicose (gás)	Lactose
101	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
102	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
103	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
104	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
105	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
106	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
107	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
108	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
109	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
110	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
111	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
112	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
113	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
114	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
115	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
116	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
117	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
118	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
119	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
120	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
121	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
122	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
123	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
124	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
125	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Cont.

Cont.

Tabela 18. Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glicose (gás)	Lactose
26	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
27	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
28	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
29	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
30	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
31	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
32	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
33	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
34	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
35	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
36	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
37	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
38	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
39	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
40	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
41	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
42	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
43	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
44	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
45	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
46	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
47	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
48	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
49	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
50	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Tabela 18. Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glicose (gás)	Lactose
51	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
52	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
53	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
54	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
55	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
56	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
57	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
58	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
59	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
60	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
61	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
62	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
63	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
64	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
65	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
66	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
67	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
68	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
69	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
70	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
71	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
72	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
73	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
74	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
75	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Cont.

Tabela 18. Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glucose (gás)	Lactose
76	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
77	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
78	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
79	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
80	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
81	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
82	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
83	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
84	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
85	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
86	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
87	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
88	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
89	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
90	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
91	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
92	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
93	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
94	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
95	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
96	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
97	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
98	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
99	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
100	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Cont.

Tabela 18. Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glicose (gás)	Lactose
101	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
102	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
103	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
104	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
105	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
106	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
107	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
108	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
109	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
110	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
111	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
112	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
113	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
114	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
115	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
116	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
117	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
118	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
119	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
120	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
121	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
122	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
123	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
124	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
125	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Cont.

Tabela 18. Continuação.

Amostras	Indol	VM	VP	Citrato Simmons	H ₂ S	Urease	FA	Motili- dade	Glicose (gás)	Lactose
126	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
127	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
128	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
129	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
130	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
131	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
132	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
133	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
134	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
135	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
136	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
137	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
138	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
139	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
140	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
141	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
142	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
143	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+