

Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos

[Detection of pathogenic strains by multiplex PCR and antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* isolated from piglets]

N.R. Macêdo^{1,5}, C.P.L. Menezes², A.P. Lage^{1,6}, L.E. Ristow³, A. Reis⁴, R.M.C. Guedes^{1*}

¹Escola de Veterinária – UFMG
Caixa Postal 567
30123-970 – Belo Horizonte, MG

²Laboratório Biocod – Belo Horizonte, MG

³Laboratório TECSA – Belo Horizonte, MG

⁴Laboratório IPEVE – Belo Horizonte, MG

⁵Bolsista da FAPEMIG/Pfizer

⁶Bolsista do CNPq

RESUMO

Avaliou-se a frequência dos genes de fimbrias (K88, K99, 987P, F18 e F41) e toxinas (LT, Stb, StaP e Stx2e) de cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia usando a técnica de PCR multiplex com primers específicos para esses genes, e estudou-se o padrão de sensibilidade das cepas patogênicas pelo método de difusão em disco ao florfenicol, ceftiofur sódico, colistina, fosfomicina, neomicina, norfloxacina, sulfá + trimetoprim, doxiciclina, tetraciclina e lincomicina. Foram utilizadas 144 amostras de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia, provenientes de granjas localizadas no estado de Minas Gerais. Dessas, 42 (29,2%) foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência testados. Dentre essas 42 amostras, 23 (54,8%) apresentaram genes de fimbria e toxina, sete (16,6%) apresentaram somente genes de toxinas e 12 (28,6%) amostras somente genes de fimbria. O resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos demonstrou que o florfenicol (89,5 %) e o ceftiofur sódico (84,2%) foram as drogas de melhor eficácia *in vitro* sobre cepas de *E. coli* com fatores de virulência.

Palavras-chave: suíno, *Escherichia coli*, tipificação, PCR multiplex, sensibilidade antimicrobiana

ABSTRACT

The frequency of virulence determinants genes for fimbrial adhesions (K88, K99, 987P, F18 and F41) and toxins (LT, Stb, StaP and Stx2e) in *E. coli* strains isolated from diarrheic piglets using the multiplex polymerase chain reaction assay with specific primers for these genes was studied. The antimicrobial sensitivity pattern of pathogenic isolates for florfenicol, sodium ceftiofur, colistin, fosfomicin, neomycin, norfloxacin, sulfa + trimetoprim, doxycycline, tetracycline and lincomycin was also tested using the disk diffusion method. *E. coli* were isolated from 144 diarrheic piglets from farms in the state of Minas Gerais. Forty-two out of 144 studied samples (29.2%) were positive for at least one tested virulence factor. Out of these 42, 23 samples (54.8%) contained fimbria and toxin genes, seven (16.6%) samples had genes for toxins only and 12 (28.6%) samples just fimbria genes. Disk diffusion *in vitro* antimicrobial sensitivity test demonstrated the best results for florfenicol (89.5%) and sodium ceftiofur (84.2%) against virulent *E. coli* strains.

Keywords: pig, *Escherichia coli*, typification, multiplex PCR, antimicrobial sensitivity

Recebido em 17 de abril de 2007

Aceito em 25 de setembro de 2007

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: guedes @vet.ufmg.br

Apoio: FAPEMIG (Processo EDT-2281/2003) e Laboratório Desfar/Desvet

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um dos agentes etiológicos mais frequentemente isolados em casos de diarreia no homem e em diferentes espécies animais (Holland, 1990; Nataro e Kaper, 1998). A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastrointestinal são comensais não patogênicos (Nataro e Kaper, 1998). Cepas toxigênicas de *E. coli* causam diarreia aquosa profusa e/ou lesões vasculares sistêmicas devido à liberação de enterotoxinas como as toxinas termo-lábil (LT), termo-estável (Sta e Stb) e Shiga toxina (Stx2e) (Francis, 2002).

Wilson e Francis (1986) e Casey et al. (1992) descreveram cinco diferentes tipos principais de fímbrias: K88, K99, 987P, F18 e F41 em isolados de *E. coli* toxigênicas (ETEC) de origem suína. As fímbrias, também consideradas fatores de virulência, permitem a aderência dessas bactérias a receptores específicos localizados na superfície de enterócitos. A partir da aderência, essas bactérias colonizam a superfície celular e lá secretam as toxinas envolvidas no processo de diarreia. A colonização bacteriana e quadro clínico aparente da infecção são restritos a idade e linhagem do animal, ou seja, leitões lactentes são infectados mais frequentemente por cepas possuidoras de determinadas fímbrias como 987P e F41, por apresentarem receptores específicos em enterócitos, nessa faixa etária. Além disso, existem linhagens de suínos que não expressam receptores de membrana de enterócitos específicos que permitiriam a aderência das cepas de *E. coli*, sendo, por isso, resistentes (Wilson e Francis, 1986; Imberechts et al., 1997; Francis et al., 1998).

Após a adesão, *E. coli* toxigênicas produzem toxinas (ST e LT) que induzem a hipersecreção pelas células do intestino ou que interferem com a síntese protéica das células (Stx2e) acarretando diarreia nos animais (Holland, 1990; Fairbrother e Gyles, 2006).

As duas formas mais frequentemente utilizadas para detecção desses fatores de virulência em *E. coli* em animais diarreicos são a imunofluorescência indireta em esfregaços de mucosa, ou em cortes de congelação de intestino corados com anticorpos específicos para antígenos fimbriais (Mullaney et al., 1991), e a detecção de genes de virulência pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de PCR multiplex permite a pesquisa de diferentes alvos

de amplificação de DNA, com a utilização de diferentes primers em uma mesma reação, o que reduz sensivelmente os custos do teste.

No Brasil, com frequência, o diagnóstico de colibacilose em leitões é realizado somente pelo isolamento bacteriano, sem nenhuma caracterização de patogenicidade. São poucos os estudos brasileiros sobre a prevalência e importância de diferentes cepas patogênicas de *E. coli* (Baccaro et al., 1999; Baccaro et al., 2000; Calderaro et al., 2001).

O uso indiscriminado de antimicrobianos para controle de colibacilose tem levado ao desenvolvimento de resistência. O reconhecimento da patogenicidade dos isolados, bem como de seu perfil de sensibilidade às drogas antimicrobianas pode reduzir o uso de drogas de largo espectro para o tratamento dos animais, o que auxilia na diminuição de *E. coli* resistentes presentes nos suínos e no seu ambiente (Borowski et al., 1994; Brito e Tagliari, 2000; Baccaro et al., 2000; Vargas et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi pesquisar a frequência de cepas de *E. coli* com fatores de virulência, isoladas de leitões com diarreia, usando a técnica de PCR multiplex com primers específicos para esses genes. Também foram feitas avaliações da prevalência de diferentes cepas patogênicas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia, provenientes de granjas do Estado de Minas e avaliação do padrão de resistência aos antibióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para padronização da técnica de PCR multiplex foram utilizados, como controles positivos para os fatores de virulência, quatro amostras referência de *E. coli*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico Veterinário da University of Minnesota: 2568 (Stb, StaP, F18 e Stx2e), 2569 (Stb, LT e K88), 2570 (987P e StaP) e 2571 (StaP, K99 e F41). Após padronização dessa técnica, 144 cepas de *E. coli* isoladas de leitões, lactentes ou desmamadas, com diarreia, oriundos de diferentes granjas do Estado de Minas Gerais, foram testadas para verificar a presença de fatores de virulência.

O isolamento bacteriano foi realizado a partir de amostras das fezes ou dos intestinos de leitões com diarreia, em agar sangue e MacConkey,

Detecção de cepas patogênicas pela PCR...

incubados por 24 horas, à temperatura de 37°C. Colônias bacterianas com características sugestivas de *E. coli* foram repicadas por esgotamento e, posteriormente, identificadas por provas bioquímicas (Hitchins et al., 1995). Culturas puras de *E. coli* foram estocadas em placas de agar sangue ou agar Muller Hinton, a 4°C, até o processamento para o PCR multiplex que ocorreu nos dias subsequentes.

De cada cepa de *E. coli* presente nas placas de agar refrigeradas, uma colônia isolada foi coletada usando alça de platina e ressuspensa em microtubo contendo 500µl de solução tampão fosfato (PBS), pH 7,2, estéril. Após homogeneização em vortex, as amostras foram centrifugadas a 7.000xg por 10min sob refrigeração, para sedimentação de bactérias. Ao sedimento foi adicionado 270µl de solução de lise (Tris HCl 1,0M, pH 8,0; EDTA 0,5M; NaCl 4,5M; SDS 10%; qsp água destilada), 200µl de High TE (Tris HCl 1,0M, pH 8,0; EDTA 0,5M; qsp água destilada) e 5µl de proteinase K (20mg/ml). Após vigorosa agitação por 20 a 30seg (vortex), a mistura foi incubada a 55°C por, no mínimo, três horas. O lisado, contendo o DNA bacteriano, foi submetido ao método de extração de DNA fenol-clorofórmio, descrito por Sambrook et al. (1989).

O DNA extraído foi dosado por espectrofotometria e testado em diferentes diluições, após os quais ficou padronizada a quantidade de 10ng/µl por tubo para cada reação de PCR. Os *primers* utilizados para os diferentes genes de fatores de virulência estão demonstrados no esquema.

Todos os testes de PCR foram executados em um volume de 10µl, contendo 10ng de DNA bacteriano, 0,2µM de cada dNTP¹, 1,5µM de MgCl₂², 0,5µM de cada *primer* (IDT) e cinco unidades de *Taq* DNA polimerase³. Água estéril foi usada como controle negativo do PCR e algumas amostras negativas foram submetidas a mais de um PCR, desta vez usando os *primers* separadamente, para comprovação da ausência dos genes nessas amostras.

O programa de amplificação utilizado foi de 25 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min e 70°C por 2min; extensão final no último ciclo por 10min a 72°C e, finalmente, 4°C. O PCR foi executado em termociclador Minicycler⁴. Os produtos da amplificação foram separados em

eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) e corados pela prata (Fig. 1).⁴

Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em agar, segundo as recomendações de Woods e Washington (1995). Das amostras de *E. coli* isoladas em agar sangue⁵ por 24h a 37°C, foi preparada uma suspensão em PBS equivalente ao tubo de 0,5 de MacFarland e inoculadas em agar Muller-Hinton⁵. As placas foram incubadas por 18h a 37°C. Foram utilizados discos de ceftiofur sódico 30µg, colistina 10µg, doxiciclina 30µg, florfenicol 30µg, fosfomicina 30µg, lincomicina 2µg, neomicina 30µg, norfloxacina 10µg, sulfametoxazole-trimetoprim 25µg e tetraciclina 30µg⁶. Após a incubação os halos de inibição foram medidos e os padrões de susceptibilidade foram determinados^{7,5}.

Os dados sobre a faixa etária dos leitões com diarreia foram obtidos das fichas enviadas com as amostras de fezes. Esses dados foram utilizados para a caracterização da distribuição da frequência de *E. coli* toxigênicas por faixa etária.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quarenta e duas (29,2%) das 144 amostras estudadas foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência testados (fimbrias: K88, K99, 987P, F18 e F41; e toxinas: LT, Stb, StaP e Stx2e). Vinte e três amostras (54,8%) apresentaram genes de fimbria e toxina, sete (16,6%) amostras apresentaram somente genes de toxinas e 12 (28,6%) amostras somente genes de fimbrias. A frequência dos fatores de virulência detectada isolada ou em associação com outros fatores foi: Stb (40,5%), K99 (33,3%), StaP (33,3%), Stx2e (21,4%), LT (19,0%), F18 (19,0%), 987P (14,3%), K88 (14,3%) e F41 (9,5%). A combinação de fatores de virulência em isolados de *E. coli*, também conhecida como virotipo, mais frequentemente identificada está listada na Tab. 1.

¹Eppendorf - São Paulo, Brasil.

²Roche - São Paulo, Brasil.

³Phonetría - Belo Horizonte, Brasil.

⁴MJ Research - Ramsey, EUA.

⁵Difco - São Paulo, Brasil.

⁶LaborHospitalar - São Paulo, Brasil.

⁷Cefar. Sensifar-Vet - São Paulo, Brasil.

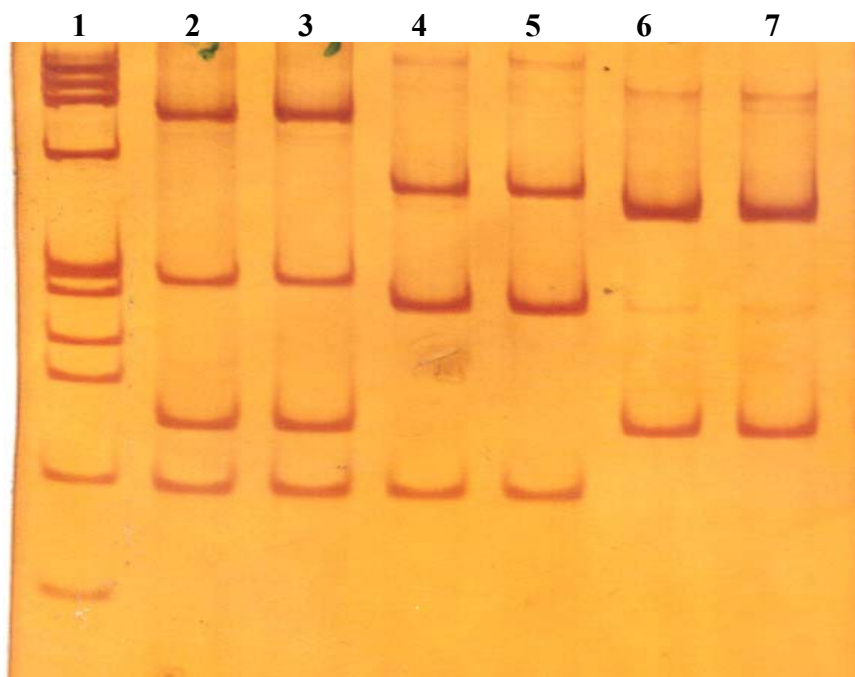


Figura 1. Gel de poliacrilamida. Reações de PCR multiplex para fatores de virulência de *E. coli* enterotoxigênica, colunas: 1= marcador molecular; 2 e 3= cepa de *E. coli* com genes de STx2e (733 Kb), F18 (313 Kb), StaP (158 Kb) e STb (113 Kb); 4 e 5= cepa de *E. coli* com genes de K88 (499 Kb), LT (272 Kb) e STb (113 Kb); 6 e 7= cepa de *E. coli* com genes de 987P (405 Kb) e StaP (158 Kb).

Esquema. Primers para genes de fatores de virulência de *E. coli*

| Seqüência de primers | Fator | Tamanho do produto |
|--|--|--------------------|
| Stb: Forward 5' – TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT – 3' Reverse 5' – CTC CAG CAG TAC CAT CTC TA– 3' | enterotoxina B | 113 |
| StaP: Forward 5' – CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT – 3' Reverse 5' – TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG– 3' | enterotoxina A | 158 |
| K99: Forward 5' – AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA – 3' Reverse 5' – AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT - 3' | fímbria de adesão (bovino e suíno) | 230 |
| LT: Forward 5' – GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT – 3' Reverse 5' – TGG TCT CGG TCA GAT ATG T– 3' | enterotoxina termo-lábil | 272 |
| F18: Forward 5' – TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA – 3' Reverse 5' – ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG – 3' | fímbria de adesão (homem e bovino) | 313 |
| 987P: Forward 5' – GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC – 3' Reverse 5' – AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC –3' | fímbria de adesão (suíno) | 409 |
| K88: Forward 5' – GTA TCT GTC CGA GAA TAT CA - 3' Reverse 5' – GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG – 3' | fímbria de adesão (suíno) | 499 |
| F41: Forward 5' – AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG – 3' Reverse 5' – CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC – 3' | fímbria de adesão (bovino, suíno e ovino) | 612 |
| Stx2e Forward 5' – AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT – 3' Reverse 5' – TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC – 3' | Shiga toxina II (homem, bovino e suíno) | 733 |

Detecção de cepas patogênicas pela PCR...

Tabela 1. Distribuição e frequência de virotipos de *E. coli* enterotoxigênicas por faixa etária dos leitões

| Virotipo | No de amostras | % | Idade | | Sem informação |
|-----------------------|----------------|--------|----------|-----------|----------------|
| | | | Lactente | Desmamado | |
| K99 | 8 | 19,05 | 3 | 5 | 0 |
| Stx2e | 4 | 9,52 | 2 | - | 2 |
| Stb, StaP, 987P | 4 | 9,52 | 3 | 1 | 0 |
| K88 | 3 | 7,14 | - | 2 | 1 |
| Stb, StaP, F18 | 2 | 4,76 | 1 | 1 | 0 |
| Stb, LT e K88 | 2 | 4,76 | - | 1 | 1 |
| Stb, Sta, F18 e Stx2e | 2 | 4,76 | - | 2 | 0 |
| F41 | 2 | 4,76 | 0 | 2 | 0 |
| Outros | 15 | 35,72 | 2 | 5 | 8 |
| Total | 42 | 100,00 | 11 | 19 | 12 |

Este estudo mostra elevada frequência de isolamento de *E. coli* não patogênicas de leitões com diarreia em diagnósticos realizados no Brasil. Moon et al. (1986), Baccaro et al. (1999) e Costa et al. (2006) relataram ser Stb o fator de virulência mais frequentemente detectado em cepas de *E. coli* enterotoxigênicas isoladas de suínos com diarreia, estando presente, respectivamente, em 74%, 12,3% e 50% dos casos, resultados confirmados no presente estudo.

Baccaro et al. (2000) e Cho et al. (2000) pesquisaram genes de toxinas (StaP, Stb e LT) e fímbrias (K88, K99, 987P, F41) isoladas de suínos diarreicos e encontraram, respectivamente, 27,3% e 24,3% das amostras com fatores de virulência. A frequência de detecção de cepas patogênicas encontradas neste estudo foi semelhante às verificadas por esses autores.

Vargas et al. (2003) e Fairbrother et al. (2000) testaram, pela PCR, isolados de *E. coli* de suínos com diarreia e constataram que em 75% e 65,5% dos casos, respectivamente, as amostras apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos genes de fímbria (F18, F41, K88 e K99) ou toxina (Sta, Stb, LT e Stx2e) pesquisados, contudo a toxina Stx2e não foi incluída no estudo de Fairbrother et al. (2000). Esses trabalhos apresentaram maiores frequências de detecção de cepas patogênicas quando comparadas com as do presente estudo. Este fato pode ser atribuído a diferenças entre as populações estudadas.

Segundo Fairbrother et al. (2000), genes de fatores de virulência (Sta, Stb, LT, K88, K99, 987P, F18 e F41) foram encontrados em 414 (65,6%) de 633 amostras de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia após o desmame (21 a 50

dias de idade). Os virotipos mais frequentemente observados foram LT e Stb (34%), LT, Stb e Sta (13%), Sta e Stb (12%), Stb (10%) e Sta (4%). Quase todos os isolados que apresentaram LT, Stb e LT, Sta, Stb eram K88 positivos. Entre os isolados que apresentaram Sta e Stb, 12% eram F18 positivos. Entre os que apresentaram Stb, 10% eram F18 positivos, enquanto o restante das amostras foi negativo para todos os genes de fímbrias testados. Entre os que apresentaram a toxina Sta, 70% eram K99 positivos e o restante eram 987P positivos. No presente trabalho, os isolados que apresentaram Sta e Stb, e Sta, Stb e LT também apresentaram genes para as fímbrias F18, 987P ou K88. As amostras que apresentaram genes para as enterotoxinas Stb e LT, e Stb, eram F41, F18 ou K88 positivas. Os isolados que eram positivos para as toxinas isoladas StaP, Stx2e e LT apresentaram as fímbrias F41, K99 ou F18. O restante das amostras foi negativo para todos os genes de fímbrias testados.

Wajjawalku et al. (2002), ao determinarem a frequência dos genótipos dos mesmos nove fatores de virulência, e Costa et al. (2006) de sete deles (exceto Stx2e e F18), por PCR em amostras de *E. coli* hemolítica de casos clínicos de leitões com enterite, encontraram, respectivamente, 91,6% e 82,5% das amostras patogênicas possuidoras de pelo menos um gene de enterotoxina ou fímbria. A correlação entre fímbrias e toxinas em *E. coli* hemolítica foi 58,4% (125/214) dos isolados (Wajjawalku et al., 2002). Aparentemente, a utilização de somente cepas hemolíticas de *E. coli* propiciou aumento significativo da percentagem de amostras patogênicas, diferentemente deste trabalho, no qual não foram selecionadas somente cepas hemolíticas para tipificação. Entretanto, a utilização da característica hemolítica não é

suficiente para se identificar amostras diarreicogênicas de *E. coli*.

Fato curioso foi a detecção de ETEC com fímbria K99, 987P e F41 em leitões desmamados. Vale salientar que à medida que os animais ficam mais velhos tornam-se mais resistentes, sendo as fímbrias acima citadas, raramente detectadas em animais desmamados. As três possíveis explicações para este fato seriam (i) que o manejo de desmama precoce, frequentemente utilizado em rebanhos de Minas Gerais, propicia a infecção de animais desmamados ainda jovens; (ii) que esses animais, infectados por cepas possuidoras de fímbrias de adesão e alguns genes de toxinas, tenham tido diarreia por essas amostras anteriormente, mas que essas amostras não estejam envolvidas com o processo diarreico atual; (iii) que a infecção concomitante por outros agentes causadores de diarreia poderia mudar a distribuição por faixa etária.

A frequência de cepas patogênicas varia muito dependendo da faixa etária dos animais estudados, das técnicas utilizadas, da região geográfica e do desenho amostral, ou seja, animais com diarreia ou não. Este fato demonstra a importância da execução de estudos de detecção de fatores de patogenicidade em *E. coli* isoladas de suínos com diarreia, para determinar regionalmente as cepas mais frequentes e, mais importantes, caracterizar a sensibilidade dessas cepas a diferentes agentes antimicrobianos.

O resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostra que o florfenicol e o ceftiofur sódico foram as drogas de melhor eficácia sobre cepas virulentas de *E. coli* em testes *in vitro*, usando a técnica de difusão em disco (Tab. 2). Costa et al. (2006) verificaram que o maior índice de sensibilidade foi observado para o florfenicol em 81,1% dos isolados clínicos de suínos. Baccaro et al. (2002) e Hariharan et al. (2004) analisaram a resistência antimicrobiana em *E. coli* isoladas de leitões com diarreia e constataram que o ceftiofur foi o antimicrobiano que demonstrou menores índices de resistência frente a essas cepas de *E. coli*, 0,16% e 1,0%, respectivamente. Estudo semelhante realizado por Fairbrother et al. (2000), o ceftiofur foi o segundo antimicrobiano de melhor eficácia, com 18% de resistência.

Dentre os isolados analisados no presente estudo, 100% (38/38) apresentaram resistência a pelo

menos um dos agentes antimicrobianos testados. A frequente resistência de cepas de *E. coli* enterotoxigênicas aos antimicrobianos testados pode ser devido ao uso inadequado dessas drogas em medicações preventivas na ração dos animais, servindo de alerta para veterinários.

Tabela 2. Padrão de susceptibilidade a antibióticos de 38 das 42 amostras de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia que apresentavam fatores de virulência.

| Antibióticos | Número de amostras sensíveis | % de amostras sensíveis |
|-------------------|------------------------------|-------------------------|
| Florfenicol | 34 | 89,47 |
| Ceftiofur sódico | 32 | 84,21 |
| Fosfomicina | 24 | 63,16 |
| Colistina | 21 | 55,26 |
| Neomicina | 19 | 50,00 |
| Norfloxacina | 18 | 47,37 |
| Sulfa+trimetoprim | 13 | 34,21 |
| Doxiciclina | 6 | 15,79 |
| Tetraciclina | 6 | 15,79 |
| Lincomicina | 4 | 10,52 |

CONCLUSÕES

Apenas um terço das cepas de *E. coli* testadas apresentou fatores de virulência pela técnica de PCR multiplex e, por isso, são potencialmente patogênicas. O teste *in vitro* demonstrou alta resistência das cepas de *E. coli* isoladas de leitões diarreicos em relação à maioria dos antimicrobianos testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; BRONZONI, P.V.M., et al. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas e verotoxinas através da PCR em amostras de *E. coli* isoladas de leitões lactentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Concórdia. *Anais...Concórdia*: EMBRAPA: CNPSA, 1999.
- BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P. et al. Occurrence of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates piglets in Brazil. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne. *Anais...Melbourne*: International Pig Veterinary Society, 2000. p.52.

- BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; CORRÊA, A. et al. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli*

Detecção de cepas patogênicas pela PCR...

- isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arq. Inst. Biol.*, v.69, p.15-18, 2002.
- BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; STEPAN, A.L. et al. Sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de suínos apresentando diarreia no período pós-desmame. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.22, p.24-30, 1994.
- BRITO, B.G.; TAGLIARI, K.C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões lactentes com diarreia. *Rev. Bras. Cien. Vet.*, v.7, p.117-119, 2000.
- CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M. et al. Freqüência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos de Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.68, p.29-34, 2001.
- CASEY, T.A.; NAGY, B.; MOON, H.W. Pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* that do not express K88, K99, F41 or 987P adhesions. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.1488-1492, 1992.
- CHO, W.S.; PARK, Y.C.; CHAE, C. Genotypic prevalence for fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne. *Anais...*Melbourne: International Pig Veterinary Society, 2000. p.54. (Resumo).
- COSTA, M.M.; SILVA, M.A.; SPRICIGO, D.A. et al. Caracterização epidemiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.26, p.5-8, 2006.
- FAIRBROTHER, J.M.; HIGGINS, R.; DESAUTELS, C. Trends in path types and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Quebec. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne. *Anais...*Melbourne: International Pig Veterinary Society, 2000. p.17. (Resumo).
- FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S. et al. (Ed). *Disease of Swine*. Oxford: Blacwell Science, 2006. p. 639-674.
- FRANCIS, D.H.; GRANGE, P.A.; ZEMAN, D.H. et al. Expression of mucin-type glycoprotein K88 receptors strongly correlates with piglet susceptibility to K88+ enterotoxigenic *Escherichia coli*, but adhesion of this bacterium to brush borders does not. *Infect. Immun.*, v.66, p.4050-4055, 1998.
- FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J. Swine Health Prod.*, v.10, p.171-175, 2002.
- HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D. et al. Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea. *Can. Vet. J.*, v.45, p.605-606, 2004.
- HITCHINS, A.D.; FENG, P.; WATKINS, W.D. et al. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: *Bacterological Analytical Manual*. Gaithersburg: AOAC International, 1995. p.4.01-4.29.
- HOLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.3, p.345-375, 1990.
- IMBERECHTS, H.; BERTSCHINGER, H.U.; NAGY, B. et al. Fimbrial colonization factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea and edema disease. *Adv. Exper. Med. Biol.*, v.412, p.175-183, 1997.
- MOON, H.W.; SCHNEIDER, R.A.; MOSELY, S.L. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolates from swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.210-212, 1986.
- MULLANEY, C.D.; FRANCIS, K.H.; WILLGOHS, J.A. Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88, and 987P pilus antigens of *Escherichia coli*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.3, p.115-118, 1991.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, p. 142-201, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (Ed). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p.E.3-E.4.
- VARGAS, A. C.; SILVA, M.S.; COSTA, M.M. et al. Perfil epidemiológico, molecular e de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* isoladas em criatórios suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. *Anais...*Goiânia: ABRAVES, 2003. p.03-04. (Resumo).
- WAJJAWALKU, W.; SIRIPATTARAPRAVAT, K.; BILHMAD, U. et al. Frequency of virulent factors in hemolytic *Escherichia coli* isolated from pigs by using polymerase chain reaction. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 17., 2002, Ames. *Anais...* Ames: International Pig Veterinary Society, 2002. p.57. (Resumo).
- WILSON, R.A.; FRANCIS, D.H. Fimbriae and enterotoxins associated with *E. coli* serogroups isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.213-217, 1986.
- WOODS, G.L.; WASHINGTON, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A. et al. *Manual of clinical microbiology*. 6.ed. Washington: ASM Press, 1995. p.1327-1341.