

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

COMPARAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA (E.) COLI* ISOLADAS DE FEZES
DE LEITÕES DE CRECHE COM DIARREIA E *E. COLI* ISOLADAS DA ÁGUA DAS
MESMAS GRANJAS

Carolina Maciel Malgarin

Porto Alegre

2015/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

COMPARAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA (E.) COLI* ISOLADAS DE FEZES
DE LEITÕES DE CRECHE COM DIARREIA E *E. COLI* ISOLADAS DA ÁGUA DAS
MESMAS GRANJAS

Autora: Carolina Maciel Malgarin

Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
obtenção da Graduação em Medicina
Veterinária

Orientador: Prof. Dr. David E. S. N. de
Barcellos

Co-orientadora: M.V. MSc Karine Ludwig
Takeuti

Porto Alegre

2015/1

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder o dom da vida, me dando saúde para atingir meus objetivos. Agradeço à minha mãe, meu pai, minha madrasta e meus irmãos, Michelle e João Pedro, por sempre me apoiarem e compreenderem as minhas ausências, por serem o meu porto seguro e me darem forças para realizar os meus sonhos. Obrigada por estarem sempre presentes, mesmo quando estamos longe.

Agradeço aos meus amigos, por serem a parte mais divertida desta jornada. Por sempre celebrarem junto as vitórias e consolarem as derrotas, dando a força necessária para que eu seguisse no meu caminho. Agradeço aos presentes que a FAVET me deu, Priscilla, Renata, Lúcia e Débora, que muito mais que apenas companheiras de aula, viraram parceiras de vida.

Agradeço ao Setor de Suínos, aos mestres David, Fernando, Ivo e Mari, que não apenas me transmitiram conhecimentos acadêmicos, mas especialmente aprendizados para a vida inteira. Agradeço a todos os estagiários e pós-graduandos que deixaram um pouco de si em mim. Agradeço aos colegas que viraram amigos, e que me acompanharão não só na profissão, mas na vida. Agradeço especialmente à minha eterna orientadora Karine: sem ti nada seria possível!

Por fim, agradeço aos inspiradores desse trabalho, os leitões, que em um dia meio sem querer, conquistaram meu coração e me deram a oportunidade de trabalhar com o que eu amo.

RESUMO

Atualmente, um dos problemas mais observados na suinocultura são as diarreias que acometem leitões na fase de creche, levando a prejuízos na cadeia produtiva em função da perda de peso dos animais, desidratação e gastos com medicamentos. *Escherichia (E.) coli*, causadora da colibacilose na fase de maternidade e após do desmame, é um dos principais agentes infecciosos envolvidos nas diarreias pós desmame, podendo determinar índices de mortalidade de até 25%. A diarreia ocorre entre a primeira e a terceira semana após a entrada nas creches e apresenta-se de forma pastosa a líquida, de coloração amarelada ou acinzentada. *E. coli* é uma bactéria comensal do intestino dos leitões e sua patogenicidade está diretamente relacionada com a expressão de fímbrias e toxinas. A via fecal-oral é a principal via de transmissão, sendo a água uma importante fonte de contaminação, podendo ocasionar as diarreias. Visando observar a possibilidade de transmissão de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) via água, o objetivo do trabalho foi isolar e tipificar *E. coli* de amostras de água provenientes de caixas d'água e bebedouros de creches de suínos e de suabes retais de leitões com diarreia pós desmame. Em amostras com isolamento de *E. coli* foi realizado PCR *multiplex* para a detecção das fímbrias e toxinas presentes nas amostras e realizado o antibiograma, sendo possível comparar os fatores de virulência e resistência antimicrobiana em amostras isoladas da água e naquelas isoladas dos leitões. Em quatro das dez amostras de água foi possível isolar *E. coli*, entretanto, nenhuma apresentava os genes para os fatores de virulência característicos de cepas ETEC. Das 60 amostras de suabes retais analisadas, 21 isolaram *E. coli* e sete encontraram fatores de virulência para ETEC. Os fatores de virulência mais frequentes foram as fímbrias F18 (62,5%) e F4 (25%) e as toxinas STb (100%) e STap (75%). *E. coli* isoladas das amostras de água apresentaram maior resistência aos antimicrobianos apramicina, florfenicol, lincomicina, lincomicina+espectinomicina, oxitetraciclina e sulfametoxazol+trimetoprim e foram sensíveis a colistina e fosfomicina. As sete ETEC isoladas de suabe retal apresentaram maior resistência à lincomicina e menor resistência à fosfomicina. As 14 *E. coli* não ETEC isoladas de suabe retal apresentaram maior resistência ao florfenicol e não apresentaram resistência a colistina. *E. coli* enterotoxigênica é um importante agente na causa de colibacilose pós-desmame, porém não parece ser capaz de desenvolver fatores da virulência na água, possivelmente por depender de condições do animal para isso. Os resultados mostraram que a água não é uma importante fonte

de transmissão de ETEC. As amostras analisadas apresentaram uma ampla variação nos fatores de resistência a dez antimicrobianos diferentes, apresentando inclusive multirresistência.

Palavras-chave: colibacilose, PCR, fímbrias, toxinas, antibiograma.

ABSTRACT

One of the most frequent problems in the swine industry is diarrhea in nursery pigs, which causes significant losses due to weight loss, dehydration and cost of medication. *Escherichia (E.) coli* is one of the main agents of the post-weaning diarrhea and can cause a disease with mortality rate as high as 25%. The diarrhea occurs between the first and third week post-weaning and varies in consistency from very watery to pasty with a colour range from grey to yellow. *E. coli* is an intestinal commensal bacteria in pigs and its pathogenicity is directly related to fimbria and toxins gene expression. Fecal-oral is the mainly route of transmission, and water is an important contamination source. To investigate the possibility of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) transmission through water, the objective of this study was to isolate and to typify *E. coli* from pig nursery water samples and from nursery pig's rectal swabs presenting post-weaning diarrhea. After isolation of *E. coli*, positive samples were genotyped by Multiplex PCR - to determine specific fimbria and toxin genes present in the isolate - followed by antibiogram analysis. Virulence factors and antimicrobial resistance could then be compared between water and piglet samples. *E. coli* was isolated in four out of the ten water samples, although none of them expressed ETEC virulence factors. From 60 rectal swab samples, 21 *E. coli* were isolated and seven expressed ETEC virulence factors. The fimbria presenting higher frequency was F18 (62,5%) and F4 (25%) and the toxins were STb (100%) and STap (75%). *E. coli* isolated from water samples presented higher resistance to apramycin, florfenicol, lincomycin, lincomycin+spectinomycin, oxytetracycline and sulfametoxazol+trimethoprim and did not present resistance to colistin and fosfomicin. The seven ETEC from rectal swab samples presented a higher resistance factor to lincomycin, and lower resistance factor to fosfomicin. The 14 non ETEC from rectal swab samples presented a higher resistance factor to florfenicol e no resistance to colistin. *E. coli* enterotoxigenic is an important agent causing post-weaning diarrhea, even though it seems incapable to develop its virulence factors in the water, probably because it may depends on conditions present exclusively in the animal organism. The results show that contamination of drinking water with ETEC was not an important cause of infection of the nursery piglets in the experiment. The samples analysed presented a wide range of resistance to the different antimicrobials, including multi-resistance.

Key words: colibacillosis, PCR, fimbria, toxins, antibiogram.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características bioquímicas da bactéria <i>Escherichia coli</i>	14
Tabela 2 - Resultados de PCR <i>multiplex</i> e hemólise das colônias de <i>E. coli</i> isoladas em amostra de água (4 das 10 granjas avaliadas) e das colônias de <i>E. coli</i> isoladas dos suabes retais destas quatro granjas.....	16
Tabela 3 - Padrão de susceptibilidade a antimicrobianos de 25 amostras de <i>E. coli</i> isoladas de suabes de leitões com diarreia ETEC positivas e ETEC negativas e de amostras de água ETEC negativas.....	18

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Etiologia.....	9
1.2	Patogenia.....	10
1.3	Sinais clínicos.....	11
1.4	Diagnóstico.....	11
1.5	Tratamento.....	11
2	ESTUDO DE CAMPO.....	13
2.1	Material e métodos.....	12
2.2	Resultado e discussões.....	15
2.3	Conclusões.....	20
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
	REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A colibacilose do desmame, causada pela *Escherichia (E.) coli* enterotoxigênica (ETEC), é considerada uma das principais formas de diarreia ocorrendo nas primeiras semanas de alojamento dos leitões na creche (21 a 60 dias de vida) (ALFIERI et al, 2010). A doença é descrita mundialmente (FAIRBROTHER; GYLES, 2006) e está relacionada a alterações nutricionais, alta pressão de infecção, problemas no ambiente e no manejo, condição do leitão na chegada à creche e excesso de estresse (MORÉS; MORENO, 2012).

A colibacilose se mostra como importante doença na suinocultura por causar perdas econômicas consideráveis em função de diversos fatores, como: perda de peso, diminuição no ganho de peso diário (BARCELLOS; STEPAN, 1991; EWING; COLE, 1994), aumento no uso de medicamentos e desinfetantes, piora na conversão alimentar, maior predisposição dos animais a infecções secundárias e variabilidade de peso dentro dos lotes (ALFIERI et al, 2010; BARCELLOS et al, 2011). A morbidade é variável, mas a doença pode atingir até 80% dos animais, com uma média de 30-40% (FAIRBROTHER; GYLES, 2006). Os índices de mortalidade da doença podem chegar até 25% em condições sanitárias deficientes e terapia inadequada (HAMPSON, 1994; MORÉS; MORENO, 2012).

1.1 Etiologia

E. coli é uma bactéria cocobacilo Gram-negativa, não esporulada e anaeróbia facultativa. Faz parte da microbiota intestinal normal dos suínos (EWING & COLE, 1994), entretanto, algumas cepas podem causar doença. Assim, é importante considerar as diferenças entre as cepas patogênicas e não-patogênicas (ALFIERI et al, 2010). Para identificar as cepas patogênicas, é feita a avaliação dos fatores de virulência da bactéria (FRANCIS, 1999), sendo os mais importantes na fase de creche as estruturas de adesão (fímbrias) e enterotoxinas (FAIRBROTHER; GYLES, 2006; MORÉS; MORENO, 2007). As fímbrias são estruturas proteicas de superfície capazes de se ligar a receptores do epitélio intestinal e são espécie-específicas (NATARO; KAPER, 1998). Enterotoxinas são produzidas após a adesão da bactéria, durante a multiplicação e agem em células secretórias presentes nas criptas das vilosidades intestinais (EWING; COLE, 1994). As principais toxinas causadoras de diarreia são a termolábil (LT) e a termoestável (ST) (FAIRBROTHER; GYLES, 2006).

Ao causar a diarreia neonatal, as fímbrias expressadas pela ETEC são F4, F5, F6 ou F41 (FRANCIS, 2004; FAIRBROTHER; GYLES, 2006). Já nos animais de creche, há a menor expressão de receptores para as fímbrias F5 e F6 pelo epitélio intestinal (FRANCIS, 2002), sem a redução da expressão de receptores para F4 (FAIRBROTHER; GYLES, 2006) e o início da expressão de receptores para F18 (FRANCIS, 2004). Assim, as fímbrias que costumam ser expressas pela bactéria na fase de creche são F4ab, F4ac, F18ab e/ou F18ac (FRANCIS, 2004; FAIRBROTHER; GYLES, 2006; ALFIERI et al, 2010), e os sorogrupos, O139-F18ab e O149-F4ac (FAIRBROTHER; GYLES, 2006). As enterotoxinas produzidas após a aderência aos enterócitos dos leitões de creche são a LT, a STa e a STb ou combinações delas (NAGY; FEKETE, 1999).

1.2 Patogenia

A infecção ocorre por via fecal-oral e, após instalada, diversas interações entre as reações causadas pelos fatores de virulência do antígeno e as reações de defesa do animal se iniciam. No trato intestinal dos suínos, a ETEC impede o peristaltismo intestinal, se adere à mucosa através das fímbrias, se multiplica e produz enterotoxinas (COWART, 1995; MORÉS; BARCELLOS, 2012). As enterotoxinas interferem nos processos hormonais responsáveis pela regulação do transporte de líquidos e eletrólitos entre as células epiteliais e a luz intestinal. Consequentemente, o nível de fluídos intestinais aumenta, impossibilitando a total reabsorção pelo intestino grosso, causando a diarreia do tipo secretória (EWING; COLE, 1994; VANNUCCI; GUEDES, 2009).

E. coli é uma das principais bactérias capazes de contaminar e se multiplicar na água, se esta estiver em temperatura adequada e com elevada concentração de matéria orgânica. O Ministério da Saúde classifica como água potável aquela negativa para coliformes fecais em 100 mL de amostra (BRASIL, 2011). Brito et al (1998) demonstraram a relação entre a contaminação da água por *E. coli* e a presença de diarreia nos leitões. Nas amostras de água foram encontradas fímbrias indicadoras de patogenicidade e a enterotoxina LT. Foi verificada uma correlação significativa entre o consumo de água contaminada e a ocorrência de diarreia na terceira semana de vida dos leitões (OGER, 1970; HUTSCHHEMAEKERS et al, 1976).

1.3 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da colibacilose se iniciam em 3-5 dias após o desmame com duração de 2-3 dias (HAMPSON, 1994; MORÉS; MORENO, 2012). Entre os sinais clínicos, o principal é a diarreia líquida a pastosa (MORÉS; MORENO, 2012), de coloração amarelada ou acinzentada, causando perda de peso progressiva (RICHARDS; FRASER, 1961). Os leitões acometidos pela doença apresentam apatia, desidratação, mau estado corporal e perda de apetite (HAMPSON, 1994). A temperatura retal geralmente permanece normal (FAIRBROTHER; GYLES, 2006). A morte pode ocorrer em função da acidose metabólica (MORÉS; MORENO, 2007) e da depleção de eletrólitos (EWING; COLE, 1994), resultantes da desidratação.

1.4 Diagnóstico

Para se fazer o correto diagnóstico de colibacilose pós desmame, é importante que sejam feitas análises laboratoriais (MORÉS; MORENO, 2007), já que os outros tipos de diarreia que podem acometer os suínos na fase de creche são muito semelhantes. Além do isolamento e identificação bacteriológica da *E. coli*, é necessária a caracterização fenotípica e genotípica da bactéria isolada, a fim de identificar os fatores de virulência da cepa (NAGY; FEKETE, 1999; FAIRBROTHER; GYLES, 2006; ALFIERI et al, 2010). A técnica de PCR *multiplex* permite que as fímbrias e toxinas de *E. coli* sejam identificadas, indicando a presença ou ausência de patogenicidade. O diagnóstico pode ser realizado a partir de amostras de fezes coletadas no animal *in vivo* ou conteúdo intestinal (MORÉS; MORENO, 2007). A coleta de material deve ser feita de modo asséptico, com suabes ou frascos estéreis para evitar a contaminação (ALFIERI et al, 2010).

1.5 Tratamento

O tratamento mais amplamente empregado para a diarreia do desmame é o uso de antimicrobianos, especialmente via água. Deste modo, o galpão que contenha animais afetados recebe a medicação, inclusive animais saudáveis (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 1999; WITTE, 1998).

A prática de medicar todos os animais tem se tornado controversa com o aumento da presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos mais utilizados, ou seja, não se inibem pelas concentrações habitualmente utilizadas ou apresentam mecanismos de resistência específicos

para o agente (VAN DEN BOGAARD, STOBBERINGH, 1999; WITTE, 1998; MOTA et al, 2005). Acredita-se que uma das principais causas para o surgimento de resistência aos antimicrobianos seja a variabilidade genética. Esta pode ser gerada pela mutação espontânea ou recombinação de genes (MOTA et al, 2005), visto que a ETEC possui elevada capacidade em desenvolver e disseminar mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento da doença (BACCARO et al, 2002).

Visando observar a possibilidade de transmissão de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) via água, o objetivo do trabalho foi isolar e tipificar *E. coli* de amostras de água provenientes de caixas d'água e bebedouros de creches de suínos e de suabes retais de leitões com diarreia pós desmame e comparar seus fatores de virulência e resistência a antimicrobianos.

2 ESTUDO DE CAMPO

2.1 Material e métodos

Amostragem: As coletas foram realizadas em 10 creches de suínos com diarreia pós-desmame localizadas na região do Vale do Taquari, no estado do Rio Grande do Sul. De cada granja foram coletados 15 suabes retais de animais de 21 a 28 dias de vida, apresentando diarreia amarelada de consistência pastosa a líquida, e 100 mL de água (50 mL de água dos bebedouros e 50 mL de água das caixas d'água) em tubos Falcon estéreis, totalizando 150 suabes e 10 amostras de água. Os suabes foram armazenados em meio de transporte Amies com carvão ativado (Absorve®) e, juntamente com os tubos de água, transportados em caixas de isopor com gelo reciclável para posterior análise no laboratório de sanidade do Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária da UFRGS. As coletas foram realizadas entre os meses de dezembro de 2014 e maio de 2015.

Cultivo e identificação bacteriana das amostras de suabe retal: As amostras de suabes foram semeadas em Ágar sangue™ (BD – enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Colônias características de *E. coli* (colônias pequenas ou médias; brancas, acinzentadas ou amareladas; brilhosas ou mucosas, e com presença de hemólise ou não), foram semeadas em Ágar MacConkey (Acumedia®) e Trypticase Soy Agar (TSA™ – BD) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Amostras lactose positivas no Ágar MacConkey foram selecionadas e a partir da cultura em TSA, foram submetidas ao teste de oxidase e à coloração de Gram, além de testes bioquímicos: teste de oxidação ou fermentação (O/F–Himedia®), Ágar lisina ferro (LIA – Acumedia®), Citrato de Simmons™ (BD), Tríplice açúcar e ferro (TSI – Himedia®), Sulfito Indol e Motilidade (SIM™ - BD) e ureia (Acumedia®). As características bioquímicas de *E. coli* são apresentadas na Tabela 1. Após a identificação de *E. coli*, as cepas foram inoculadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI™ - BD) e após o seu crescimento em estufa a 37°C por 24 horas, foram transferidas para meio de crioconservação em *ependorfs* para armazenamento a -18°C.

Tabela 1: Características bioquímicas da bactéria *Escherichia coli*.

	MacConkey	Coloração de Gram	SIM	Ureia	Citrato	OF	LIA	TSI
<i>E. coli</i>	+	Cocobacilo negativo	- + +	-	-	Oxidativo e fermentativo	+	Base e bisel ácidos

Fonte: adaptado de MARKEY et al, 2013.

Cultivo e identificação bacteriana das amostras de água: As amostras de água do bebedouro e da caixa d'água de cada granja foram misturadas, totalizando 100 mL de água por granja. As amostras foram enriquecidas com meio pronto Colilert (Idexx) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após o enriquecimento com Colilert, as amostras de água que apresentavam coliformes fecais passaram por todas as etapas descritas anteriormente a fim de isolar e identificar *E. coli*.

Identificação de fímbrias e toxinas: A técnica de PCR *multiplex* permite que fatores de virulência sejam identificados pela amplificação do DNA. Nesse exame, diferentes *primers* são utilizados na detecção de fímbrias e toxinas (QUADRI et al, 2005) em uma única reação. As fímbrias mais comumente encontradas na fase de creche são F4ab, F4ac, F18ab e/ou F18ac (FRANCIS, 2004; FAIRBROTHER; GYLES, 2006). As toxinas importantes para essa fase são a toxina termolábil (LT) e as toxinas termoestáveis (STa e STb) (FAIRBROTHER; GYLES, 2006). Apenas as amostras de água e de suabes retais que foram positivas para *E. coli* no exame bacteriológico, foram submetidas ao PCR *multiplex* (QIAGEN® Multiplex PCR Kit) para amplificação de fímbrias e toxinas. A técnica utilizada foi PCR convencional com leitura por eletroforese em gel de agarose. Os fatores de virulência testados foram as fímbrias (K88, K99, 987P, F18 e F41) e as toxinas (LT, Stb, StaP e Stx2e) (MACÊDO et al, 2007).

Teste de resistência a antimicrobianos (antibiograma): O antibiograma foi realizado pelo teste de difusão em Agar. A partir de um meio caldo Müller Hinton, os isolados eram padronizados na turbidez de 0,5 da escala MacFarland. Após, através de suabes estéreis, a suspensão ajustada era inoculada em placas de Agar Müller Hinton, e a distribuição dos discos de antimicrobianos era realizada. O diâmetro dos halos ao redor dos discos foi mensurado, e foram classificados em sensível e resistente (amostras com inibição intermediária foram consideradas resistentes) (CLSI,

2008). Foram testados dez princípios ativos (Oxoid®) comumente utilizados na suinocultura: Apramicina (15µg), Colistina (25µg), Florfenicol (30µg), Fosfomicina (50µg), Gentamicina (10µg), Lincomicina (10µg), Lincomicina+Espectinomicina (10µg), Neomicina (30µg), Oxitetraciclina (30µg) e Sulfametoxazol+Trimetoprim (25µg).

2.2 Resultados e discussão

Das dez amostras de água, quatro (40%) foram positivas para *E. coli*, e das 60 amostras (15 suabes de cada uma das 4 granjas) de suabe retal, 21 (35%) foram positivos para *E. coli*. Das 21 amostras de *E. coli* isoladas de suabe retal, oito (38%) apresentaram fímbrias e/ou toxinas (Tabela 2). Para ser considerada patogênica, a bactéria deve expressar, pelo menos, uma fímbria e uma toxina simultaneamente. Seguindo esse critério, sete (11,66%), do total de 60 amostras de suabe retal foram consideradas ETEC, diferentemente do trabalho de Sato (2013), que observou ETEC em 50,5% das amostras de suabe retal de leitões com diarreia. Apesar de *E. coli* ser considerada o principal agente etiológico das diarreias pós desmame, outros agentes causadores de diarreia também podem ser encontrados nessa fase, como *Isospora suis*, Rotavirus tipo A, *Clostridium perfringes*, *Salmonella typhimurium* (MORÉS; BRITTO, 2007; MORÉS; MORENO, 2012), e o Circovirus Suíno tipo 2 (PCV2) (BARCELLOS et al, 2011). Além disso, a baixa prevalência de ETEC nos animais amostrados pode estar relacionada à antibioticoterapia, amplamente utilizada nas creches.

Uma amostra apresentou apenas genes expressando toxinas, o que não é um resultado esperado, visto que toxinas são produzidas pela bactéria durante a sua multiplicação, após a adesão ao tecido intestinal. Uma provável causa desse resultado é o fato de que a técnica de PCR *multiplex* utiliza diversos marcadores para diferentes genes em uma única reação. Assim, a sensibilidade do teste é reduzida, podendo resultar em falsos negativos. Mesmo havendo a presença de genes que expressam as fímbrias, talvez eles não tenham sido amplificados em quantidades significativas.

Tabela 2: Resultados de PCR *multiplex* e hemólise das colônias de *E. coli* isoladas em amostras de água (4 das 10 granjas avaliadas) e das colônias de *E. coli* isoladas dos suabes retais destas quatro granjas.

GRANJA		AMOSTRAS										
A		1	2	3	4	5	7	8	9	10	12	Água
PCR	S tb , S taP , F18	Negativo	Negativo	Negativo	S tb , S taP , K88, L tB	Negativo	Negativo	S tb , S taP e F18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
HEMÓLISE		Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
B		1	6	7	8	Água						
PCR	K88, S tb e L tB	S taP , S tb e F18	S taP , S tb e F18	S taP , S tb e F18	S taP , S tb e F18	Negativo						
HEMÓLISE		Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente						
C		7	8	12	Água							
PCR		Negativo	S tb e L tB	Negativo	Negativo							
HEMÓLISE		Ausente	Ausente	Presente	Ausente							
D		9	11	12	Água							
PCR		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo							
HEMÓLISE		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente							

As maiores frequências de genes para fímbrias e toxinas foram para F18 (62,5%), F4 (K88) (25%), STb (100%), STap (75%) e LTb (37,5%) das amostras de suabe retal e nenhuma fímbria e/ou toxina foi detectada nas quatro amostras de água (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, em que as fímbrias F18 e F4 (K88) foram as mais expressadas em amostras de suabe retal (FRANCIS, 2004; FAIRBROTHER; GYLES, 2006; ALFIERI et al, 2010, SATO, 2013). Entretanto, diferentemente dos trabalhos de Brito et al (1998) e de Tsen et al (1998), que encontraram genes de expressão da fímbria F6 (987P) e da toxina LT, e das toxinas LT e ST, respectivamente, em amostras de água, não foram encontradas fímbrias ou toxinas indicativas de ETEC nas amostras de água das granjas analisadas. Uma das explicações para esse resultado é que as granjas de suínos realizam um rígido controle da qualidade da água, adicionando em suas caixas d'água cloro, hidratante, ácidos, medicações e polivitamínicos. A adição desses produtos pode reduzir a quantidade de bactérias presentes na água e reduzir a sua capacidade de expressão de fatores de virulência. Outra hipótese é de que não haja a expressão de fatores de virulência das bactérias presentes na água porque a expressão desses fatores está relacionada ao animal e a condições ligadas a ele, como alterações nutricionais, alta pressão de infecção, problemas no ambiente e no manejo, condição do leitão na chegada à creche e excesso de estresse (MORÉS; MORENO, 2012).

Nenhuma das amostras de água analisadas apresentou hemólise. Das sete amostras ETEC positivas dos suabes retais, uma não apresentou hemólise em Ágar sangue e seis apresentaram, o que está de acordo com Guerreiro (1984), onde a maior parte das amostras *E. coli* causadora de diarreia na creche apresentaram hemólise. Também de acordo com Nagy e Fekete (1999), que mostraram que amostras não-hemolíticas também estão associadas à colibacilose do desmame. Alguns trabalhos demonstram a relação da produção de hemolisinas com as fímbrias F4 e F18 - mais comuns na creche (FRANCIS, 2002). Uma razão pode ser pela localização do gene que expressa a fímbria F4 ser no mesmo plasmídeo que o gene determinante da hemólise (MORÉS; BARCELLOS, 2012). Os resultados do presente trabalho demonstram que nem sempre a hemólise é indicativa de patogenicidade de *E. coli*, visto que as duas amostras com expressão de F4 apresentaram hemólise; uma amostra com expressão de F18 não apresentou hemólise, e as outras quatro com expressão de F18 apresentaram hemólise.

Entre as sete amostras de suabe retal identificadas como ETEC, o maior perfil de resistência foi para a lincomicina (100%); o menor perfil de resistência foi para fosfomicina (14,2%). Entre as quatorze amostras de suabe retal de *E. coli* não classificadas como ETEC, o maior perfil de resistência foi para o florfenicol (100%), e não apresentou resistência a colistina. Entre as quatro amostras de água que tiveram isolamento de *E. coli*, os maiores perfis de resistência foram para apramicina (75%), florfenicol (75%), oxitetraciclina (75%) e sulfametoxazol+trimetoprim (75%) e não houve resistência a colistina e fosfomicina (Tabela 3).

Tabela 3: Padrão de susceptibilidade a antimicrobianos de 25 amostras de *E. coli* isoladas de suabes de leitões com diarreia ETEC positivas e ETEC negativas e de amostras de água ETEC negativas.

ANTIMICROBIANO (concentração)	ETEC % (n)	NÃO ETEC % (n)	ÁGUA % (n)
APRAMICINA (15µg)	57,1% (4)	28,5% (4)	75% (3)
COLISTINA (25µg)	28,5% (2)	0% (0)	0% (0)
FLORFENICOL (30µg)	42,8% (3)	100% (14)	75% (3)
FOSFOMICINA (50µg)	14,2% (1)	7,1% (1)	0% (0)
GENTAMICINA (10µg)	85,7% (6)	35,7% (5)	25% (1)
LINCOMICINA (10µg)	100% (7)	92,8% (12)	75% (3)
LINCOMICINA+ESPECTINOMICINA (10µg)	85,7% (6)	85,7% (12)	75% (3)
NEOMICINA (30µg)	28,5% (2)	71,40% (10)	75% (3)
OXITETRACICLINA (30µg)	42,8% (3)	85,7% (12)	25% (1)
SULFAMETOXAZOL+TRIMETOPRIM (25µg)	85,7% (6)	85,7% (12)	75% (3)

Todas as amostras apresentaram resistência a no mínimo um e no máximo oito dos dez antimicrobianos testados. Dos 25 isolados de *E. coli*, 24 (96%) apresentaram resistência a pelo menos três antimicrobianos, um resultado semelhante ao de TAKEUTI et al (2013b), em que 100% das amostras de *E. coli* foram multirresistentes. 100% das ETEC e não ETEC de amostras de suabe retal apresentaram multirresistência; 75% dos isolados de *E. coli* da água foram multirresistentes. Existe ampla variação entre os resultados de trabalhos que avaliaram a eficácia de antimicrobianos em cepas de *E. coli* (ALMEIDA, 2007; BACCARO, 2002; MENIN, 2008).

Os perfis de resistência encontrados para ETEC por Sato et al (2014) e Takeuti et al (2013a) em trabalhos realizados com amostras de *E. coli* também isoladas de suínos do Rio Grande do Sul apresentaram uma relativa variação em relação aos encontrados no presente trabalho. Neles, os autores encontraram um maior perfil de resistência à oxitetraciclina (93,6% e 96,6%, respectivamente), porém, encontraram resistência semelhante ao florfenicol (95,2% e 96,6%, respectivamente). Não apenas pelo crescente aumento da resistência antimicrobiana entre as enterobactérias (COSTA, 2006), mas também pela variabilidade observada nos resultados dos antibiogramas, as diferenças observadas podem ser atribuídas às variações regionais ou ao tipo de tratamento antimicrobiano utilizado em diferentes granjas/empresas. Sabe-se que a resistência está intimamente relacionada à pressão de seleção do agente às drogas utilizadas com maior frequência no tratamento da doença (BACCARO, 2002). O trabalho de Almeida et al (2007) resultou em alto perfil de resistência à lincomicina (96,4%) para *E. coli* ETEC e não ETEC, tendo resultados semelhantes ao presente estudo. Uma das causas de disseminação da resistência aos antimicrobianos no caso de *E. coli* é o fato da bactéria possuir um intervalo entre gerações muito curto e dispor de mecanismos de transferência de material genético (SHERLEY et al, 2004), pela aquisição de elementos genéticos móveis, especialmente plasmídeos e transposons (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Plasmídeos podem ser transferidos via conjugação entre duas bactérias pela formação de *pili*, contribuindo para a proliferação de estirpes multirresistentes. (SHERLEY et al, 2004). Através de transdução, transformação e conjugação também é possível que os elementos genéticos móveis, após se autorreplicarem dentro da célula, sejam transferidos e se disseminem na população (SHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001).

Florfenicol e neomicina tiveram alto perfil de resistência nas amostras não ETEC e água, mas não nas amostras ETEC. Três antimicrobianos apresentaram alto perfil de resistência em todas as amostras: lincomicina, lincomicina+espectinomicina e sulfametoxazol+trimetoprim, demonstrando que podem existir perfis de sensibilidade antimicrobiana semelhantes entre amostras, independentemente de sua patogenicidade. As amostras ETEC apresentaram baixo perfil de resistência a fosfomicina, possibilitando uma escolha mais prudente de antibioticoterapia na suinocultura.

2.3 Conclusões

- A ETEC é um importante agente etiológico causador de diarreia em leitões desmamados.

- Amostras ETEC positivas apresentaram amplas combinações entre os principais fatores de virulência envolvidos na patogenia da colibacilose pós desmame.

- *E. coli* não patogênicas podem ser isoladas em leitões desmamados com sinais clínicos de diarreia, sugerindo outra etiologia.

- Não foi detectada ETEC em nenhuma amostra de água das granjas avaliadas. O cuidado com a água fornecida aos animais em granjas de suínos pode ter inibido a expressão de fatores de virulência pela *E. coli*, ou a expressão dos mesmos pode estar diretamente relacionada ao leitão.

- Foi observada resistência a todos os antimicrobianos testados em pelo menos um tipo de amostra, sendo os maiores perfis de resistência encontrados para a lincomicina (ETEC), o florfenicol (não ETEC) e apramicina, florfenicol, oxitetraciclina e da associação sulfametoxazol+trimetoprim para água (não ETEC).

- Não foi observada resistência à colistina pelas amostras de *E. coli* de água e de suabe retal não ETEC, nem de fosfomicina pelas amostras de água. Fosfomicina foi o antimicrobiano com menor perfil de resistência pelas amostras ETEC de suabe retal.

- Foram observados altos perfis de resistência entre os três tipos de amostra (ETEC, não ETEC e água) para, lincomicina, florfenicol, lincomicina+espectinomicina e sulfametoxazol+trimetoprim.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

E. coli foi um importante agente etiológico em leitões de creche com sinais de diarreia, apesar da cepa ETEC estar presente em apenas 11,66% das amostras totais de suabe retal analisadas. Amostras positivas apresentaram amplas combinações entre os principais fatores de virulência envolvidos na patogenia da colibacilose da creche (F18 e F4, e STb, STap e LTb). Nenhuma das amostras de água apresentou fatores de virulência compatíveis com ETEC, possivelmente devido ao tratamento de água reduzir a quantidade de bactérias presentes na mesma e inibir a capacidade de expressão dos fatores de virulência, e também pela expressão desses fatores poder depender de condições presentes no organismo animal.

Diferentes padrões de resistência a antimicrobianos foram observadas entre as amostras de suabe retal ETEC positivas e ETEC negativas, e as amostras de água ETEC negativas. O antimicrobiano com maior perfil de resistência para as amostras ETEC positivas foi lincomicina, para as amostras ETEC negativas foi florfenicol e para as amostras de água ETEC negativas foram apramicina, florfenicol, lincomicina, lincomicina+espectinomicina, oxitetraciclina e sulfametoxazol+trimetoprim. Não foi observada resistência a colistina pelas amostras de *E. coli* de água e de suabe retal não ETEC, nem de fosfomicina pelas amostras de água. Fosfomicina foi o antimicrobiano com menor perfil de resistência pelas amostras ETEC de suabe retal. Houve ocorrência de resistência múltipla em 96% das amostras frente aos dez princípios ativos testados, gerada especialmente pela transmissão dessa característica através de plasmídeos. Também foram observados perfis de resistência semelhantes entre as amostras patogênicas e não patogênicas para lincomicina, lincomicina+espectinomicina e sulfametoxazol+trimetoprim.

Apesar de não haver a presença de fatores de virulência nas amostras de água, há a presença de *E. coli*. Assim, deve-se manter adequadas condições ambientais e de manejo com os animais, a fim de evitar a ocorrência de fatores que influenciem na expressão de fímbrias e toxinas pela bactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, v.128, p.1037-1050, 2007.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BARRY, A. Diarreias em Suínos. In: ALFIERI, A.F.; BARRY, A. ALFIERI, A.A.; et al (Eds.). **Tópicos em Sanidade e Manejo de Suínos**. Campinas: Sanphar; Sorocaba: Curuca Consciência Ecológica, 2010, p.165-184.
- ALMEIDA, F.S. et al. Diarreia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto -SP, Brasil. *Ars Veterinária*, v.23, p.151-157, 2007.
- BACCARO, M. R. Et al. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.2, p.15-18, 2002.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; STEPAN, A.L. Estudo etiológica de diarreia em leitões recentemente desmamados. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. 1991. Águas de Lindóia/SP. *Anais...Águas de Lindóia*,1991, p.60.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; SATO, J.P.H.; ANDRADE, M.R. Diarreias nutricionais dos suínos: uma visão do veterinário clínico. In: Simpósio Internacional de Suinocultura, 2011, Porto Alegre/RS. *Anais...Porto Alegre*,2011, p.23-24.
- BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de janeiro de 2011. **Procedimentos de Controle e de Vigilância da Qualidade da água Para Consumo Humano e Seu Padrão de Potabilidade**. Brasília, DF, 14 jan. 2011. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 09 jul. 2015.
- BRITO, B.G. et al. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from water sources in pig farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. In: IPVS Congress, 15., 1998, Birmingham, England,**Proceedings...Birmingham**, 1998, p.16.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**; Approved Standard – Third Edition, v.28, n.8, 2008.
- COSTA, M.M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasil*, v.26, p.5-8, 2006.
- COWART, R.P. Colibacilosis. In. COWART, R.P. **An Outline of Swine Diseases: A Handbook**. Iowa: Iowa State University Press, 1995, p.54-56.
- EWING, W.N.; COLE, D.J.A. **The Living Gut**: An Introduction to Microorganisms in Nutrition.N. Ireland: Context, 1994, 220p..
- FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. Post-weaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. In: STRAW, B.E.; et al (Eds.). **Diseases of Swine**. 9.ed., Iowa: Blackwell Publishing, 2006, p.649-662.

FRANCIS, D.H. Colibacillosis in pigs and its diagnosis. **Journal Swine Health Production**, v.7, n.5, p.241-244, 1999.

FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **Journal of Swine Health Production**, v.10, n.4, p.171-175, 2002.

FRANCIS, D.H. Post-weaning *E. coli* – diagnosis, treatment, control, and its effect on subsequent growth performance. In: America Association of Swine Veterinarians, 2004, Iowa/US. **Proceedings...**Iowa, 2004, p.495-499.

GUERREIRO, M.G. Escherichia. In: GUERREIRO, M.G.; OLIVEIRA, S.J.; SARAIVA, D. et al. (Eds.). **Bacteriologia Especial**. Porto Alegre: Sulina, 1984, p.178-183.

HAMPSON, D.J. Post-weaning *E. coli* diarrhea in pigs. In: GYLES, C.L.(Ed.). **E. Coli in Domestic Animals and Humans**. London: CABI, 1994, p.171-192.

HUTSCHEMAEKERS, L.W.H. et al. Hygiene of piglet rearing. **Effects of hygiene and the bacterial content of drinking water and feed of baby pigs on various health and performance characteristics on pig farms**. Tijdschrift-voor– Diergeneeskunde, v.101, p.355-364, 1976.

MACÊDO, N.R. et AL. Detecção de cepas patogênicas pela PCR *multiplex* e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1117-1123, 2007.

MARKEY, B.K. et al. *Enterobacteriaceae*. In: MARKEY, B.K. et al (Eds.). **Clinical Veterinary Microbiology**. Dublin: Elsevier, 2013, p.239-275.

MENIN, A. Et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1687-1693, 2008.

MORÉS, N; BRITO, W.D. Rotavírose. In: Doenças dos Suínos. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D.E.S.N.; et al (Eds.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone editorial, 2007, p.319-323.

MORÉS, N.; MORENO, A.M. Colibacilose da terceira semana & Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D.E.S.N.; et al (Eds.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone editorial, 2007, p.71-77.

MORÉS, N.; BARCELLOS, D.E.S.N. Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D.E.S.N.; et al (Eds.). **Doenças dos Suínos**, 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial, 2012, p.116-122.

MORÉS, N.; MORENO, A.M. Colibacilose da terceira semana. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D.E.S.N.; et al (Eds.). **Doenças dos Suínos**, 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial, 2012, p.115-116.

MOTA, R.A. et al.Utilização indiscriminada de antimicrobianos e suacontribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

- NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v.30, p.259-284, 1999.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.
- OGER, Y. Mauvaise qualité de léau de boisson et troubles sanitaires dans les grands troupeaux des truies. **Revue Medecine Veterinaire**, v.12,p.611-616, 1970.
- QUADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.3, p.465-483, 2005.
- RICHARDS, W.P.C.; FRASER, C.M. Coliform enteritis of weaned pigs: A description of the disease and its association with haemolytic *Escherichia coli*. **Cornell Veterinarian**, v.51, p.254-257, 1961.
- SATO, J.P.H. Frequência e associação de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões desmamados. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- SATO, J. P. H. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de leitões desmamados em granjas do Brasil. In: Fórum Internacional de Suinocultura, VII, 2014,Foz do Iguaçu/PR. **Anais...Foz do Iguaçu**, 2014, v.2, p.259-260.
- SHERLEY, M. et al. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.50, p.1539-1546, 2004.
- SHWARZ, S; CHASLUS-DANCLA, E. use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanism of resistance. **Veterinary Research**, v.32, p.201-225, 2001.
- TAKEUTI, K. L. et al. Antibiotic resistance of K88+*Escherichia coli* strains isolated in 1997 and 2012 from diarrhea in post-weaned pigs in Brazil. In: Allen D. Lemann Swine Conference, 2013, Saint Paul. **Proceedings...Saint Paul**, 2013. p. 1-2. 2013a.
- TAKEUTI, K. L. et al. Comparação de multirresistência antimicrobiana entre amostras de *Escherichia coli* K88+ de leitões com diarreia na creche isoladas em 1997 e 2012. In: Abraves, 2013, Cuiabá. XVI Abraves, 2013.**Anais...Cuiabá**, 2013, p. 1-2. 2013b.
- TSEN, H.Y.; JIAN, L.Z. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.585-592, 1998.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. **Drugs**, v.58, p.589-607, 1999.
- VANNUCCI, F.A.; GUEDES, R.M.C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2233-2242, 2009.
- WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, v.279, p.996-997, 1998.