

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

mestrado

BC/46936

IB/81706

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

P371f



Universidade Estadual de Campinas

Mário Paulo Amante Penatti

**F42: Epidemiologia em amostras de
Escherichia coli de origem suína e sua
associação com enterotoxinas**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Mário Paulo Amante
Penatti
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular na área de
Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Campinas, 05 de setembro de 2001

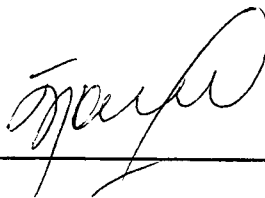
BANCA EXAMINADORA

Titulares :

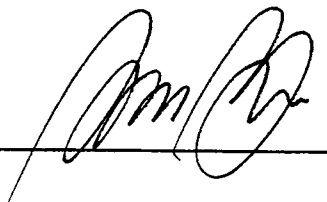
Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



Prof. Dr. Tomomasa Yano



Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Profa. Dra. Gleize Villela Carbonell



12/09/2007

A Deus...

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para a sua realização nos foi concedida bolsa pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Auxílio financeiro ao projeto foi concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradecimentos

Família e afins:

Ao meu pai Reynaldo, pela insistência em me amar, injetando-me a vontade de viver e conseguir... e por deixar-me seguir seu exemplo de Homem.

A minha mãe Marion, pela insistência em me amar, injetando-me a vontade de viver e conseguir... e deixar-me seguir seu exemplo de Mulher.

A minha irmã Sílvia que me fez continuar, sem expor as dificuldades que a vida me imporia.

Aos meus Penatti-Pinese que sem eles nada disso teria acontecido.

Aos Mendes-Oliveira por deixar-me tê-los como familiares.

Ao meu amigo-irmão Hudson Rodrigues Lima, por mostrar-me como realmente a vida é.

Ao meu amigo Guilherme, por guiar-me e encorajar-me nas horas perdidas.

Ao Antônio Francisco Durighetto Júnior pelo desafio proposto...

Às Cléos que acreditaram em mim e depositaram-me “algumas confianças...”

Professores:

Ao meu orientador Professor Dr. Domingos da Silva Leite, pela Sabedoria, Simplicidade, Confiança e Amizade com que nos demos.

Ao Professor Dr. Tomomasa Yano, pelo Conhecimento, Respeito, Sabedoria e Amizade.

À Professora Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti, por fazer parte da minha qualificação.

À Professora Dra. Lucila Costallat Ricci pela participação como banca na minha qualificação.

Ao Professor Dr. Marcelo Brocchi pela paciência nas aulas de Introdução à Engenharia Genética e fazer parte da banca da minha defesa de tese.

À Professora Dra. Clarice Weis Arns pelo exemplo de mulher e educadora que demonstra ser.

À Professora Dra. Gleize Villela Carbonell, por deixar-me tê-la como exemplo de Ciência e amizade e por fazer parte da minha Pré-banca.

À Professora Dra. Dagmar Ruth Stack-Machado por fazer parte da minha Pré-banca, pelas aulas de Imunologia e “chás-e-bolos”.

Ao Professor Dr. Wanderley Dias da Silveira pelos valiosos ensinamentos em Genética Bacteriana, pelos conselhos, pela cumplicidade e pelos cafezinhos.

À Professora Dra. Fernanda Ramos Gadelha pela humildade, sabedoria e amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro pela aula de “Tensegryt”.

À Professora Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro pela compreensão.

Ao Professor Dr. Adilson Leite por introduzir-me na Engenharia Genética.

Ao Corpo Técnico

Ao Erivaldo José da Silva pela invejável humildade e paciência.

À Ana Stella Menegon De Grossoli pela amizade, disposição de trabalho e me ensinar às valiosas técnicas com os animais de laboratório.

À Sueli A. de Carvalho Davanço, pelas “faxinas” que me fazia fazer na vida.

À Mirtis Maria Giaciani Ferraz pelo bom humor que sempre me tratou.

À Paulla Salek Siqueira Porto pelo ânimo.

Ao Evandro Luís Rodrigues Pedro pelas “sangrias brancas”.

À Alessandra Ferreira pelas extrações de plasmídios.

Ao Geneci Fernandes Davi pela presteza.

À Isabel Argenton de Souza pela preparação das aulas práticas de Microbiologia.

Ao Corpo Administrativo

À secretária Lúcia Helena Vicentim, pela presteza, conhecimento, sabedoria e eficiência.

À secretária Maria de Lourdes Fagundes pela amizade, pelo exemplo de vida, pela eficiência e pelo carinho.

Colegas do Laboratório e afins:

Ao Alex Souza da Silva que mostrou-me que mesmo passando da idade, conseguiria... e por deixar-me ser seu amigo.

Ao meu amigo Geórgio F. Valadares, pelo tratamento igual que nos demos.

A minha amiga Sílvia Simi, que por além de tudo que fez por mim, me aconselhava..., por me deixar seguir seu exemplo... e por morar no 1303.

A minha amiga Rosabel Falcón Marquez, pela insistência em me fazer “andar...”, pela cópia de vida que me deixou tirar e por melhorar o meu espanhol...

Ao Marcelo Martins Escobar pelas injeções de ânimo e jantares da dona Maria...

À Luciana Maria de Hollanda pelas intermináveis digitações e ensinamentos da vida e do computador... das Olgas, Ilaúdias e Freds.

À Patrícia Regina Kitaka pelo exemplo de continuidade.

À Caroline Arantes Magalhães pelos trabalhos sobre *Pseudomonas* e pelas lembranças de Ribeirão Preto.

À Cleide Ferreira Catani pela amizade e pelo exemplo que me deixou seguir como cientista.

À Heloísa Helena M. Della Coleta pela amizade que criamos.

Ao Cláudio Roberto da Nóbrega Amorim pela calma que me transmitiu.

À Ana Cláudia Sampaio Costa Bastos pela sua certeza em continuar.

À Eneida Gonçalves Lemes Marques pelas músicas e ensinamentos sobre *Listeria*.

À Márcia Tomy Furumura pelo convívio e respeito.

À Márcia Regina Salvadori pela meiguice e sabedoria.

Ao Luciano Moura Martins pelo aprender.

À Carolina Yaeko Namasu pelo início à Ciência.

À Jane Martha Graton Mikcha pela insistência em continuar.

À Rosimary de Jesus Gomes Turri pelo exemplo de vida.

Ao Aldo A. Proietti Júnior pelos incansáveis e-mails.

À Ana Lúcia Rodrigues de Soledade pela presteza.

À Verena Hildegard Gyárfás Wolf pelo excelente convívio na disciplina de Imunologia.

Ao Daniel de Freitas Coradi pelo contato que tivemos.

À Ângela Barbosa Bonifácio de Oliveira pelo empréstimo das aulas de Qualificação e pelas quartas-feiras.

À Débora Lopes da Silva por dividir os almoços no RU.

Ao Gerson Nakazato pelo exemplo de perseverança e humildade.

À Keila Jordão Ribeiro Pagnani pelas discussões.

À Michelli Angelini pela sua meiguice.

À Cristiane Nucci pelo convívio.

À Yliria Ferreira da Silva pelas dificuldades iniciais que passamos juntos.

Ao Marcelo Lancelotti pelas primeiras extrações de plasmídios.

À Regina Célia Freitas D'Arce pelos cafês.

À Lia Treptow Coswig pelos conselhos.

À Helena Galicchio Domingues pela vivacidade e sinceridade.

À Renata Servan de Almeida pelo pouco convívio.

À Maria Célia Garcia Bezzan Monteiro pelas injeções de ânimo.

À Jaqueline Campalans Barnier pelos “buenos dias”.

À Jane Kelly Finzi pela meiguice e pelos pães de queijo.

À Cristina Braga de Brito Lira pela timidez e pelos pães de queijo.

Ao Luís Henrique Gonzaga Ribeiro pelos bons dias.

À Débora Regina Machado Silva pelos jantares e pela amizade e à Beatriz Machado Silva pela graciosidade e deixar-me vê-la crescer.

Ao Sérgio Augusto Carbonell pelas quartas-feiras.

Ao Júlio Funabashi Júnior pelo volei.

Ao André Catani pela amizade e confidências trocadas.

Ao Bruno Catani pela coleção de tartarugas.

À Vanda A. Quintino pelo caminho guiado no primeiro dia de UNICAMP, e pelos serviços de fotocópias.

À Luciana Francisco pelos serviços de fotocópias.

À Ana Lúcia Pistoni Campregher pelos serviços de fotocópias e pelos pagamentos que me deixava fazer nos finais de cada mês.

À Adenizia Jácome da Costa por sempre servir-me bem humorada.

À Neusa de Souza Mendonça pela maravilhosa comida e queijos-quentes.

À Rita Alves Coutinho pela humildade e pelos queijos-quentes.

Ao Hideraldo José de Lima, por mostrar-se amigo e também deixar-me fazer “fiado”.

Ao Wagner A. Montagner pelo primeiro leite com café-pão com manteiga na UNICAMP.

À Eneida de Mattos Faleiros e à Maria Helena Ribeiro Godoy, colegas e amigas, que sem seus esforços eu não teria iniciado minha vida científica propriamente dita.

Instituições:

À Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia que proporcionou a minha saída para iniciar a vida científica propriamente dita.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela “bolsa ajuda de custo”.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Sumário

Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
Colibacilose Neonatal	1
<i>Escherichia coli</i>	3
Fímbria F42	10
2. Objetivos	13
3. Material e Métodos	14
Amostras bacterianas.....	14
Meios de Cultura.....	14
Obtenção de anti-soro específico anti-F42.....	15
Detecção do Fator de Colonização F42.....	15
Determinação dos sorogrupos prevalentes.....	16
Detecção de enterotoxinas por PCR.....	17
4. Resultados	21
5. Discussão	27
6. Conclusões	34
7. Referências Bibliográficas	35
8. Manuscrito	46

RESUMO

Este estudo determinou a presença do fator de colonização (FC) F42 em 387 amostras de *Escherichia coli* isoladas de suínos neonatos, sendo 168 amostras provenientes de fezes diarreicas e 219 de fezes não diarreicas. Ensaio de soroglutinação determinaram a presença de F42 em 28 (7,23%) das 387 amostras de *E. coli*; sendo 12 (7,1%) amostras originárias de fezes diarreicas e 16 (7,3%) de não diarreicas. As amostras de *Escherichia coli* portadoras de F42 foram estudadas através de PCR quanto a presença de genes das enterotoxinas, onde não verificamos a ocorrência de genes da enterotoxina termolábil, contrastando com a alta frequência observada para ST-II (75%), 54% para ST-I, e a associação entre ST-I e ST-II em 35,7% das amostras, indicando forte associação do FC F42 com as enterotoxinas termoestáveis. O sorogrupo das amostras F42 positivas foi determinado, sendo o sorogrupo O8 o prevalente (32,1%) seguido dos sorogrupos O98 (10,7%) e O9 (7,1%). Outros sorogrupos também foram identificados O1, O11, O15, O18, O32, O35, O49, O73, O84, O101, O110, O112. Demonstramos a importância do FC F42 na etiologia da diarreia neonatal e sugerimos que na formulação de uma vacina contra a Colibacilose neonatal suína seja incluído o FC F42. Concluimos assim, que o FC F42 está presente no campo, podendo ser isolado tanto de animais diarreicos como de sadios.

ABSTRACT

The objectives of this survey were to determine the presence of the colonization factor F42 in 387 *Escherichia coli* isolated from newborn piglets, being 168 strains proceeding from diarrheic and 219 from not diarrheic stools. Agglutination test determined the presence of F42 in 28 (7.23%) of the 387 *E. coli* strains; being 12 (7.1%) strains isolated from diarrheal and 16 (8.3%) from non diarrheic stools. Thus, we conclude that the FC F42 is present in the field, being able to be isolated in both diarrheic and healthy animals. Through Polymerase chain reaction (PCR) in F42 positive strains we could screen the extent of the genes presence of the enterotoxins (ST-I, ST-II, LT-I and LT-II). We do not verify the occurrence of genes of the thermolabile enterotoxins (LT-I and LT-II). It contrasts with the high frequency observed for ST-II (75%) and for ST-I (54%). The association between ST-I and ST-II in 35.7% of strains, indicates an strong association of the FC F42 with the thermostable enterotoxins. Serogroups of F42 positive strains were determined. Serogroup O8 revealed prevalent (32.1%), followed by the serogroups O98 (10.7%) and O9 (7.1%). Others serogroups were also identified O1, O11, O15, O18, O32, O35, O49, O73, O84, O101, O110, O112. We have proved the importance of the FC F42 in the etiology of the neonatal diarrhea and suggest a design and development of a vaccine will be prevent the porcine colibacillosis.

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira conta com um plantel de 36,5 milhões de cabeças colocando-se entre as oito principais produtoras mundiais de carne suína ([http:// www.suino.com.br](http://www.suino.com.br)). Nas últimas décadas, a mesma tem buscado um mercado cada vez mais especializado devido a grande demanda da carne suína, visto que é a carne mais consumida no mundo ([http:// www.suino.com.br](http://www.suino.com.br)).

Devemos então, enquanto país em desenvolvimento, considerar a suinocultura como uma das principais atividades econômicas. Em detrimento a isso, a colibacilose neonatal preocupa a suinocultura brasileira bem como todos os outros países que tem esta atividade como uma das principais fontes econômicas, pois esta enfermidade pode diminuir drasticamente o plantel de suínos.

COLIBACILOSE NEONATAL:

Doença que acomete os leitões nos primeiros cinco dias de vida, produzindo uma diarreia intensa seguida de desidratação e alta mortalidade. A doença está distribuída mundialmente e pode afetar todos ou apenas alguns leitões da leitegada. O aparecimento da diarreia ocorre comumente 24 horas após o parto, no entanto, a diarreia pode aparecer 2 a 3 horas após o nascimento.

Alguns leitões podem morrer sem apresentar diarreia, enquanto outros mostram diversos graus desta. A diarreia é de coloração branco - amarelada podendo variar para marrom. Depressão, apatia e desidratação são sinais clínicos comumente observados e nos casos severos, a mortalidade é alta. Não há lesões microscópicas. Macroscopicamente

observa-se o intestino repleto de líquido, muco e gás e a desidratação da carcaça. (<http://www.suino.com.br>).

A colibacilose neonatal e a diarreia pós desmame acometem leitões nos primeiros cinco dias de vida e após vinte e um dias, produzindo uma diarreia intensa seguida de desidratação e, se não tratada a tempo, causa altas taxas de mortalidade.

Existem muitos fatores que influenciam a doença, dentre os quais podemos citar:

1- Temperatura ambiental: a temperatura ambiente quando foge da ideal (30 a 32°C) para leitões recém-nascidos, há uma redução na ingestão de colostro havendo um gasto de mais energia para a manutenção da temperatura corporal com uma consequente predisposição às infecções bacterianas.

2- Contaminação das instalações: tem uma direta relação entre a infecciosidade ambiental e o aparecimento das diarreias, havendo aí um aumento do nível de agressão, superando a capacidade de resistência do organismo, com isso ocorre o desenvolvimento da doença a nível clínico.

3- Umidade ambiental e a presença de corrente de ar, fazem com que o leitão perca calor; a falta de bebedouro pode induzir o leitão, a suprir suas necessidades de líquido, bebendo urina ou água do bebedouro da porca, que muitas vezes contém restos alimentares, provocando assim um desequilíbrio digestivo no leitão e o aparecimento da diarreia.

4- A baixa imunidade transferida pelo colostro: onde leitões filhos de fêmeas primíparas são mais susceptíveis à infecções, pois as porcas jovens ainda não entraram em contato com certos microrganismos e não desenvolveram uma imunidade que possa ser transferida aos leitões, pelo colostro.

5- O stress do leitão: ao ser separado da mãe, torna-o mais susceptível à infecções.

Escherichia coli

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tribo *Escherichia*, de ocorrência freqüente na microbiota intestinal humana e de animais, colonizando o hospedeiro desde suas primeiras horas de vida na qualidade de comensal (Edwards & Ewing, 1972; Nataro & Kaper, 1998).

Mesmo integrando a microbiota intestinal humana e de animais homeotérmicos, algumas linhagens podem apresentar-se patogênicas devido à capacidade que possuem de colonizar, invadir e/ou destruir tecidos, produzir toxinas ou de captar produtos essenciais do hospedeiro, causando infecções extraintestinais (sepsis, meningite, infecções do trato urinário, peritonites etc.) ou infecções intestinais (diarréia, disenteria, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica etc.) (Levine, 1987; Robins-Browne, 1987; Blanco *et al.*, 1992; Nataro & Kaper, 1998).

Como agentes de infecções intestinais e de acordo com Nataro & Kaper (1998), são admitidos atualmente pelo menos seis diferentes categorias de *E. coli*, definidas de acordo com o conjunto de genes de virulência que albergam e os sinais e sintomas que evocam. Estas categorias compreendem: a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), a *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e a *E. coli* enteroinvasora (EIEC).

Estas categorias de *E. coli*, além de acometerem humanos, podem acometer animais de interesse econômico como suínos, bovinos e ovinos, aumentando assim o índice de mortalidade dos animais jovens (Corrêa & Correia, 1992; Nataro & Kaper, 1998).

Dentre estas seis categorias de *E. coli* relacionadas com enteropatogenias, *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) têm grande importância, pois podem causar enfermidades infecciosas ou infecto-contagiosas agudas ou sub agudas de apresentação clínica polimorfa;

acometendo crianças geralmente com até cinco anos de idade, provocando diarreia, sendo responsáveis também pela diarreia dos viajantes, em adultos, mas ETEC acomete principalmente bovinos e suínos jovens (González & Blanco, 1987; Nataro & Levine, 1994; Nataro & Kaper, 1998).

O antígeno somático (O) de *E. coli*, que diferencia amostras virulentas das não virulentas é um antígeno lipopolissacarídico, complexo, estável a 100°C ou a 120°C, dividido em dois grupos, baseados em sua mobilidade em campo elétrico, onde o primeiro grupo é imóvel e usualmente está associado à doenças extraintestinais (ausência de compostos ácidos no lipopolissacarídeo (LPS) que compõe a parede celular da bactéria) e o segundo grupo que apresenta mobilidade para a porção catiônica na eletroforese, usualmente associa-se a doenças entéricas (presença de compostos ácidos no LPS). O gene para o antígeno O pode sofrer mutações, apresentando variações suaves O⁺ e O⁻, onde normalmente O⁻ são ditas colônias rugosas (perderam a especificidade antigênica), pois auto-aglutinam em salina e por isso não podem ser sorotipadas nos procedimentos usuais de laboratório (Lior, 1994).

Nas colibaciloses, alguns sorogrupos (O6, O8, O9, O20, O25, O45, O63, O64, O78, O101, O115, O128c, O138, O141, O147, O148, O149 e O157) têm sido descritos como associados a fatores de colonização envolvidos em diarreia de suínos jovens (González & Blanco, 1987; Alexander, 1994; González & Garabal, 1998; Campos & Trabulsi, 1999). Söderlind *et al.* (1988) relataram os sorogrupos O8, O64, O101, O141 e O149; Woodward & Wray (1990) detectaram em seus experimentos a prevalência do sorogrupo O138; Nagy *et al.* (1990) relataram a presença de O141, O149 e O157 nas amostras de ETEC que acometiam leitões com diarreia; Garabal *et al.* (1997) demonstraram como prevalentes os sorogrupos O8, O9, O20, O101, O138, O141 e O149; Kwon *et al.* (1999) demonstraram os sorogrupos O20,

O162, O141 e O149; Nagy & Fekete (1999), demonstraram que os sorogrupos: O8, O9, O20, O101, O115, O139, O141, O147, O149 e O157 apareciam com maior frequência em seus experimentos; Parma *et al.* (2000) relataram a prevalência do sorogrupo O64, seguido de O8, O9, O101, O138, O139, O149 e O162.

A patogenicidade de ETEC se dá pela combinação de dois fatores de virulência: a expressão de fatores de colonização específicos, os quais permitem à bactéria colonizar o epitélio intestinal, e a habilidade de sintetizar enterotoxinas que causam a liberação de água na luz intestinal, o que resulta em fezes líquidas (Gyles, 1986; Holland, 1990).

As enterotoxinas sintetizadas por ETEC dividem-se em 2 grupos: o grupo das enterotoxinas termoestáveis do tipo I (ST-I ou ST-a), e do tipo II (ST-II ou ST-b) e o grupo das enterotoxinas termolábeis do tipo I (LT-I) e II (LT-II) (Campos & Trabulsi, 1999).

Vários estudos envolvendo fatores de colonização e a produção de enterotoxinas, como as enterotoxinas termoestáveis ST-I e ST-II, e termolábeis LT-I e LT-II, têm buscado explicar o papel de *E. coli* como integrante da microbiota intestinal, como indicadora de poluição no ambiente e alimentos, como modelo de pesquisa microbiológica que envolve Bioquímica e Genética Molecular e como um patógeno em várias espécies animais, inclusive no homem (Levine, 1987). A habilidade de sintetizar toxinas também caracteriza ETEC na infecção diarreica de suínos jovens.

As enterotoxinas termoestáveis do tipo I (ST-I ou ST-a) e do tipo II (ST-II ou ST-b) são proteínas estáveis a 100°C por 30 minutos, de baixo peso molecular, pouco imunogênicas e codificadas por gene localizado em plasmídio. A enterotoxina ST-I é uma exotoxina solúvel em metanol, contendo seis resíduos de cisteína que permitem estabelecer pontes de dissulfeto que conferem a esta toxina resistência à temperatura e à hidrólise enzimática (citado por

Blanco *et al.*, 1993). A sua ação em estimular a enzima guanilato-ciclase presente nas células, eleva os níveis de Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) no jejuno e íleo, resultando em secreção de líquido para luz intestinal (diarréia). A ST-I possui duas variantes genéticas, que são a STp (suínos) e a STh (humanos), constituídas por 18 e 19 resíduos de aminoácidos respectivamente, que exibem grande homologia entre si e podem ser sobrepostos a partir da região carboxi-terminal, o que revela, além da presença de um resíduo de aminoácido a mais em STh, diferença em quatro outros resíduos. Estas diferenças concentram-se na região amino-terminal (três resíduos) e apenas uma na região carboxi-terminal. A porção carboxi-terminal mais conservada está implicada na atividade biológica dessas enterotoxinas (Gyles, 1992).

Para se detectar a presença de enterotoxina ST-I nas amostras de ETEC, o ensaio clássico é a prova do camundongo recém-nascido, onde basicamente se avalia o acúmulo de líquido no intestino de camundongo após a administração de sobrenadante de cultura livre de bactérias (Dean *et al.*, 1973). Ensaio “*in vitro*”, utilizando células eucarióticas (González & Blanco, 1987), assim como técnicas moleculares como hibridização, e reação de polimerase em cadeia (González & Blanco, 1987, Gyles, 1994), têm sido desenvolvidas para detecção de enterotoxina termoestável.

A enterotoxina ST-II, induz danos histológicos no epitélio intestinal, ocasionando perda das vilosidades e atrofia parcial nos vilos. Altera o equilíbrio hidrossalino da mucosa do intestino delgado. Algumas amostras de ETEC de origem suína sintetizam a ST-II, sendo esta raramente encontrada em amostras de origem humana (Echeverria *et al.*, 1984).

Os ensaios para a detecção desta enterotoxina são: a prova da alça ligada em rato e em porco de 5 a 7 semanas (Gyles, 1979; Whipp, 1990). Estes ensaios consistem basicamente em inocular uma concentração conhecida de enterotoxina por via intra-intestinal em alça de

jejuno e íleo, em animais previamente preparados. Observa-se o acúmulo de líquido nas alças e alterações morfológicas nas células intestinais depois de um determinado tempo (18h.).

As enterotoxinas termolábeis do tipo I (LT-I) e II (LT-II) são constituídas por proteínas inativadas a 60°C por 15 minutos, codificadas por genes plasmidiais, imunogênicas, com alto peso molecular. Possuem estruturas compostas por subunidades A e B, sendo a subunidade B formadora de um pentâmero que se liga aos receptores gangliosídeos presentes na membrana dos enterócitos, monoasilgangliosídeo I (GM₁) para LT-I; e diaosilgangliosídeo 1b (GD_{1b}) e diaosilgangliosídeo 1a (GD_{1a}) para LT-II, enquanto a subunidade A é responsável pelas alterações intracelulares no hospedeiro (estimulação da adenil-ciclase através de sua atividade enzimática ADP-ribosilante). Nesta classe, encontram-se as LTh (humano) e as LTp (suíno) que diferem em apenas um resíduo de aminoácido (Dykes *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1987).

As enterotoxinas termolábeis do tipo I (LT-I) têm uma relação físico-química, biológica e estrutural com a toxina colérica (CT), apresentando cerca de 80% de homologia na sequência de aminoácidos das subunidades A e B, resultando numa infecção mais branda e mais curta do que a causada pelo *Vibrio cholerae*, tendo identidade sorológica com CT e atividade sorológica neutralizada pelo anti-soro antitoxina colérica.

As enterotoxinas termolábeis do tipo II (LT-II) são estruturalmente semelhantes às LT-I. São compostas também por duas subunidades A e B, sendo que a A apresenta cerca de 55% de homologia com LT-I e ativa adenil-ciclase. A subunidade B não apresenta homologia com a mesma subunidade da LT-I e CT, não sendo neutralizada pelo anti-soro anti-LT ou anti-CT (Holmes *et al.*, 1986). A LT-II pode provocar a morte em camundongos quando injetada intra peritonalmente.

Dentre os ensaios biológicos para detecção das LT o teste da alça ligada em coelho (De & Chatterjee, 1953) tem sido o mais utilizado. Também ensaios em células eucarióticas, ensaios imunológicos, enzimáticos ou de hibridização de DNA ou PCR são técnicas empregadas para a detecção destas enterotoxinas (González & Blanco, 1987; Gyles, 1994).

Guth *et al.* (1986) descreveram dois membros distintos da família LT-II – LT-IIa e LT-IIb, apresentando 71% e 66% de identidade entre as subunidades A e B respectivamente. A LT-IIa liga-se ao gangliosídeo GD1b e LT-IIb liga-se a GD1a (Sears & Kaper, 1996). A produção destas enterotoxinas, pelas ETEC ocorre numa baixa frequência, quando relacionadas com a expressão dos fatores de colonização (Parma *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 1999).

Em amostras de ETEC que infectavam suínos e bovinos, foi demonstrado que a capacidade patogênica desta se dava em função de seu mecanismo enterotóxico e de um segundo fator do tipo adesivo, sem o qual essas amostras não conseguiam desencadear os processos diarreicos (Smith & Gyles, 1970; Smith & Lingood, 1972; Nagy & Fekete, 1999). Até o momento os fatores de colonização mais importantes descritos para as amostras de ETEC de origem suína são:

O fator de colonização F4 (K88) descrito pela primeira vez por Ørskov *et al.* (1961). Este, ocorre em amostras de origem suína, apresenta hemaglutinação resistente ao açúcar D-manose (MR) com eritrócitos de cobaio e de galinha (Gaastra & de Graaf, 1982), pode apresentar variantes antigênicas ab, ac, ad (Choi & Chae, 1999), sendo codificado por genes plasmidiais. Em amostras de origem suína a ocorrência do fator F4 pode estar associada com maior frequência à produção de LT do que à produção de LT/ST ou ST-I e ST-II isoladamente (Castro *et al.*, 1984). Segundo Evans *et al.*, (1986) e Nagy *et al.*, (1990) a ocorrência deste

fator em diarreia de suínos jovens varia entre 30% a 60%. Este fator geralmente ocorre associado aos sorogrupos: O8 (Söderlind *et al.*, 1988); O149 (Nagy *et al.*, 1990); O8, O45, O138, O141, O147, O149 e O157 (de Graaf & Gaastra, 1997); O149 (Garabal *et al.*, 1997); O8, O9, O20, O32, O35, O45, O78, O101, O117, O147, O149, O157 (González & Garabal, 1998); O8, O141 e O149 (Nagy & Fekete, 1999). O F4 também aparece associado as enterotoxinas na diarreia de suínos jovens: LT/ST (Gaastra & de Graaf, 1982), ST-I (Garcia *et al.*, 1987), LT/ST-I (Nagy *et al.*, 1990); ST-II/LT-I (Blanco *et al.*, 1997); ST/LT (de Graaf & Gaastra, 1997); LT/ST (Garabal *et al.*, 1997); LT/ST (González & Garabal, 1998); ST-I (Mainil *et al.*, 1998).

O fator de colonização F5 (K99) foi descrito pela primeira vez como um antígeno capsular (K) comum por Smith & Linggood (1972). Em 1975, Ørskov *et al.* (1975) descreveram-no em amostras de *E. coli* de fezes diarreicas de suínos, bovinos e ovinos. Apresenta hemaglutinação MR com eritrócitos de cavalo e de carneiro (Gaastra & de Graaf, 1982). É codificado por genes plasmidiais, e encontrado associado à produção de ST-I em amostras de fezes de suínos e bovinos (Gaastra & de Graaf, 1982; Mainil *et al.*, 1998). É encontrado num percentual variável de até 40% (Evans *et al.*, 1986; Garabal *et al.*, 1997). Ocorre associado geralmente aos sorogrupos O64, O101 (Gaastra & de Graaf, 1982); O64, O101 (Söderlind *et al.*, 1988); O8, O9, O20, O64, O101 (de Graaf & Gaastra, 1997); O8 (Garabal *et al.*, 1997); O9, O64, O101 (González & Garabal, 1998); O8, O20 e O101 (Nagy & Fekete, 1999).

O fator de colonização F6 (987P) (Isaacson *et al.*, 1977) não apresenta hemaglutinação frente à D-Manose (MS), é constituído por subunidades de 20 KDa. (Gaastra & de Graaf, 1982). Sua codificação é de origem cromossômica. Ocorre geralmente em amostras de *E. coli*

de origem suína, é encontrado sempre associado à produção de ST (Guineé & Jansen, 1979; Moon *et al.*, 1980; Gaastra & de Graaf, 1982; Garabal *et al.*, 1997; de Graaf & Gaastra, 1997 González & Garabal, 1998 e Mainil *et al.*, 1998). Este fator ocorre numa percentagem entre 25% (Evans *et al.*, 1986) e 32% (Garabal *et al.*, 1997). Associa-se também aos sorogrupos: O9, O20, O141 (Gaastra & De Graaf, 1982); O8, O9, O20, O21, O46, O101, O138, O141, O147, O149 (De Graaf & Gaastra, 1997); O9, O20, O141 (Garabal *et al.*, 1997); O9, O20, O21, O141 (González & Garabal, 1998).

O fator de colonização F41 (Morris *et al.*, 1978) é encontrado em amostras de *E. coli* de origem bovina e suína, apresentando hemaglutinação MR com eritrócitos humano, de cobaio, de cavalo e de carneiro. Encontra-se associado frequentemente à produção de F5 e ST-I (de Graaf & Gaastra, 1997; González & Garabal, 1998). É codificado por genes cromossômicos. (Gaastra & de Graaf, 1982). Geralmente encontra-se associado aos sorogrupos: O9, O101 (Gaastra & de Graaf, 1982); O101 (Söderlind *et al.*, 1988); O9, O20, O64, O101 (de Graaf & Gaastra, 1997); O9, O30, O101, O141 (Garabal *et al.*, 1997); e O101 (González & Garabal, 1998).

Fímbria F42

O fator de colonização F42 foi descrito inicialmente por Yano *et al.* (1986), tendo sido isolado de amostras de ETEC do sorogrupo O8 isoladas de suínos com diarreia neonatal, mostrou-se associado à produção da toxina termoestável ST-I. Tais amostras apresentaram hemaglutinação MR frente às hemácias humanas, de galinha, carneiro, cobaio e cavalo; e aderência difusa em células HeLa (célula de adenoma de colo uterino humano) bem como em células epiteliais de intestino de leitão. Em microscopia eletrônica, observou-se a presença de

estruturas do tipo fimbria quando as amostras foram cultivadas a 37°C, mas não quando incubadas a 18°C.

As condições de crescimento e produção do fator de colonização F42 foram descritas por Leite *et al.* (1988), que demonstraram que a produção do F42 em Meio Mínimo (Davis & Mingioli, 1950) era glicose dependente e que a adição de Alanina ou Acetato de Sódio ao meio reprimia a sua expressão, a qual também foi inibida quando o pH do meio de cultura era inferior a 7,4.

Este fator de colonização (F42) foi purificado por cromatografia em coluna de Sepharose 4 B, seu peso molecular estimado em 31 KDa e com ponto isoelétrico em pH 3,2. Na imuno eletroforese, observou-se que não havia reação cruzada entre o anti-soro anti-F42 e os antígenos de aderência hemaglutinantes de origem suína K88, K99 e F41 (Leite *et al.*, 1988).

Silveira *et al.* (1987) relataram que a amostra de *E. coli* 567-7 produtora de F42, apresentou seis plasmídios, entre eles um não conjugativo (21,1 MDa) que codificava o fator de colonização F42 e a enterotoxina ST-I.

Castro *et al.* (1990) demonstraram que as amostras de *E. coli* que expressavam o fator de colonização F42 (F42⁺), causavam diarreia em leitões quando inoculadas por via oral. Após 42 horas da inoculação, foi detectado por imunofluorescência indireta, que a amostra bacteriana colonizava o intestino delgado destes animais. Mostraram também o re-isolamento da amostra nas fezes diarreicas desses animais e a detecção de ST-I.

Em 1993, Sperandio & Silveira propuseram a igualdade entre os fatores de colonização F41 e F42, frisando que o F42 possuía a mesma subunidade de peso molecular que F41 (29,294 KDa), apresentava estrutura fibrilar, era reconhecido pelo anti-soro F41 e a sonda

molecular do gene F41 reconhecia as amostras de *E. coli* produtoras de F42; e que somente o teste de hemaglutinação MR com eritrócitos de galinha como demonstraram Yano *et al.* (1986), não era conclusivo para diferenciar o fator de colonização F41 do F42.

Em 1997, Leite *et al.* (1997) verificaram que a hemaglutinação causada pelo F42 era sensível ao carboidrato N-acetil-galactosamina. Estes mesmos autores, estudando os possíveis receptores para F42, mostraram, através de tratamento enzimático, que este é de natureza glicoprotéica, e que nos eritrócitos mais de uma estrutura pode atuar como receptor para este fator de colonização. Verificaram também, através de ensaios antigênicos, que a reação de hemaglutinação para F42 com diferentes eritrócitos era devido à presença de estruturas moleculares semelhantes na membrana dos eritrócitos.

Estudos epidemiológicos realizados por Zerbini (1993) relataram a presença de F42 em 7,4% de amostras de *E. coli* isoladas de suínos durante as primeiras semanas de vida. Mais recentemente, Brito (1997) relatou a presença de F42 em 29% das amostras de *E. coli* isoladas de suínos com bacteriúria. Entretanto, estes autores não correlacionaram a presença do F42 com enterotoxinas e antígeno somático.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo, a realização de um estudo epidemiológico do fator de colonização F42 em amostras de *E. coli* isoladas de leitões com ou sem diarreia, onde se procurou associar a presença de F42 com as enterotoxinas ST e LT e com o antígeno somático.

2. OBJETIVOS.

1. Determinar a presença do fator de colonização F42 em amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarreicas e não diarreicas de suínos neonatos.
2. Verificar a possível associação entre a presença de F42 e as enterotoxinas LT e ST através de métodos moleculares.
3. Determinar os sorogrupos prevalentes nas amostras de *E. coli* F42 positivas.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Amostras Bacterianas.

3.1.1. Foram utilizadas como padrões, as seguintes amostras de *E. coli*: -

567/7 O8:H⁺ F42⁺ ST-I⁺;

B41 O101 F5⁺ ST-I⁺;

40 T – LT-I⁺;

P17 – ST-II⁺;

PCLT-II – LT-II⁺;

K12.

3.1.2 Amostras de *E. coli* de campo.

Utilizamos o total de 387 amostras de *E. coli* isoladas de 191 amostras fecais de suínos neonatos. Sendo 168 amostras isoladas de 56 amostras fecais diarréicas e 219 amostras provenientes de 135 fezes não diarréicas.

Amostras estas mantidas em meio Lignières a temperatura ambiente e pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Antígenos Bacterianos II do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, S.P.

3.2. Meios de Cultura.

Para o desenvolvimento dos ensaios foram utilizados os seguintes meios de cultura:

Caldo Infusão de cérebro e coração de boi (BHI) (Difco);

Ágar MacConkey (Difco);

Meio Mínimo (MM) (Davis & Mingioli, 1950);

Meio Lúria Bertani (LB) (Sambrook & Maniatis, 1989);

Tryptic Soy Agar - TSA (Biobrás)

3.3. Obtenção de anti-soro específico anti-F42.

Foi utilizado o anti-soro anti-F42 anteriormente obtido pela imunização de coelhos com antígeno F42 semi-purificado seguindo técnica descrita por Yano *et al.* (1986). A amostra de ETEC 567/7 cultivada em MM e incubada a 16°C por 48h. foi utilizada para absorver o anti-soro anti-F42.

3.4. Detecção do fator de colonização F42.

A detecção do fator de colonização F42 foi realizada por soroaglutinação em lâmina à temperatura ambiente. As amostras bacterianas foram cultivadas em meio Mínimo contendo 1,5% de ágar e 0,5% de glicose, incubadas a 37°C por 18h. de acordo com Leite *et al.*, (1994). Um raspado do crescimento bacteriano foi homogeneizado em solução de NaCl 0,15M, outro raspado foi também homogeneizado com anti-soro específico anti-F42 previamente absorvido e diluído.

A observação de auto-aglutinação da amostra em estudo em solução de NaCl 0,15M indicou a inespecificidade do antígeno, caracterizando a amostra como rugosa. A não aglutinação indicou a especificidade antigênica, caracterizando a amostra como lisa e, quando aplicada frente ao anti-soro específico, a observação de aglutinação, indicou a presença do fator de colonização F42.

3.5. Determinação dos sorogrupos prevalentes.

A determinação do sorogrupo prevalente das *E. coli* F42⁺ foi realizada através da técnica em microplaca descrita por Guineé *et al.* (1972) e modificada por Blanco *et al.* (1996), utilizando um conjunto de anti-soros adquirido do Laboratório de Referência de *E. coli* (LREC) da Faculdade de Veterinária/Campus de Lugo da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

3.5.1. Preparação da suspensão bacteriana.

As amostras de *Escherichia coli* foram cultivadas em TSA e incubadas por 18 horas a 37°C. Decorrido este período, as células bacterianas foram suspensas em 2 mL de solução de NaCl 0,15M onde a concentração bacteriana foi ajustada numa turbidez equivalente ao tubo de número 6 da escala nefelométrica de McFarland ($1,8 \times 10^9$ bactérias/mL). As suspensões foram divididas em dois grupos:

1) Onde verificou-se a presença dos sorogrupos O8, O9, O29, O101, as suspensões foram autoclavadas a 121°C por 2,5 horas inativando assim o antígeno K para desmascarar o antígeno O. Após resfriamento, em cada tubo de ensaio, foram adicionados igual volume (2 mL) de salina formalinizada com violeta de genciana (0,005%, p/v).

2) Para verificação da presença dos demais sorogrupos, as suspensões foram aquecidas a 100°C em Banho Maria por 1 hora, onde após o esfriamento foi adicionado igual volume de solução salina formalinizada com violeta de genciana (0,005%, p/v).

As suspensões bacterianas que formaram grumos após o tratamento térmico, foram consideradas rugosas e excluídas por serem impróprias para o experimento.

3.5.2. Soroaglutinação em Microplaca.

Em placas de poliestireno para microtitulação em fundo V, contendo 50µL de suspensão bacteriana foram adicionados 50µL do soro diluído 1:80. As placas foram incubadas em estufa 37°C por 18 horas. Após este período, foi realizada a leitura visual do resultado. Foram consideradas positivas, as reações onde houve a formação de uma retícula (malha) azulada e não observou-se precipitação das bactérias. Onde foi observado o acúmulo de bactérias formando um precipitado (botão) azul, o resultado foi considerado negativo e quando uma amostra não mostrava nenhum destes comportamentos, ela foi considerada não tipável.

3.6. Detecção de Enterotoxinas por PCR .

3.6.1. Extração de DNA genômico das amostras.

Para a realização da técnica de PCR, as extrações de DNA genômico foram realizadas segundo Van Soolingen, (1993).

3.6.2. Quantificação do DNA genômico.

O DNA genômico teve sua concentração e pureza determinados por leitura em espectrofotômetro (λ 260 e λ 280) sendo obtidas pelas fórmulas abaixo descritas.

Concentração: $\lambda 260 \times 50 \times \text{Fator de diluição do DNA na cubeta (100)} = \mu\text{g/mL}$.

Pureza: $\lambda 260 / \lambda 280 = 1,7 \approx 2,0$.

3.6.3. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

As reações foram realizadas segundo Blanco *et al.* (1997), com modificações. Como

amostras controle, foram utilizadas as amostras de *E. coli* listadas no item 3.1.1.

Para as reações foram utilizados: 2µl de dNTP contendo 20mM de cada um; 1µl de *Taq* polimerase (1U/µl); 3µl de MgCl₂ 25mM; 5µl de tampão 10X para PCR; 5µl de amostra (200ng); 1µl do iniciador 1 (50pmol); 1µl do iniciador 2 (50pmol); e água deionizada (Milli-Q) q.s.p. 50µl.

As soluções foram pré-aquecidas sem a enzima *Taq* polimerase a 94°C/10' e, posteriormente, submetidas a 30 ciclos de 94°C/2', TA° C/2' e 72°C/1, onde TA° C foi a Temperatura de Anelamento de cada par de iniciadores apresentados na Tabela 1, a saber: LT-I - 47° C, LT-II - 48° C, ST-I - 50° C e ST-II - 50° C. Ao final de cada reação as misturas foram submetidas a 72° C/7'.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Gene	Toxina	Seqüência de oligonucleotídeos (5' → 3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>elt I</i>	LT-I	LTIIa – GGCGACAGATTATACCGTGC LTIIb – CCGAATTCTGTTATATATGTC	696	Blanco <i>et al.</i> (1997)
<i>elt II</i>	LT-II	LIII1 – AGATATAATGATGGATATGTATC LIII2 – TAACCCTCGAAATAAATCTC	300	Pickett <i>et al.</i> (1986)
<i>est I</i>	ST-I	STIIa – TCCGTGAAACAACATGACGG STIIb – ATAACATCCAGCACAGGCAG	244	Ojeniyi <i>et al.</i> (1994)
<i>est II</i>	ST-II	STIIa – GCCTATGCATCTACACAATC STIIb – TGAGAAATGGACAATGTCCG	278	Ojeniyi <i>et al.</i> (1994)

3.6.4. Eletroforese em gel de agarose.

3.6.4.1. Preparo do gel de agarose.

Agarose a 2% foi preparada em 80 mL de tampão TEB (Tris HCl-89mM, Ácido Bórico-89mM e EDTA 2,5 mM, pH 8), esta solução foi aquecida até a completa dissolução da agarose.

3.6.4.2. Procedimento da corrida.

Após a aplicação das amostras (10µL de cada reação adicionados a 5µL de tampão de ressuspensão de amostra – 0,25% de azul de Bromofenol, 0,25% de Xileno Cianol e 40% de sacarose p/v em água deionizada) o gel de agarose foi submetido inicialmente a uma voltagem

de 20 Volts, e após, esta voltagem foi aumentada para 80 Volts até que o Xileno Cianol (migração mais lenta) percorresse 2/3 do gel.

3.6.4.3. Revelação e visualização do gel.

Após o término da corrida, o gel foi corado em solução de Brometo de Etídio (10 µg/mL) por 20 minutos (Stemmer,1991) para a visualização do produto amplificado em transiluminador de luz UV. Para registro, os géis foram fotografados através do sistema ImageMaster® VDS (Amersham Pharmacia Biothec Inc. EUA).

4. RESULTADOS.

4.1. Detecção do Fator de Colonização F42.

Os ensaios de soroaglutinação em lâmina com anti-soro policlonal anti-F42, revelaram que do total das 387 amostras, obtivemos 28 (7,23%) amostras positivas (Figura 1). Analisando quanto a característica da amostra fecal observamos que entre as 168 amostras isoladas de fezes diarreicas, 12 (7,14%) foram positivas (Figura 2). Entre as 219 amostras oriundas de animais sadios, 16 (7,3%) foram positivas (Figura 3).

4.2. Associação entre a presença de F42 e enterotoxinas.

Destas 28 amostras, 21 (75%) foram positivas para ST-II e 15 (54%) para ST-I em reação de polimerase em cadeia (PCR), sendo que nenhuma se apresentou positiva para LT-I e LT-II.

Quanto a associação ao quadro de diarreia, observamos que entre as 12 amostras identificadas como F42 positivo, 6 apresentaram os genes para ST-I e ST-II, 3 para ST-II, 2 para ST-I e uma apresentou-se não enterotoxigênica (Figura 4, Tabela 2).

Ao analisarmos os resultados entre as 16 amostras F42+ isoladas de fezes não diarreicas observamos que 8 amostras foram ST-II, apenas 4 amostras apresentaram associação de ST-I e ST-II, 3 para ST-I e uma não enterotoxigênica (Figura 5, Tabela 3).

4.3. Determinação dos sorogrupos prevalentes.

Foi determinado o sorogrupo O de 26 amostras F42 positivas, onde: 9 mostraram-se positivas para o anti-soro anti-O8 (32,1%), 3 para o anti-soro anti-O98 (10,7%), 2 para o anti-

soro anti-O9 (7,1%), e 1 (3,6%), para cada um dos anti-soros que segue: O1, O11, O15, O18, O32, O35, O49, O73, O84, O101, O110, e O112. Duas amostras apresentaram-se não tipáveis (7,1%).

A Figura 1 mostra que 7% das 387 amostras de *E.coli* estudadas foram aglutinadas pelo anti-soro anti-F42.

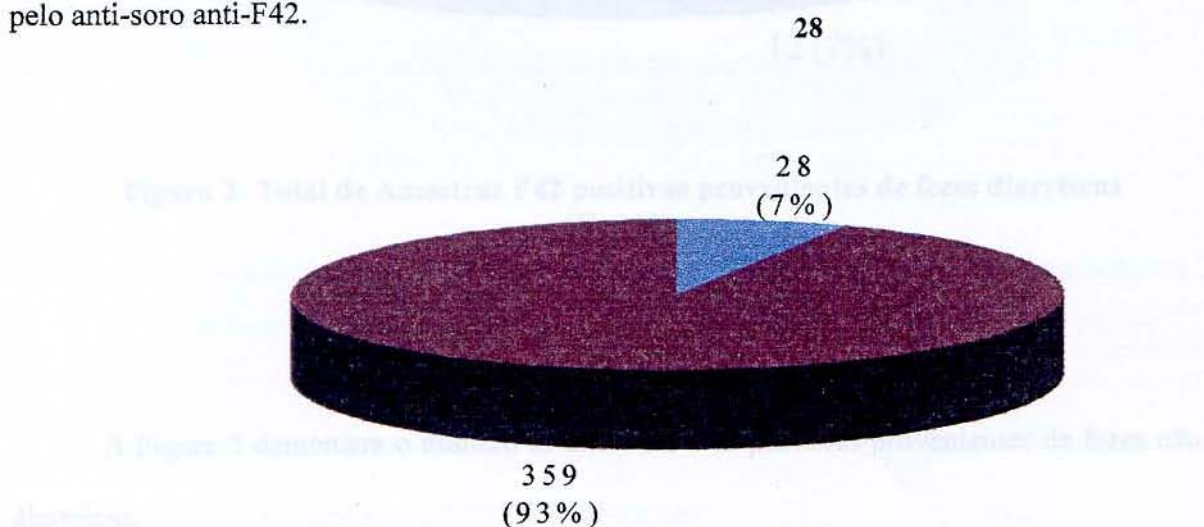


Figura 1- Total de amostras F42 positivas dentre o total de amostras estudadas (N= 387).

Na Figura 2, observa-se o total de amostras provenientes de fezes diarréicas e o número de amostras que se mostraram positivas para F42 (12).

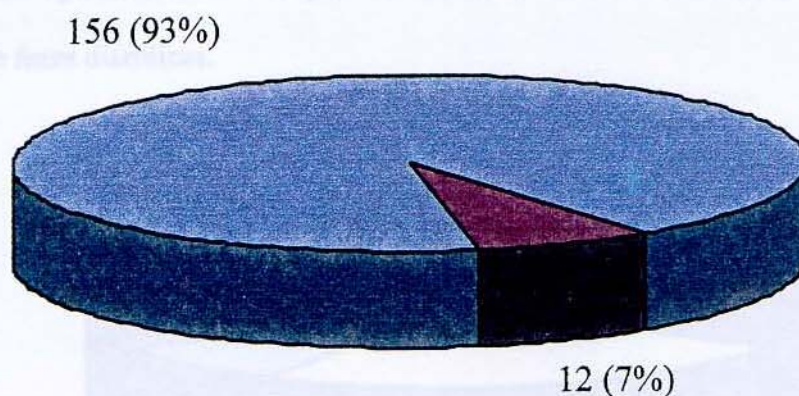


Figura 2- Total de Amostras F42 positivas provenientes de fezes diarreicas (N=168).

A Figura 3 demonstra o número de amostras F42 positivas provenientes de fezes não diarreicas.

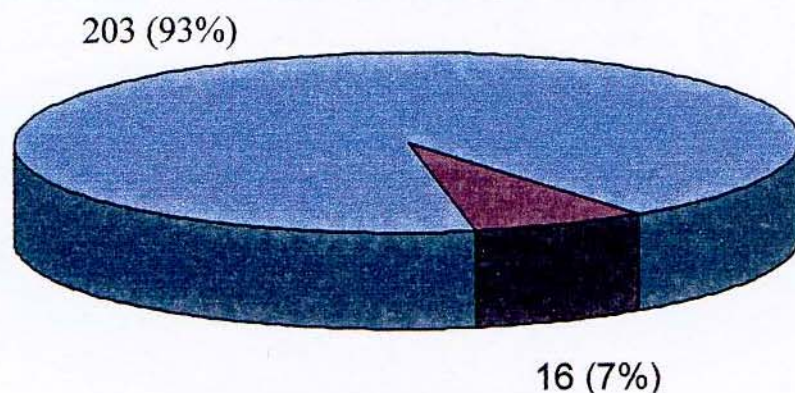


Figura 3- Total de amostras F42 positivas isoladas de fezes não diarreicas (N= 219).

A Figura 4 apresenta a distribuição das enterotoxinas termoestáveis nas amostras F42⁺ provenientes de fezes diarreicas.

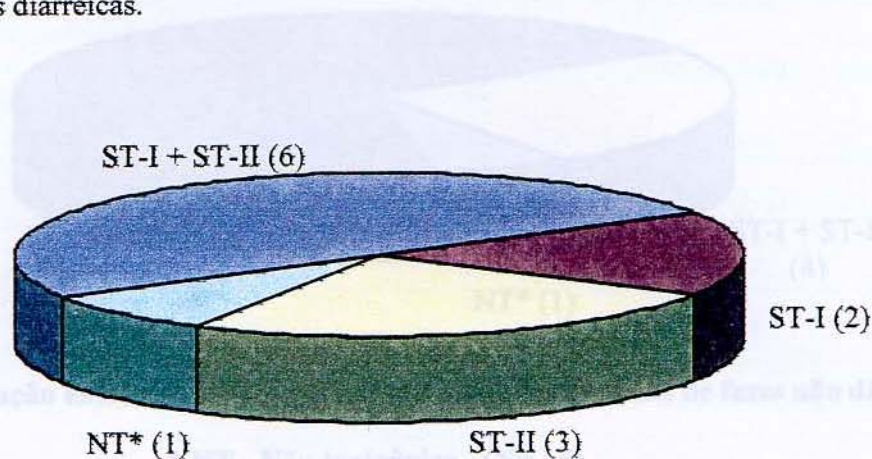


Figura 4- Associação de F42 com as enterotoxinas ST I e ST II nas amostras isoladas de fezes diarreicas, * NT - Não toxigênica, (N=12).

Na Figura 5 observa-se a associação entre F42⁺ e as enterotoxinas termoestáveis nas amostras de *E.coli* provenientes de fezes não diarreicas.

A Figura 6, demonstra a distribuição dos sorogrupos nas amostras F42 positivas.

Tabela 7 - Associação de F42, Enterotoxinas e Sorogrupos em amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarréicas.

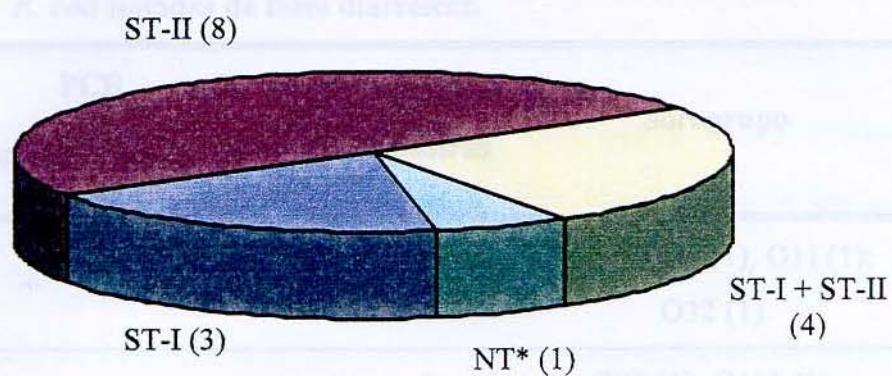


Figura 5- Associação entre F42 e ST I e ST II em amostras isoladas de fezes não diarréicas

* NT - Não toxigênica, (N= 16).

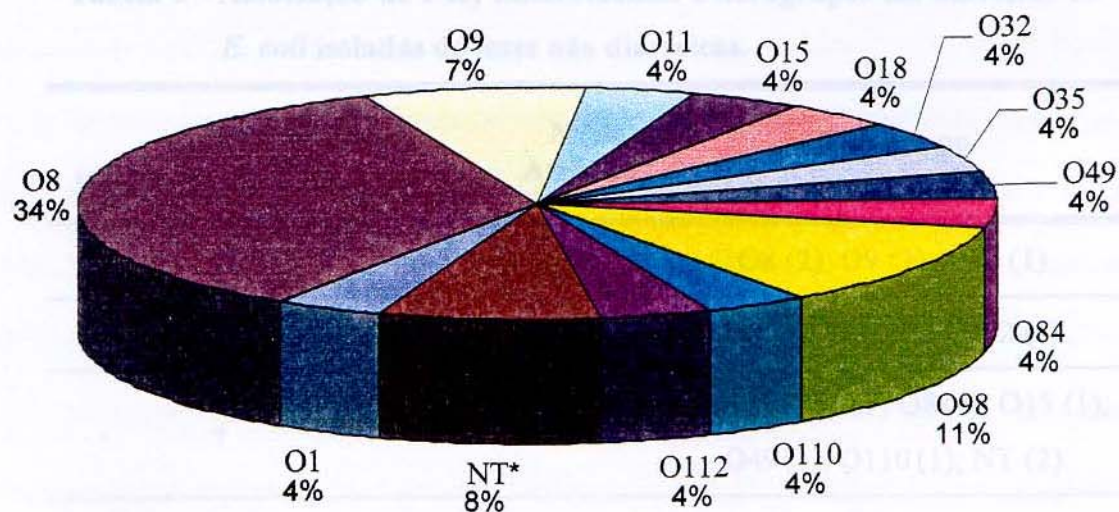


Figura 6- Sorogrupos das amostras F42 positivas, * - Não tipável, N= 28.

Tabela 2 - Associação de F42, Enterotoxinas e Sorogrupos em amostras *E. coli* isoladas de fezes diarreicas.

PCR				Nº de amostras	Sorogrupo
ST-I	ST-II	LT-I	LT-II		
+	+	-	-	6	O8 (3); O9 (1), O11 (1); O32 (1).
+	-	-	-	2	O98 (1); O101 (1).
-	+	-	-	3	O8 (1); O18 (1); O35 (1).
-	-	-	-	1	O8
8	9	0	0	12	

Tabela 3 - Associação de F42, Enterotoxinas e Sorogrupos em amostras de *E. coli* isoladas de fezes não diarreicas.

PCR				Nº de Amostras	Sorogrupo
ST-I	ST-II	LT-I	LT-II		
+	+	-	-	4	O8 (2); O9 (1); O73 (1).
+	-	-	-	3	O8 (1); O98 (1), O112 (1).
-	+	-	-	8	O84 (1); O1 (1) O8 (1); O15 (1); O49 (1); O110 (1); NT (2).
-	-	-	-	1	O98
7	12	0	0	16	

NT= não tipável.

5. DISCUSSÃO.

Nos leitões neonatos a diarreia causa, em geral, excessiva perda de líquido, eletrólitos e nutrientes. O animal desenvolve desidratação e desequilíbrio eletrolítico, acompanhado de acúmulos no sangue de produtos ácidos do metabolismo. Esta acidose é em geral, um importante fator determinante da morte. O leitão adoece rapidamente, devido à falta de reservas nutricionais. Seu sistema de defesa imunológica é ainda muito pouco eficiente e ele depende, portanto, da imunidade passiva, adquirida do colostro ou leite da matriz. Tratamentos, são difíceis, aplicação da medicina preventiva e práticas adequadas de manejo, são as formas mais eficazes de atacar o problema.

Para o sucesso de qualquer programa de controle de diarreias, o manejo é fundamental: a limpeza, vazios sanitários, desinfecção, higiene, nutrição e ambiente seco. Estes cuidados diminuem as chances do animal adquirir a doença.

Em seguida, vem as tentativas de aumentar as defesas contra doenças específicas ou a aplicação de medidas terapêuticas diretas, e devemos ainda considerar o uso de medicamentos.

O uso de antimicrobianos para o tratamento da diarreia apresenta bons resultados, desde que sua utilização seja feita no início do processo. Nos casos mais adiantados, é necessário promover a reidratação dos leitões com aplicações, via oral, de soro caseiro ou via intra-peritônio de fluidos comerciais.

A prevenção inclui a redução dos fatores predisponentes, como a umidade, baixa temperatura e a melhoria das condições sanitárias. O uso de um programa de vacinação para a colibacilose neonatal associado com boas práticas de manejo, tem dado bons resultados na prevenção da doença (http://www.suino.com.br/index_suino.asp).

Em 1986, Yano *et al.*, descreveram o isolamento de 3 amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (denominadas 62, 104 e 567/7) de fezes de leitões com diarreia neonatal, que produziam somente a toxina termoestável ST-I. Sendo que a fimbria identificada foi sorologicamente distinta dos fatores de colonização hemaglutinantes de origem suína, sugerindo ser esta fimbria (F42) diferente das até então descritas para ETEC de origem suína.

Posteriormente, Castro *et al.* (1990) demonstraram que amostras F42+ foram capazes de causar diarreia experimental em leitões, tendo sido possível detectar em todos os animais a colonização do intestino delgado pela amostra através de ensaios de imunofluorescência indireta. Relatam também que foi possível reisolar a amostra inoculada e detectar a presença de ST-I nas fezes diarreicas desses leitões. Estes experimentos comprovaram que o F42 era de fato um novo fator de colonização em amostras de *E. coli* de origem suína.

Esta dissertação teve como primeiro objetivo determinar a presença do fator de colonização F42 em amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarreicas e não diarreicas de suínos neonatos.

Como resultado desta pesquisa, verificamos através de ensaios de soroaglutinação a presença do fator de colonização F42 em 28 amostras (7,3%) dentre as 387 amostras estudadas. Como também demonstrado por Zerbini (1993) que verificou a presença do F42 em 7,4% nas amostras por ele estudadas. Quando analisamos os nossos resultados levando em consideração presença ou ausência de diarreia observamos que 7,14% das amostras isoladas de fezes diarreicas e 7,3% entre as amostras isoladas de fezes não diarreicas apresentaram o FC F42, mostrando que esta diferença não é estatisticamente significativa e que o FC F42 pode estar presente tanto em animais sadios quanto doentes.

Na literatura, encontramos resultados variados quanto a detecção dos fatores de colonização descritos em amostras isoladas de suínos neonatos em diferentes países. Para o

FCF4 (K88) são relatados a ocorrência de 3,6% no Brasil (Zerbini, 1993), 4,3% na Coreia (Kwon *et al.*, 1999), 10% na Espanha (Garabal *et al.*, 1997) e 19% na Polônia (Osek, 1999). Para o FC F5 (K99) são descritos de 2% (Kwon *et al.*, 1999) a 12% (Garabal *et al.*, 1997). Já para o FC F6 (987P) foram relatados a ocorrência de 4% na Suécia (Söderlind *et al.*, 1988); 6% na Coreia (Kwon *et al.*, 1999), 6,5% na Polônia (Osek, 1999) e 8,6% no Brasil (Zerbini, 1993).

Assim, concluímos que o FC F42 está presente no campo, podendo ser isolado tanto de animais portadores de diarreia como de animais sãos, o que sugere a sua permanência nas granjas. No caso das 16 amostras provenientes de fezes não diarreicas como demonstrado na Figura 3, indicaria a existência de animais assintomáticos que poderiam servir como portadores sãos, animais coalescentes, animais já tratados, ou o gene para FC F42 não estar sendo expresso *in vivo*.

Estudos sobre a prevalência deste fator de colonização e dos demais descritos na literatura devem ser realizados a fim de melhor caracterizar a importância destes no rebanho suíno no que tange a Colibacilose neonatal.

Yano *et al.* (1986) relataram que o fator de colonização F42 estava aparentemente associado a ST-I e, que na amostra 567/7 o FC F42 era codificado por plasmídeo que também codificava a enterotoxina ST-I (Silveira *et al.*, 1987).

O nosso segundo objetivo foi verificar através do método molecular de PCR, a possível associação entre a presença de F42 e as enterotoxinas LT(I e II) e ST (I e II) e determinar qual destas associações era a prevalente.

Em nossos experimentos não observamos a amplificação dos iniciadores para as enterotoxinas termolábeis (I ou II), sendo que estes resultados não são totalmente estranhos visto que vários autores relataram que a enterotoxina LT não tem sido detectada, ou que ela é

encontrada em pequeno número percentual em amostras isoladas de leitões (Woodward & Wray, 1990, Flores-Abuxapqui *et al.*, 1997; Osek, 1998 e Parma *et al.*, 2000). Assim, os nossos resultados nos fazem crer que provavelmente o FC F42 não se apresenta associado a esta enterotoxina.

Por outro lado, quando estudamos a presença dos genes das enterotoxinas termoestáveis, observamos que 75% das amostras FC F42 positivas foram ST-II e 54% ST-I e a associação entre ST-I e ST-II foi observada em 35,7% do total de amostras estudadas.

Destacando-se ST-II, o ensaio de PCR demonstrou a alta ocorrência (75%) do gene que codifica esta toxina nestas amostras, sendo que a relação desta enterotoxina com outros fatores de colonização tem sido demonstrada em percentuais variáveis como descrito por Söderlind *et al.*, 1988 (21%); Nagy *et al.*, 1990 (38%); Blanco *et al.*, 1997 (78%); Osek, 1998 (30%); Know *et al.*, 1999 e Osek, 1999 (4,5%) e nenhuma amostra no estudo descrito por Parma *et al.*, 2000.

Detalhando os resultados obtidos no PCR, observamos que entre as amostras F42⁺ isoladas de leitões com diarreia (n=12), 6 (54,5%) foram ST-I/ST-II, 3 (27%) ST-II, 2 (18,5%) ST-I e uma apresentou-se negativa nestes ensaios. Enquanto que nas amostras isoladas de animais sadios (n=16), 8 (53,3%) foram ST-II, 4 (26,6%) ST-I/ST-II, 3 (20%) ST-I e também uma apresentou-se negativa nestes ensaios.

A associação dos fatores de colonização e enterotoxinas tem sido descrita por alguns autores, como por exemplo: para F4 - ST-I (Smith & Gyles, 1970; Garcia *et al.*, 1987; Flores-Abuxapqui *et al.*, 1997; Mainil *et al.*, 1998); LT/ST (Gaastra & de Graaf, 1982; de Graaf & Gaastra, 1997; Garabal *et al.*, 1997; González & Garabal, 1998), LT/ST-I (Nagy *et al.*, 1990); ST-II/LT-I (Blanco *et al.*, 1997). Para F5 - ST-I - Gaastra & de Graaf, 1982; Flores-Abuxapqui *et al.*, 1997; de Graaf & Gaastra, 1997; Mainil *et al.*, 1998; e F6 - ST-I (Guineé &

Jansen, 1979; Moon *et al.*, 1980; Gaastra & de Graaf, 1982; Garabal *et al.*, 1997; de Graaf & Gaastra, 1997; Flores-Abuxapqui *et al.*, 1997; González & Garabal, 1998).

Sendo assim, os resultados por nós obtidos neste grupo de amostras o FC F42 mostrou-se intimamente associado às enterotoxinas termoestáveis nos ensaios moleculares como mostrado nas Figuras 4 e 5.

Frente a estes resultados sugerimos que novas pesquisas sejam realizadas visando comprovar se o (s) gen (es) para F42 e das enterotoxinas estão localizados em um mesmo plasmídio.

O último objetivo por nós desenvolvido, buscou determinar os sorogrupos prevalentes nas amostras de *E. coli* F42 positivas. Para tanto, utilizamos um conjunto completo de anti-soros anti-O adquirido do LREC.

Uma vez que alguns autores como Zerbini (1993) trabalhando com amostras isoladas de suínos neonatos do Brasil, verificou a ocorrência dos sorogrupos O7, O8, O20, O135, e O149. Garabal *et al.* (1997) observaram como prevalentes os sorogrupos O8, O9, O20, O101, O138, O141 e O149 em amostras isoladas na Espanha; Kwon *et al.* (1999) demonstraram os sorogrupos O20, O162, O141 e O149 em amostras isoladas na Coréia; Nagy & Fekete (1999), mostraram que os sorogrupos: O8, O9, O20, O101, O115, O139, O141, O147, O149 e O157 apareciam com maior frequência em amostras isoladas na Hungria; Parma *et al.* (2000) relataram a prevalência do sorogrupo O64, seguido de O8, O9, O101, O138, O139, O149 e O162 em amostras isoladas na Argentina. Na reação de soro-aglutinação para a determinação do sorogrupo, encontrou-se uma diversidade de sorogrupos, com predomínio para O8 (32,1%), confirmando a observação inicial feita por Yano *et al.* (1986). A prevalência deste sorogrupo em amostras de ETEC portadora do FC F42 reforça a associação do sorogrupo O8 na patogenia da Colibacilose neonatal em suínos.

Por outro lado, observamos que 50% das amostras F42⁺ foram agrupadas nos sorogrupos O8, O9 e O98.

O sorogrupo O98 (10,7%), O9 (7,1%) e os demais encontrados (O1, O11, O15, O18, O32, O35, O49, O73, O84, O101, O110, O112 - 3,6% cada) ainda não foram descritos como associados a F42.

Enfim, a combinação dos resultados obtidos mostra a prevalência dos perfis genotípicos ST-I⁻ ST-II⁺ em 11 amostras sendo 8 amostras originárias de fezes não diarreicas pertencentes aos sorogrupos O1, O8, O15, O49, O84, O110 e 3 originárias de fezes diarreicas pertencentes aos sorogrupos O8, O18 e O35.

Seguido do perfil genotípico ST-I⁺ ST-II⁺ observado em 10 amostras das quais 4 originárias de fezes não diarreicas pertencentes aos sorogrupos O8 (2), O9 e O73 e 6 originárias de fezes diarreicas do sorogrupadas como O8 (3), O9, O11, O32.

Para o perfil genotípico ST-I⁺ ST-II⁻ encontramos 5 amostras, destas 3 amostras de fezes não diarreicas classificadas como dos sorogrupos O8, O98 e O112 e duas amostras de fezes diarreicas, dos sorogrupos O98 e O101.

Estas combinações também foram observadas para outros fatores de colonização/enterotoxinas em ETEC associados a diarreia neonatal (Guineé & Jansen, 1979; Gaastra & de Graaf, 1982, Castro *et al.*, 1984, Mainil *et al.* 1998).

Demonstramos que os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a importância do fator de colonização F42 no desenvolvimento do quadro diarreico nas infecções por ETEC, evidenciando a necessidade de se incluir este FC na Imunoterapia, proporcionando uma maior proteção aos animais.

Por fim, sugerimos, que novas e amplas pesquisas devam ser realizadas, observando-se idade, raça e manejo de plantéis de regiões geográficas distintas, visando assim, esclarecer o papel do FC F42 na Colibacilose suína.

6. CONCLUSÕES

1. O fator de colonização F42 encontra-se presente em amostras de *E. coli* enterotoxigênicas e conforme sua frequência (7,23%) é um fator de importância significativa na patogenia do rebanho suíno.
2. O FC F42 pode ser identificado tanto em amostras isoladas de fezes diarreicas como de não diarreicas.
3. A associação do FC F42 e enterotoxinas, mostra uma estreita relação com as enterotoxinas termoestáveis ST-II (75%) e ST-I (54%).
4. A associação de FC F42 e as enterotoxinas LT-I/LT-II, não foi verificada.
5. Os sorogrupos O8, O9 e O98 foram prevalentes dentre as amostras estudadas.
6. Os sorogrupos O1, O11, O15, O18, O32, O35, O49, O73, O84, O101, O110 e O112 associados a F42, não foram ainda, citados em literatura.
7. Ao se pensar na formulação de uma vacina contra a diarreia suína a inclusão do FC F42 deve ser considerada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ALEXANDER, T. J. 1994. Neonatal diarrhoea in pigs. In: Gyles, C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, Cab. International, Wallingford, UK. 1994, pp 151-169.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; GARABAL, J. I.; BLANCO, J. E.; GONZÁLES, E. A. 1992. Factores de virulência de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. Santiago: n° 170 (Monografia de Universidad de Compostela. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico).

BLANCO, J. & BLANCO, M. 1993. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origem humano y bovino, patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. In Servicio Pub. Deputacion Provincial, Lugo, Espanha.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; MORA, A.; BALAGUER, L.; MOURIÑO, M.; JUÁREZ, A.; JANSEN, W. H. 1996. O serogroups, biotypes and *eae* genes in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy rabbits. J. Clin. Microbiol. **34**: 3101- 3107.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZÁLES, E. A.; MORA, A.; JANSEN, W. H.; GOMES, T. A. T.; ZERBINE, L. F.; YANO, T.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BLANCO, J. 1997. Genes coding for Enterotoxins and Verotoxins in Porcine *Escherichia coli* Strains Belonging to Different O:K:H Serotypes: relationship with Toxic Phenotypes. J. Clin. Microbiol. **35** (11): 2958-2963.

- BRITO, B. G. 1997. Fatores de Virulência de *Escherichia coli* isoladas de suínos com bacteriúria. Londrina. [Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Paraná].
- CAMPOS, L. C. & TRABULSI, L. R. 1999. Generalidades sobre Enterobactérias. In: TABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia: 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 207-234.
- CASTRO, A. F. P.; PIFFER, I. A.; SERAFIM, M. B.; LEITE, D. S. & COLLI, I. A. 1990. Reprodução experimental da colibacilose em leitões. Pesq. Vet. Bras. 10: 11-18.
- CASTRO, A. F. P.; SERAFIM, M. B.; BRITO, J. R. F.; BARCELLOS, D. S. E. N. de & COLLI, I. A. G. 1984. 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.
- CHOI, C. & CHAE, C. 1999. Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac and ad) in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. Vet. Microbiol. 67: 307-310.
- CORRÊA, W.; CORREIA, C.N. 1992. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. Editora Médica e Científica Ltda. MEDSI – 2ª ed., p 175-187. Rio de Janeiro - RJ.
- DAVIS, B. D. & MINGIOLI, E. S. 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B. J. Bacteriol. 60: 17-28.
- DE GRAAF, F. K. & GAASTRA, W. 1997. Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. 1997. *Escherichia coli*: Mechanisms of Virulence. UK: Cambridge University Press. 639p. 193-211. 0521453615.

- DE, S. N. & CHATTERJEE, D. N. 1953. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. J. Pathol. Biol. **66**: 559-562.
- DEAN, A. G.; WILLIAMS, R.G. & HARDEN, L. B. 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis. **125**: 407-411.
- DYKES, C. W.; HALLIDAY, I. J.; HOB DEN, A. N.; READ, M. J. & HARFORD, S. 1985. A comparison of the nucleotide sequence of of the A subunit of heat labile enterotoxin and cholera toxin. FEMS Microbiol. Lett., **26**: 171-174.
- ECHEVERRIA, P.; SERIWATANA, J.; PATOLOMOROJ, U.; MOSELEY, S. L.; McFARLAND, A.; CHITYOTHIN, O & CHAICUMPA, W. 1984 Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, water, and people at farms in Thailand as determined by DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. **19**: 489-491.
- EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. 1972. Identification of *Enterobactereaceae*. 3 ed. Minneapolis, Burgess Publishers.
- EVANS, M. G.; WAXLER, G. L.; NEWMAN, J. P. 1986. Prevalence of K88, K99 and 987P pili of *Escherichia coli* in neonatal pigs with enteric colibacillosis. American J. Vet. Res. **47**: 2431-2434.
- FLORES-ABUXAPQUI, J. J.; SUAREZ-HOIL, G. J.; PUC-FRANCO, M. D.; HEREDIA-NAVARRETE, M. R.; VIVAS-ROSEL, M. L.; OBERHELMAN, R. A. 1997. Frequency of adhesive factors and enterotoxins in strains of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea. Ver. Latinoam Microbiol. **39**: 145-151.

GAASTRA, W. & DE GRAAF, F. K. 1982. Host - specific fimbrial adhesins of noninvasive *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. **46** (2): 129-161.

GARABAL, J. I.; VÁSQUEZ, F.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; GONZÁLEZ, E. A. 1997. Colonization antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Spain. Vet. Microbiol. **54**: 321-328.

GARCIA, D.; CAVAZZA, M. E.; BOTERO, L.; GORZIGLIA, M.; URBINA, G.; LIPRAND, F.; ESPARZA, J. 1987. Preliminary characterization of *Escherichia coli* isolated from pigs diarrhoea in Venezuela. Vet. Microbiol. **13** (1): 47-56.

GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. 1987. Propiedades de los *Escherichia coli* causantes de diarrea en seres humanos: *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC), enteropatógenos clásicos (EPEC) y enteroinvasivos (EIEC), ed. Servicio de Publicacións e Intercambio Científico p 1-110 Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, España.

GONZÁLEZ, E. A. & GARABAL, J. I. 1998. Colibacilosis Entérica Porcina. Fundamentos para el desarrollo de la vacuna PTR 91-0050. In servicio de Publicaciones Deputacion Provincial de Lugo, España.

GUINÉE, P. A. M.; AGTERBERG, C. M.; JANSEN, W. H. 1972. *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. Appl. Microbiology, **24**: 127-131.

GUINÉE, P. A. M. & JANSEN, W. H. 1979. Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin; a comparative study. Zentrabl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A, **24**: 245-257.

GUTH, B. E. C.; TWIDDY, E. M.; TRABULSI, L. R. & HOLMES, R. K. 1986. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **54**: 529-536.

GYLES, C. L. 1979. Limitations of infant mouse test for *Escherichia coli*. Heat-stable enterotoxins. *Can. J. Comp. Med.*, **34**: 337-349.

GYLES, C. L. 1986. *Escherichia coli*. In: C.L. Gyles and C.O. Thoen (eds). Pathogenesis of bacterial infections in animals. P. 114-131. The Iowa States University Press, Ames, EUA.

GYLES, C.L. 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.* **38**:734-746.

GYLES, C.L. 1994. *Escherichia coli* enterotoxins *In Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International. p. 337-364.

HOLLAND, R.E. 1990. Some infectious of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 345-375.

HOLMES, R. K.; TWIDDY, E. M. & PICKETT, C. L. 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **53**: 464-477.

ISAACSON, R. E.; NAGY, B. & MOON, H. W. 1977. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogenic that lack K88. *J. Infect. Dis.* **135**: 531-539.

- KWON, D.; KIM, O.; CHAE, C. 1999. Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. J. Vet. Diagn. Invest. **11**(2): 146-151.
- LEITE, D. S.; YANO, T. & PESTANA DE CASTRO, A. F. 1988. Production, purification and partial characterization of a new adhesine factor (F42) produced by enterotoxigen *Escherichia coli* isolated from pigs. Ann. Inst. Pasteur / Microbiol. **139**: 295-306.
- LEITE, D.S. 1994. Estudo Químico e Biológico dos Receptores para o antígeno de aderência F42 de *Escherichia coli* enterotoxigênica de origem suína. 177f. Tese doutorado – EPM.
- LEITE, D. S.; YANO, T. & PESTANA DE CASTRO, A. F. 1997. Receptors on chicken Erythrocytes for 42 Fimbriae of *Escherichia coli* Isolated from Pigs. Zbl. Bakt. **286**: 383-388.
- LEVINE, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. **155**:377-389.
- LIOR, H. Classification of *Escherichia coli* In: Gyles C. L. (Ed.) 1994. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB. International, 31-72.
- MAINIL, J. G.; DAUBE, G.; JACQUEMIN, E.; POHL, P. 1998. Virulence plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from piglets. Vet. Microbiol. **62**: 291-301
- MARTINS, M. F.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; YANO, T.; CASTRO, A F. P.; SILVEIRA, W. D. 2000. Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. Vet. Microbiol. **76**: 51-59.

MOON, H. W.; KOHLER, E. M.; SCHNEIDER, R. A. & WHIPP, S. C. 1980. Prevalence of pilus antigens, enterotoxins types and enteropathogenicity among K88 negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. Infect. Immun., **27**: 222-230.

MORRIS, J. A.; STEVENS, A. E. & SOJKA, W. T. 1978. Anionic and cationic components of the K99 surface antigen from *Escherichia coli* B41. J. Gen. Microbiol. **107**: 173-175.

NAGY, B.; CASEY, T. A.; MOON, H. W. 1990. Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. J. Clin. Microbiol. **28**: 651-653.

NAGY, B. & FEKETE, P. Z. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. Vet. Res. 30, 259 - 284.

NATARO, J.P. & KAPER, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Reviews, **1**: 183-184.

NATARO, J. P.; LEVINE, M. M. *Escherichia coli* Diseases in Humans In Gyles C. L. (Ed.) 1994. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB. International, Wallingford, UK. 1994, p.285-333.

OJENIYI, B., AHRENS, P., MEYLING, A., 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain rection and phenotypic assays. J. Vet. Med. B **41**: 49- 59.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SMITH, H. W. & SOJKA, W. J. 1975. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco" possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. **83**: 31-36.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SOJKA, W. J. & LEACH, J. M. 1961. Simultaneous occurrence of *Escherichia coli* B and antigens in strains from disease swine. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. **53**: 404-422.

OSEK, J. 1998. Application of polymerase chain reaction for determination of toxins in *Escherichia coli* strains isolated from pigs with diarrhea. Acta Microbiol. Pol. **47**: 409-413.

OSEK, J. 1999. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. Vet. Microbiol. **68**: 209-217.

PARMA, A. E.; SANZ, M. E.; VIÑAS, M. R.; CICUTA, M. E.; BLANCO, J. E.; BOEHRING, S. I.; VENA, M. M.; ROIBON, W. R.; BENITEZ, M. C.; BLANCO, J.; BLANCO, M. 2000. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. Vet. Microbiol. **72**: 269-276

PICKETT, C. L.; TWIDDY, E. M.; BELISLE, B. W.; HOLMES, R. K. 1986. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **165**:348-352.

ROBINS-BROWNE, R. M. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. Rev. Infect. Dis. **9**: 28-53.

- SALYERS, A. A. and WHITT, D. D. 1994 - Bacterial pathogenesis - A molecular Approach . ASM Press.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cap.6. Cold Spring Harbor Lab Press.
- SEARS, C. L. & KAPER, J. B. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol. Rev. **60**: 167-215.
- SILVEIRA, W. D.; YANO, T.; AZEVEDO, J. L. & CASTRO, A. F. P. 1987. Plasmid-mediated production of a new colonization factor (F42) in enterotogenic *Escherichia coli*. Rev. Genet., **4**: 635-646.
- SMITH, H. W. & GYLES, C. L. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Microbiol. **3**: 387-401.
- SMITH, H. W. & LINGGOOD, M. A. 1972. 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.
- SO, M. & MCCARTHY, B. J. 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn 1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterogenic *Escherichia coli* strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **77**: 4011-4015.
- SÖDERLIND, O.; THAFVELIN, B.; MÖLLBY, R. 1988. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from Swedish piglets with diarrhea. J. Clin. Microbiol. **26** (5): 879-884.

- SPERANDIO, V. & SILVEIRA, W. D. 1993. Comparison between Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains expressing F42, F41 and K99 colonization factors. Microbiol. Immunol. **37**: 869-875.
- STEMMER, W. P. C. 1991. A 20-minute ethidium bromide/high salt extraction protocol for plasmid DNA. Biotechnology. **10**: 726.
- VAN SOOLINGEN, D.; HASS, P. E. W; HERMANS, P. W. M.; GROENEN, P. M. A. and VAN EMBDEN, J. D. (1993) Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. (**33**): 1987-1995.
- WHIPP, S. C. 1990. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. Infect. Immun. **58**:930-934.
- WOODWARD, M. J. & WRAY, C. 1990. Nine DNA probes for detection of toxin and adhesin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in animals. Vet. Microbiol. **25** (1): 55-65
- ZERBINI, L. F. C. 1993. Fatores de Virulência e Sorotipos de *Escherichia coli* isolada de suínos durante as primeiras semanas de vida. São Paulo. [Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Paulo , São Paulo].
- YAMAMOTO, T.; GOJOBORI, T. & YOKOTA, T. 1987. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* 01. J. Bactriol., **169**: 1352-1357.

YANO,T.; LEITE, D.S.; CAMARGO, I. J. B. & PESTANA DE CASTRO, A. F. 1986. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. Microbiol. Immunol. **30**: 1495-1508.

8. MANUSCRITO

Originais enviado ao Periódico *Veterinary Microbiology*

Cópia do e.mail informando recebimento do artigo.

Delivered-To: domingos@unicamp.br
From: "AGRICULTURE EDIT. OFFICE (ELS)" <agri-eo-f@elsevier.nl>
To: "domingos@unicamp.br" <domingos@unicamp.br>
Subject: VETMIC 1186
Date: Tue, 24 Jul 2001 13:57:48 +0200
X-Mailer: Internet Mail Service (5.5.2448.0)
X-Virus-Scanned: by AMaViS perl-10

Dear Dr. Leite,

I acknowledge with thanks the safe receipt of the manuscript Occurrence of F42 colonization factor in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with and without diarrhea by Penatti, M.P.A., da Silva, A.S., Valadares, G.F. and da Silva Leite, D.

Copies will now be sent out for review. A decision on publication will be communicated to you as soon as possible.

Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.
Thank you for submitting your manuscript to our journal.

Yours sincerely,

Editorial Office *Veterinary Microbiology*

Mrs. N. de Jong

Phone: 20-4853395
Fax: 20-4853754
E-mail: agri-eo-f@elsevier.nl

1 Occurrence of F42 colonization factor in Escherichia coli strains isolated from piglets with and
2 without diarrhea.

3

4

5 Mário Paulo Amante Penatti¹; Alex Souza da Silva²; Geórgio Freesz Valadares²; Domingos da
6 Silva Leite^{2*}.

7

8 1 ESTES – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia/MG - Zip 38400-902 – Brazil.

9 2 Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia / Unicamp - P.O. Box
10 6109, Zip 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

11

12

13 * Corresponding author

14 D. S. Leite

15 Departamento de Microbiologia e Imunologia

16 P. O. BOX 6109

17 Zip 13.081.970

18 Campinas, SP, Brazil.

19 e-mail: domingos@unicamp.br

20

21

22 **Keywords:** Escherichia coli, F42, Pig-bacteria, Fimbriae, Diarrhea, PCR.

23

ABSTRACT

The objectives of this survey were to determine the presence of the colonization factor F42 in 387 Escherichia coli isolated from newborn piglets, being 168 strains proceeding from diarrheic and 219 from not diarrheic stools. Agglutination test determined the presence of F42 in 28 (7.23%) of the 387 E. coli strains; being 12 (7.1%) strains isolated from diarrheal and 16 (8.3%) from non diarrheic stools. Thus, we conclude that the FC F42 is present in the field, being able to be isolated in both diarrheic and healthy animals. Through Polymerase chain reaction (PCR) in F42 positive strains we could screen the extent of the genes presence of the enterotoxins (ST-I, ST-II, LT-I and LT-II). We do not verify the occurrence of genes of the thermolabile enterotoxins (LT-I and LT-II). It contrasts with the high frequency observed for ST-II (75%) and for ST-I (54%). The association between ST-I and ST-II in 35.7% of strains, indicates an strong association of the FC F42 with the thermostable enterotoxins. Serogroups of F42 positive strains were determined. Serogroup O8 revealed prevalent (32.1%), followed by the serogroups O98 (10.7%) and O9 (7.1%). Others serogroups were also identified O1, O11, O15, O18, O32, O35, O49, O73, O84, O101, O110, O112. We have proved the importance of the FC F42 in the etiology of the neonatal diarrhea and suggest a design and development of a vaccine will be prevent the porcine colibacillosis.

INTRODUCTION

Escherichia coli which causes enterotoxic colibacillosis in suckling pigs is referred to enterotoxigenic E. coli (ETEC) strains. They adhere to the microvilli of small intestinal epithelial cells and produce enterotoxins that act locally on the enterocytes (Nagy and Fekete, 1999). For pigs ETEC, the most common adhesins (also called colonization factors) are K88, K99, 987P (Alexander, 1994). In 1986, a new E. coli ETEC colonization factor (F42) isolated from feces of newborn piglet was described by Yano et al., (1986). Such strains showed mannose resistant haemagglutination (MRH) to chicken, guinea-pig, sheep, horse and human erythrocytes. They also showed diffuse adherence into HeLa cells (human cervix carcinoma) and piglet enterocytes (Yano et al., 1986). The electron microscopy showed the presence of structures such as fimbriae when strains were cultured at 37°C, but not at 18°C. The antiserum anti-F42 inhibited the hemagglutination, the adhesions into HeLa cells and into the piglet intestinal epithelium, showing that the fimbriae is responsible for the adhesion. Later, Silveira et al., (1987) reported that F42, is associated with a non conjugative plasmid of 21,1 MDa coding for the heat-stable toxin (ST-I).

The purified F42 presented a MW of 31 KDa an isoelectric focusing in pH 3.2. Polyclonal antiserum anti-F42 obtained from the purified fimbriae, did not present cross reaction with other haemagglutinating adhesins from pig origin (Leite et al., 1988). Castro et al., (1990) demonstrated that strains of F42 E. coli caused diarrhea in piglet when inoculated orally and it was detected by direct immunofluorescence in the small intestine of these animals after 42 hours.

Leite et al., (1997) verified that the hemagglutination caused by the F42 fimbriae, was sensible to the N-acetil-galactosamine. In addition, the possible receptors of F42 exhibited, through enzymatic treatment, that it was a glicoprotein. They also verified, through Western Blotting, that the reaction of F42 with the membrane extracted from different erythrocytes is mediated by different molecular structures presented on the membrane of these cells.

In the present study, we report (i) the detection of F42 among piglets E. coli strains (ii) their relationship with the enterotoxins presence (ST-I and ST-II) (iii) and their association with serogroups.

MATERIAL AND METHODS

E. coli strains and growth conditions.

A collection of 387 E. coli isolated from feces of newborn piglets (being 168 strains from diarrheic and 219 from non-diarrheic feces) were studied. Standard strains were employed: E. coli 567/7, O8:H, F42⁺ ST-I⁺; O101, F5⁺, ST-I⁺; 40T – LT-I⁺; P17 – ST-II⁺; PCLT-II – LT-II⁺; DH 5 α e K12. The cultures were grown on Minimal Salt Medium (MM) (Davis & Mingioli, 1950) containing 1,5% of Agar and 0,5% of glucose at 37° C, for F42 detection, TSA (Trypticase Soy Agar, Difco) for serogroup test, and Luria Bertani broth (LB) for DNA amplification.

F42 detection.

The E. coli F42 positive strains were cultered overnight at 37° C on MM agar. The detection of F42 production was performed by slide agglutination test using specific anti-F42 rabbit antiserum

Determination of the serogroups.

The serogrouping was determined using a microplate technique described by Guinée et al., (1972) and modified by Blanco et al., (1992).

Polymerase Chain Reaction.

The strains were first screened in order to detect the presence of F42. Afterwards the positive strains in this reaction were subjected to PCR tests.

Amplifications were performed using 50µg of purified DNA as templates. PCR reactions were performed following the methodology described by Blanco et al., (1997) using specific primers for the genes that codify the toxins previously described in literature. LT-I, Blanco et al. (1997); LT-II, Pickett et al. (1986), ST-I and ST-II, Ojeniyi et al. (1994).

RESULTS

F42 detection.

The slide agglutination test using rabbit polyclonal anti-serum anti-F42, disclosed from the total of the 387 strains and we could obtain 28 (7.23%) strains positive. Analyzing the feature of the fecal sample, we observed that in the 168 strains isolated with diarrheic feces, 12 (7.14%) were positive. Between 219 strains from healthy animals, 16 (8.3%) were positive.

F42 and enterotoxins.

From the 28 strains, 21 (75%) were positive for ST-II, 15 (54%) for ST-I and none strains were positive for LT-I or LT-II in PCR. We observed that it among the 12 strains identified as positive F42, 6 had presented the genes for ST-I and ST-II, 3 for ST-II, 2 for ST-I and only one presented non toxigenic. When analyzing the results between the 16 strains isolated F42+ from 8 non diarrheic feces, we observed that strains were ST-II. In addition only 4 strains presented association with ST-I and ST-II, 3 for ST-I and one only was non toxigenic.

Serogroups

The serogroups of 26 F42+ strains were determined, 9 revealed positive results to anti-serum anti-O8 (32.1%), 3 to the anti-serum anti-O98 (10.7%), 2 to the anti-serum anti-O9 (7.1%), and 1 (3.6%). For each one, the anti-serum follows: O1, O11, O15, O18, O32, O35, O49, O73, O84, O101, O110, and O112. Two samples presented not typable (7.1%).

The combination of all results obtained is shown in the table 1.

DISCUSSION

In the present study, the presence of the F42 colonization factor in *E. coli* strains in piglets, with and without diarrhea, was identified. We verified through slide agglutination tests the presence of F42 in 28 strains (7.3%) among 387 strains studied. These observations are in agreement with the previous report of Zerbini (1993) that verified the presence of F42 in 7.4% of the studied strains. When we analyze our results taking into account the presence or absence of diarrhea, 7.14% of strains from diarrheal feces and 8.3% strains between isolated of not diarrheic feces presented FC F42. This difference is not statistically significant.

However, as shown in earlier studies, we found heterogeneous results in different countries. For FCF4 (K88) they described 3.6% occurrence (Zerbini, 1993), 4.3% (Kwon et al., 1999), 10% (Garabal et al., 1997), and 19% (Osek, 1999). For FCF5 (K99) they also described 2% (Kwon et al., 1999) 12% (Garabal et al., 1997). For FCF6 (987P) they reported 4% occurrence (Söderlind et al., 1988); 6% (Kwon et al., 1999), 6.5% (Osek, 1999) and 8.6% (Zerbini, 1993). Thus, we concluded that FC F42 is presented in the field, being able to be isolated both from diarrheic and healthy animals. In the case of the 16 samples proceeded from non-diarrheic feces, it indicates the existence of asymptomatic animals that could be as carrying healthy.

In our experiments we do not observe the amplification of the starters for the thermolabile enterotoxins (I or II). These results are not surprised, since some authors described that enterotoxin LT has not been detected, or that it is found in small percentile number in strains isolated from pigs (Woodward & Wray, 1990, Flores-Abuxapqui et al., 1997; Osek, 1998 and Parma et al., 2000). Thus, our results make us to believe that probably the FC F42 is not

associated to this enterotoxin. On the other hand, when we study the presence of the genes of the thermo-stable enterotoxins, we observe that 75% of the strains ST-II, 54% ST-I and the association between ST-I and ST-II are observed in 35.7% of the total of the strains studied.

Detailing the results obtained in the PCR, we observed that strains isolated F42+ from pigs with diarrhea (n=12), 6 (54.5%) were ST-I/ST-II, 3 (27%) ST-II, 2 (18.5%) ST-I and only one sample presented minus in these assays. However, in strains isolated from healthy animals (n=16), 8 (53.3%) were ST-II, 4 (26.6%) ST-I/ST-II, 3 (20%) ST-I and also only one presented minus in these assays.

Detaching ST-II, the PCR assay demonstrated a high occurrence (75%) of the gene that codifies this toxin in those strains. The relation of this enterotoxin with other factors of settling has been demonstrated in variable percentages as described for Söderlind et al., 1988 (21%); Nagy et al, 1990 (38%); Blanco et al., 1997 (78%); Osek, 1998 (30%); Know et al., 1999 and Osek, 1999 (4.5%) and none strain in the article described by Parma et al., 2000.

In the reaction of serum-agglutination for serogroup determination we found a diversity of strains, with predominance of O8 (32.1%), confirming the initial comment made by Yano et al (1986). The prevalence of this serogroup in strains of carrying ETEC of the FC F42 strengthens the association of serogroup O8 in the colibacillosis neonatal in pigs. On the other hand, we observed that 50% of strains F42+ were included in the serogroups O8, O9 and O98. Serogroup O98 (10.7%), O9 (7.1%) and O1, O11, O15, O18, O32, O35, O49, O73, O84, O101, O110, O112 – (3,6% each) have not still been described as associates F42.

Finally, the combination of the results obtained, shows the prevalence of genotypes profiles ST-I ST-II+ in 11 strains being 8 strains originary of pertaining non diarrheic feces to the serogroups O1, O8, O15, O49, O84, O110 and 3 originary of pertaining diarrheic feces to

the serogroups O8, O18 and O35. Followed of genotypes profile ST-I+ ST-II+ observed in 10 strains of which 4 originary ones of pertaining not diarrheic feces to the serogroups O8 (2), O9 and O73 and 6 originary ones of diarrheic feces of the serogrouped ones as O8 (3), O9, O11, O32. For genotype profile ST-I+ ST-II- we found 5 strains, where 3 of classified not diarrheic feces as of serogroups O8, O98 and O112 and two strains of diarrheic feces, of the O98 and O101 serogroups.

Combinations of this type was also observed for other factors of colonization/enterotoxins in ETEC associates neonatal diarrhea (Guineé & Jansen, 1979; Gaastra & de Graaf, 1982, Castro et al., 1984, Mainil et al. 1998). We demonstrated that the results obtained in this work stand out the importance of the colonization factor F42 in the development of the diarrhea in the infections for ETEC, evidencing the necessity of including this FC in the vaccine, in order to provide a major protection for the animals. In conclusion, we suggest that a new and wide research must be carried out, taking into account age, race and handling of breeding of distinct geographic regions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants (97/7729-1 and 98/11957-2) from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

- Alexander, T.J.L., 1994. Neonatal diarrhoea in pigs. In: Gyles, C.L. (Ed.), Escherichia coli in Domestic Animals and Humans, Cab International, Wallingford, UK, pp. 151-169.
- Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M.P., Blanco, J.E., Garabal, J.I., González, E.A., 1992. Serogroups of Escherichia coli strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. FEMS Microbiol. Lett. 96, 155-160.
- Blanco, M., Blanco, J.E., González, E.A., Mora, A., Jansen, W.H., Gomes, T.A.T., Zerbine, L.F., Yano, T., Pestana de Castro, A.F., Blanco, J., 1997. Genes coding for Enterotoxins and Verotoxins in porcine Escherichia coli strains belonging to different O,K,H Serotypes, relationship with toxic phenotypes. J. Clin. Microbiol. 35, 2958-2963.
- Castro, A.F.P., Piffer, I.A., Serafim, M.B., Leite, D.S., Colli, I.A., 1990. Reprodução experimental da colibacilose em leitões. Pesq. Vet. Bras. 10, 11-18.
- Castro, A.F.P., Serafim, M.B., Brito, J.R.F., Barcellos, D.S.E.N., Colli, I.A.G., 1984. 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.
- Davis, B.D., Mingioli, E.S., 1950. Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B. J. Bacteriol. 60, 17-28.
- Flores-Abuxapqui, J.J., Suarez-Hoil, G.J., Puc-Franco, M.D., Heredia-Navarrete, M.R., Vivas-Rosel, M.L., Oberhelman, R.A., 1997. Frequency of adhesive factors and enterotoxins in strains of Escherichia coli isolated from piglets with diarrhea. Vet. Latinoam. Microbiol. 39, 145-151.

- 208 Gaastra, W. & De Graaf, F. K., 1982. Host - specific fimbrial adhesins of noninvasive
209 Escherichia coli strains. Microbiol. Rev. 46, 129-161.
- 210 Garabal, J. I., Vásquez, F., Blanco, J., Blanco, M., González, E.A., 1997. Colonization
211 antigens of enterotoxigenic Escherichia coli strains isolated from piglets in Spain. Vet.
212 Microbiol. 54, 321-328.
- 213 Guinée, P. A. M., Agterber, C. M., Jansen, W. H., 1972. Escherichia coli O typing by means of a
214 mechanized microtechnique. Appl. Microbiol. 24, 127-131.
- 215 Guinée, P.A.M. & Jansen, W.H., 1979. Detection of enterotoxigenicity and attachment factors
216 in Escherichia coli strains of human, porcine and bovine origin: a comparative study. Zbl.
217 Bakt. I. Hyg. Abt. Orig. A, 243, 245-257.
- 218 Kwon, D., Kim, O., Chae, C., 1999. Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and
219 of O serogroups in Escherichia coli isolated from diarrheic piglets in Korea. J. Vet. Diagn.
220 Invest. 11, 146-151.
- 221 Leite, D.S., Yano, T., Castro, A.F.P., 1988. Production, purification and partial
222 characterization of a new adhesine factor (F42) produced by enterotoxigenic Escherichia
223 coli isolated from pigs. Ann. Inst. Pasteur / Microbiol. 139, 295-306.
- 224 Leite, D.S., Yano, T., Castro, A.F.P., 1997. Receptors on chicken erythrocytes for F42
225 fimbriae of Escherichia coli isolated from pigs. Zbl. Bakt. 286, 383-388.
- 226 Mainil, J.G., Daube, G., Jacquemin, E., Pohl, P., 1998. Virulence plasmids of enterotoxigenic
227 Escherichia coli isolates from piglets. Vet. Microbiol. 62, 291-301.
- 228 Nagy, B., Casey, T. A., Moon, H. W., 1990. Phenotype and genotype of Escherichia coli
229 isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. J. Clin. Microbiol. 28, 651-653.

- 230 Nagy, B., Fekete, P.Z., 1999. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals. Vet.
231 Res. 30, 259-284.
- 232 Ojeniyi, B. Ahrens, P., Meyling, A., 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in Escherichia coli
233 and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay,
234 polymerase chain reaction and phenotypic assays. J. Vet. Med. B 41, 49-59.
- 235 Osek, J., 1998. Application of polymerase chain reaction for determination of toxins in
236 Escherichia coli strains isolated from pigs with diarrhea. Acta Microbiol. Pol. 47, 409-413.
- 237 Osek, J., 1999. Prevalence of virulence factors of Escherichia coli strains isolated from
238 diarrheic and healthy piglets after weaning. Vet. Microbiol. 68, 209-217.
- 239 Parma, A. E., Sanz, M. E., Viñas, M. R., Cicuta, M. E., Blanco, J. E., Boehring, S. I., Vena,
240 M. M., Roibon, W. R., Benitez, M. C., Blanco, J., Blanco, M., 2000. Toxigenic
241 Escherichia coli isolated from pigs in Argentina. Vet. Microbiol. 72, 269-276.
- 242 Pickett, C.L., Twiddy, E.M., Belisle, B.W., Holmes, R.K., 1986. Cloning of genes that encode
243 a new heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Bacteriol. 165, 348-352.
- 244 Silveira, W.D., Yano, T., Azevedo, J.L., Castro, A.F.P., 1987. Plasmid-mediated production of
245 a new colonization factor (F42) in enterotoxigenic Escherichia coli. Rev. Genet. 4, 635-
246 646.
- 247 Söderlind, O., Thafvelin, B., Möllby, R., 1988. Virulence factors in Escherichia coli strains
248 isolated from Swedish piglets with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 26, 879-884.
- 249 Woodward, M. J. & Wray, C., 1990. Nine DNA probes for detection of toxin and adhesin
250 genes in Escherichia coli isolated from diarrhoeal disease in animals. Vet. Microbiol. 25,
251 55-65

- 252 Yano, T., Leite, D.S., Camargo, I.J.B., Castro, A.F.P., 1986. A probable new adhesive factor
253 (F42) produced by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs. Microbiol.
254 Immunol. 30, 1495-1508.
- 255 Zerbini, L.F.C., 1993. Fatores de Virulência e Sorotipos de Escherichia coli isolada de suínos
256 durante as primeiras semanas de vida. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de
257 São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 258

258 **Table 1** - Enterotoxigenic genotypes and Serogroups results of F42 *E. coli* strains isolated of feces
 259 diarrheic and non diarrheic from piglets.

Diarrheic			Non diarrheic		
ST-I	ST-II	Serogroup(s) (nº. of strains)	ST-I	ST-II	Serogroup(s) (nº. of strains)
+	+	O8 (3); O9(1); O11 (1); O32 (1).	+	+	O8 (2); O9 (1); O73 (1).
+	-	O98 (1); O101 (1).	+	-	O8 (1); O98 (1); O112 (1)
-	+	O8 (1); O18 (1); O35 (1).	-	+	O1 (1); O8 (1); O15 (1); O49 (1); O84 (1); O110 (1); NT (2)
-	-	O8 (1)	-	-	O98 (1)

260 NT= non-typable.