

**DETECÇÃO DE GENES DE TOXINAS DE *ESCHERICHIA COLI* EM SURTO  
DE  
COLIBACILOSE EM REBANHO SUÍNO EM PROPRIEDADE DO DF  
ARRUDA, L.F.; YASUNAGA, K.L.; TOCANTINS, B.B.; ARAÚJO, P.C.; SANTOS, R.S.T.;  
OLIVEIRA, V.H.S. de; OLIVEIRA, P.H.S. de; PERECMANIS, S.**

**Resumo:**

Casos de diarreia não hemorrágica são freqüentes em suinoculturas, principalmente entre animais jovens. Dentre estes casos é comum o pré-diagnóstico clínico de colibacilose causada por cepas enterotoxigênicas da *Escherichia coli*. Entretanto, outras cepas de *E. coli* podem ser encontradas em diarreias com estas características.

Com o objetivo de identificar genes de toxinas produzidas pela bactéria *E. coli* e relacioná-los a patótipos presentes na colibacilose, foram examinadas 15 amostras fecais de leitões com diarreia numa propriedade de suinocultura no Distrito Federal. Foi utilizada a técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) para a detecção da presença dos genes das toxinas termolábil I e II (LT- I e LT II), Toxinas *shiga like toxin* I e II (STX-I e STX-II). Apenas uma das amostras de *E. coli* isoladas demonstrou a presença do gene que codifica a enterotoxina termolábil do tipo LT-II. Esse resultado indica que a colibacilose, portanto pode estar relacionada a outros patótipos da *E.coli*, sendo necessários mais estudos sobre o assunto.

**Palavras-chave:** colibacilose, diarreia, leitões, fatores de virulência.

**Abstract:**

Cases of non-hemorrhagic diarrhea are frequent in swine breeding, especially in piglets. Among these cases it is common a predict clinical diagnosis of colibacillosis caused by enterotoxigenic strains of *E.coli*. However, other *E.coli* strains can be found in diarrheas with the same characteristics.

With the purpose to identify toxin genes produced by *E.coli* and relate them with the pathotypes in colibacillosis, 15 piglets fecal samples with diarrhea were examined in a swine breeding property in Distrito Federal. The polymerase chain reaction (PCR) technique was used to detect the presence of the thermolabile I and II toxin gene (LT-I and LT-II) and Shiga like toxin I and II gene(STX-I and STX-II). Only one of the *E.coli* isolated strains presented the gene which codificates the LT-II thermolabile enterotoxin. This result indicates that colibacillosis, furthermore, can be related to other pathotypes of *E.coli*. In this sense, it is necessary more studies about the theme.

**Keywords:** colibacillosis, diarrhea, piglets, virulence factors.

## **Introdução:**

O quadro clínico da colibacilose em suínos ocorre principalmente por dois mecanismos: a colibacilose da primeira semana e a colibacilose pós desmame. A afecção é freqüentemente atribuída a patótipos de *Escherichia coli* produtoras de enterotoxinas denominadas de *E. coli* enterotoxigênicas ou ETEC, que se aderem à mucosa intestinal, e por meio das toxinas provoca uma diarreia aquosa. O grupo ETEC pode produzir uma toxina termolábil (LT) e ou termoestável (ST). A toxina LT pode ser classificada em LT-I e LT-II, assim como a ST em I e II. (FRANCO, 2002; MORA, 2005).

Os demais patótipos responsáveis pelas gastroenterites em animais, crianças e adultos são classificadas como enteropatogênicas e podem ser divididas em: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) estão associadas a uma aderência localizada onde em decorrência da aderência epitelial ocorre destruição das microvilosidades. Assim, provocam uma diarreia que é clinicamente mais grave do que a provocada por outros patógenos, *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) que penetra as células epiteliais do cólon, rompe estas células e se multiplica nas células vizinhas. O processo desencadeado por esta cepa leva à necrose das células epiteliais e a uma diarreia sanguinolenta, enterohemorrágica (EHEC) que tem patogenicidade relacionadas à citotoxinas denominadas VTs ou toxinas "Shiga like" (SLTs) e são capazes de produzir lesões de esfacelamento, diarreia aguda e sanguinolenta podendo evoluir para síndrome urêmica hemolítica. (FRANCO, 2002; MORA, 2005).

Alguns patótipos como *E. coli* facultativamente enteropatogênica (FEEC), enteroagregativa (EAggEC), difusivamente aderente (DAEC), uropatogênica (UPEC), meningite neo natal (NMEC), tem seus mecanismos de ação não totalmente elucidados, e são classificadas de acordo com os seus fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia (FRANCO, 2002; MORA, 2005).

Esse trabalho foi realizado a partir da coleta de fezes diarreicas no mês de março de 2008, em uma propriedade de suinocultura no Distrito Federal onde ocorrem freqüentes surtos de colibacilose pós desmame, acentuados com a utilização de ração inadequada para a idade dos animais e teve como objetivo a confirmação dos patótipos presentes no surto estudado à partir da detecção de genes de enterotoxinas ( LT- I e LT II, STX-I e STX-II) possivelmente presentes nas *E. coli* isoladas nas amostras coletadas.

## **Materiais e métodos:**

Foram coletadas 15 amostras de fezes de suínos diretamente da ampola retal após contenção manual dos animais. As amostras foram inoculadas em Agar EMB e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após este período foram identificadas bioquimicamente segundo Quinn et al. (1994). Um total de quinze colônias de *E. coli* isoladas e numeradas de 1 a 15 para facilitar a identificação e foram transferidas para caldo BHI (brain heart infusion) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram armazenadas em uma geladeira a uma temperatura de 4°C.

Para o procedimento de extração de DNA as amostras de *E. coli* crescidas em caldo BHI foram homogeneizadas no vórtex. Foram transferidos

para tubos eppendorf 600µl do conteúdo de cada tubo, que foram centrifugados a 4°C, por 15 minutos, a 13000 rpm. A seguir descartou-se o sobrenadante e diluiu-se o precipitado em 250µl de água milli-Q. As amostras foram ressuspendidas no vórtex e os eppendorfs foram incubados a 100°C por 10 minutos, com o objetivo de liberar o DNA bacteriano. Novamente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 13.000 rpm, sendo o sobrenadante utilizado para a realização da Reação de Polimerização em cadeia (PCR).

As amostras foram testadas quanto a codificação de genes para as enterotoxinas LT-1, LT-2, STx-1 e STx-2. As sequências iniciadoras (primers) utilizadas no experimento foram segundo Salvadori, et al. (2003): LT-1(a) 5'-TATCCTCTCTATATGCACAG-3', LT-1(b) 5'-CTGTAGTGGAAGCTGTT ATA-3', LT-2(a) 5'-AGATATAATG ATG GATATGTATC-3', LT-2(b) 5'-TAACCCTCGAAATAAATCTC-3', STx-1(a) 5'-AGGTTGCAGCTCTCTT TCAATA-3', STx-1(b) 5'-TGCAAAC AAATTATCCCCTGAG-3', STx-2(a) 5'-GGGCAGTTATTTTGCTGTGGA-3', STx-2(b) 5'-GTATCTGCCTGA AGCGTAA-3'.

Os componentes da reação usados na PCR e suas respectivas quantidades foram 26µl de água milli-Q, 5µl de solução tampão (PCR Buffer), 1,5µl de Cloreto de Magnésio, 2,5µl de DNTPs, 1µl de cada primer, 10 µl do DNA das bactérias e 1µl de TAq polimerase (PHONEUTRIA®).

Para a primeira reação foram utilizados 1µl de primer de STx-1(a), 1µl de STx-1(b), 1µl de STx-2(a), 1µl de STx-2(b), totalizando 50µl. Para a segunda reação, 1µl de primer de LT-1(a), 1µl de LT-1(b), 1µl de LT-2(a), 1µl de LT-2(b), totalizando 50µl. Na terceira reação foram utilizados 1µl de STx-2e(a) e 1µl de STx-2e(b), totalizando 48µl.

Para a amplificação, foi utilizado um termociclador BIO-RAD® sendo aplicados 30 ciclos com as seguintes temperaturas: 94°C por 1 minuto (desnaturação); 58°C por 2 minutos (anelamento); 72°C por 1 minuto (atividade da Taq DNA Polimerase).

Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3%, pré acrescido de brometo de etídio, com um padrão de peso molecular PROMEGA®. Após a corrida eletroforética, a visualização foi feita em transluminador de ultravioleta UVP®.

## Resultados e Discussão:

Os resultados encontrados estão disponibilizados no Quadro um. Apenas uma das colônias isoladas, identificada como amostra 10, apresentou resultado positivo para detecção do gene da toxina LT-II por meio da técnica de reação de polimerização em cadeia.

**Quadro 1: Resultados da realização do teste da PCR para detecção dos genes das toxinas LT-I, LT-II, STX-I, STX-II.**

Amostras	LT-I	LT-II	STX-I	STX-II
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Na literatura atribui-se ao patotipo ETEC a maioria dos casos de colibacilose em leitões (AMEZCUA et al, 2008; ZHANG et al, 2007). Esse diagnóstico é baseado principalmente nas características clínicas apresentadas pelos animais afetados como a diarreia fluida acompanhada de desidratação rápida.

A circulação dos diferentes patotipos de *E. coli* entre as espécies animais pode ocorrer por serem estes microorganismos altamente adaptáveis a diferentes condições de habitat, tanto em condições anaeróbias no intestino animal, quanto em condições aeróbias extra-intestinais (SOUZA, 2006).

Zhang et al. (2007), citam a presença de cepas produtoras de toxinas LT, STa, STb, além da detecção dos genes da toxina EAST1 o que indica a circulação do patotipo enteroagregativo (EAggEC) em suinoculturas.

A detecção do gene AIDA-I relacionando a DAEC também é citada por Ravi et al (2007), como outro patotipo envolvido com a colibacilose suína.

A ausência de *E. coli* produtoras de STX-I e STX-II, em fezes de suínos também foi relatada por Oporto et al, (2007), embora experimentos de disseminação do agente e manutenção do mesmo em suínos tenham sido realizados (CORNICK & VUKHAC, 2008; ZHANG, 2007) o que se assemelha aos resultados encontrados no trabalho.

## Conclusão

A utilização da PCR dos genes das toxinas LT-I, LT-II, STX-I, STX-II não foi suficiente para diagnosticar os patótipos que ocorreram na propriedade. Entretanto com o resultado encontrado podemos indicar uma possível mudança de patótipos atuantes na colibacilose suína, que sugere a necessidade de novos estudos com a detecção de diferentes genes como o de toxinas STa e STb, AIDA e de outros fatores de patogenicidade relacionados a outros patótipos não enterotoxigênicos envolvidos com a afecção. Assim, com um diagnóstico mais preciso será possível estabelecer novas metodologias profiláticas e terapêuticas diferenciadas nas suinoculturas.

## Bibliografia

AMEZCUA, R., et al. An investigation of the presence of *Escherichia coli* O149:K91:F4 on pig farms in southern Ontario and the use of antimicrobials and risk factors associated with the presence of this serogroup. **Can Vet J**, v. 49, p. 39-45, Ontario, 2008.

CORNICK, N.A; VUKHAC, H. Indirect Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 Occurs Readily among Swine but Not among Sheep. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n. 8, p. 2488-2491, Iowa, 2008.

FRANCO, R.M. **Escherichia coli: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana**. 2002. 144f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. 2001.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Grafos: Spain, 1994. 648p.

MORA, A. et al; Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Reserch in Microbiology**, v.156, p. 793-806, Spain, 2005.

OPORTO, B. et al; *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *E. coli* in Healthy Cattle, Sheep and Swine Herds in Northern Spain. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 73-81, Spain, 2007.

RAVI, M. et. al.; Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 308-319, Canada, 2007.

SALVADORI, M.R. et al. Virulence Factors of *Escherichia Coli* Isolated From Calves With Diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, V. 34, p. 230-235, São Paulo, 2003.

ZHANG, W. et al.; Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 145-152, United States, 2007.