

Virulência de *Escherichia coli* O139:K82

Virulence of *Escherichia coli* O139:K82

Benito Guimarães de Brito^{1*}; Kelly Cristina Tagliari²; Itamar Antônio Piffer³;
Domingos da Silva Leite⁴; Ari Bernardes da Silva⁵

Resumo: Com o objetivo de identificar a patogenicidade e resistência a antimicrobianos da cepa de *Escherichia coli* BK125, foram utilizados os seguintes testes: sorotipagem, aglutinação em lâmina para detecção da fímbria F18, PCR para verificar a presença do gene Stx2e e teste de citotoxicidade para avaliar a expressão da verotoxina, ensaio para detecção de hemolisinas, patogenicidade em leitões e antibiograma. A cepa BK125 apresentou o seguinte perfil: F18⁺, Stx2e⁺, Hly⁺, resistente a estreptomicina, tetraciclina, sulfonamida e foi capaz de provocar a doença clínica e morte em leitões inoculados. Também foi possível o resgate dessa cepa de fezes diarréicas e do conteúdo intestinal dos leitões revelando assim, alto índice de recuperação de colônias inoculadas. Os resultados permitem concluir que a *E. coli* BK125 (O139:K82) é produtora de fatores de virulência e reproduz experimentalmente a doença do edema em suínos. **Palavras-chave:** diarréia, leitões, doença do edema, fatores de virulência.

Abstract: In order to evaluate the pathogenicity and antimicrobial resistance pattern of BK 125 *Escherichia coli* strain, several tests were assessed: serotype, slide agglutination for detection of the fimbriae F18, presence of the gene Stx2e, verotoxin production, hemolytic activity, pathogenicity assessment using piglet inoculation and antimicrobial resistance to drugs. The strain BK125 showed the following profile: F18⁺, Stx2e⁺, Hly⁺, resistance to streptomycin, tetracycline, sulfonamides. It produced clinical disease and death of infected piglets. Moreover, it was possible to recover the BK125 strain from diarrheic feces and from the gut contents of the piglet, with high rate of recovery of colonies expressing fimbriae F18. The present results suggest that the *E. coli* BK125 (O139:K82) strain could produce virulence factors and experimentally reproduce oedema disease in pigs.

Key words: diarrhoea, piglets, oedema disease, virulence factors.

Introdução

A doença do edema é uma enfermidade que acomete leitões desmamados e está relacionada a determinadas cepas de *Escherichia coli* dos sorotipos O138:K81, O139:K82 e O141:K85, portadores de diversos fatores de patogenicidade, entre eles fímbrias e toxinas (IMBERECHTS *et al.*, 1993; BERTSCHINGER; GYLES, 1994).

A adesão da bactéria à célula do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e infecção. A aderência é um fenômeno específico de reconhecimento entre o microrganismo e as células do animal infectado e ocorre entre as adesinas fimbriais e não fimbriais e seus receptores correspondentes na superfície celular (SMYTH *et al.*, 1994). Em suínos as fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41 estão relacionadas com distúrbios entéricos e a F18 (F107) com a doença do edema (FAIRBROTHER *et al.*, 1986; POST *et al.*, 2000). Outros fatores de virulência importantes na patogenia das

enfermidades são as toxinas de *E. coli*, as quais classificam-se em: endotoxinas e exotoxinas, e têm papel importante nas diarréias dos suínos e na doença do edema (MORRIS; SOJKA, 1985).

Determinadas cepas de *E. coli* produzem toxinas protéicas que podem exercer um papel importante na patogenia das doenças, tais como: a hemolisina, a colicina, a enterotoxina termolábil (LT); a enterotoxina termoestável (ST); a verotoxina ou Shiga-toxina (VT ou Stx) e o fator necrosante citotóxico (CNF) (GYLES, 1992). A produção de hemolisina é freqüente em cepas provenientes das patologias entéricas. A presença deste fenótipo como marcador de clones virulentos foi utilizado por vários autores como indicadores de patogenicidade (VAN den BOSCH *et al.*, 1982; BRITO *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2000).

Segundo Gyles (1994), as verotoxinas são classificadas em dois tipos imunologicamente distintos, Stx1 e Stx2 as quais possuem atividade citotóxicas para

¹ Pesquisador do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP: 86.051-970, Londrina-PR, Brasil. *Bolsista CAPES-PICDT. E-mail: <bgbrito@zipmail.com.br>.

² Doutoranda do curso de Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

³ Pesquisador da EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia-SC, Brasil.

⁴ Docente do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil.

⁵ Docente do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil.

células Vero e HeLa. A Stx2 apresenta três variantes denominadas Stx2e, Stx2c e Stx2d, sendo que Marques *et al.* (1987) purificaram a Stx2e e provaram que esta toxina é responsável pela doença do edema.

A reprodução experimental da doença do edema tem sido realizada por diversos pesquisadores de outros países (KAUSCHE *et al.*, 1992; SARRAZIN; BERTSCHINGER, 1997; JOHANSEN *et al.*, 2000) utilizando para tal cepas de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC) portadoras do fator de colonização F18. No Brasil foram realizados estudos de detecção dos fatores de virulência em amostras de *E. coli* envolvidas em surtos de doença do edema (SILVA *et al.*, 2001), entretanto não existem relatos sobre a reprodução experimental desta doença com cepas isoladas de suínos criados no Brasil.

Assim, o objetivo deste trabalho foi de detectar os fatores de virulência da *E. coli* BK125 e também reproduzir experimentalmente a doença do edema através do uso desta cepa.

Material e métodos

Uma cepa de *E. coli* denominada BK125 foi isolada do intestino delgado de leitão de trinta e cinco dias de idade, com sintomatologia clínica de doença do edema. Esta cepa foi caracterizada através de testes bioquímicos conforme descrito por Cowan e Steel (1970). Durante toda a realização dos experimentos a cepa foi mantida em meio Dorset à temperatura ambiente.

A classificação sorológica foi realizada conforme técnica descrita por Sojka (1965) usando antissoros capazes de identificar as cepas de *E. coli* que freqüentemente causam diarreia em suínos. Além da classificação sorológica foram caracterizados os seguintes mecanismos de virulência "in vitro": ensaios para detecção de hemolisina e verotoxina, teste de sensibilidade aos antibióticos, expressão da fímbria F18.

A atividade hemolítica foi avaliada utilizando ágar sangue contendo 5% de sangue de ovino desfibrinado. A cepa BK125 foi semeada em ágar sangue e incubada a 37°C durante 24 horas para avaliação do halo de hemólise (LUDWIG; GOEBEL, 1997).

A capacidade de produção de verotoxina foi avaliada pela metodologia descrita por Konowalchuk *et al.* (1977). As *E. coli* foram cultivadas em Trypticase Soy Broth (TSB), após foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante filtrado em Millipore 0,45 µm e os extratos bacterianos foram submetidos aos testes de esterilidade. A detecção das citotoxinas foi realizada em monocamadas de células Vero, cultivadas em microplacas de 96 orifícios e mantidas a 37°C em meio de cultura "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM) suplementado com gentamicina (50 µg/ml), anfotericina B (2,5 µg/ml) e 10% de soro fetal bovino. Após duas lavagens com DMEM, a monocamada foi inoculada com os extratos bacterianos numa diluição 1:10 em DMEM suplementado com gentamicina/anfotericina B nas mesmas concentrações, sem soro

fetal bovino. Os ensaios foram realizados em duplicata e mantidos a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂ e observados por cinco dias quanto a presença de efeitos citotóxicos. Como controles foram utilizados extratos, obtidos da mesma forma acima descrita, das cepas H30 (O26:H11, Stx1⁺), controle positivo para Stx e K12-C600 controle negativo.

A análise genotípica foi realizada através da reação em cadeia pela polimerase conforme metodologia descrita por Blanco *et al.* (1997), usando os oligonucleotídeos Stx2e1: CCT.TAA.CTA.AAA.GGA.ATA.TA e Stx2e2: CTG.GTG.GTG.TAT.GAT.TAA.TA (JOHNSON *et al.*, 1990). Para a reação de amplificação, as cepas foram cultivadas em caldo Luria-Bertani durante 18h a 37°C. Um mililitro da cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto. O sedimento foi ressuspenso em 400 µl de água destilada estéril e submetido à fervura, em banho-maria, durante 10 min. Cinco microlitros das preparações de DNA manipuladas assepticamente e mantidos em banho de gelo, foram homogeneizados com 20 µl de solução contendo 0,2 mM de cada nucleotídeo, 0,5 µM/µl de cada primer e 2,5 U de Taq DNA-polimerase em tampão. A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em termociclador, submetendo-se as reações a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (fase de desnaturação), 1 minuto a 55°C (fase de anelamento) e 1 minuto a 72°C (fase de alongamento). O padrão para a toxina foi Stx2e (cepa #51191) e como controle negativo foi utilizado a *E. coli* Hb101 e água destilada em substituição ao DNA.

Após o período de amplificação, uma alíquota de 10 µl da reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, durante cerca de uma hora a 50 volts. As bandas de DNA foram coradas com uma solução a 0,01 mg/ml de brometo de etídio e visualizado em transluminador de ultra-violeta. Um padrão de peso molecular (100bp DNA "Ladder", Gibco-BRL, USA) foi incluído no gel. A massa molecular do fragmento amplificado foi de 230 pb.

Para avaliar a expressão da fímbria F18 foi realizado o teste de aglutinação em lâmina com soro. *E. coli* foi cultivada em meio ágar Minca a 37°C durante 24 horas e 30 µl do anti-soro monoespecífico foram homogeneizados com uma porção do crescimento bacteriano, em lâmina de microscopia, e a leitura foi procedida após 1 minuto (SILVA *et al.*, 2001).

O teste de resistência aos antimicrobianos foi realizado através da técnica de difusão do antibiótico impregnado em discos de papel filtro (BAUER *et al.*, 1966). Três colônias isoladas a partir do meio Trypticase Soy Agar (TSA) foram cultivadas em recipiente contendo 3 ml de caldo nutriente, a 37°C durante 2 horas e então a cultura foi diluída 1:100 em salina fisiológica e semeada com suabe em ágar Müeller-Hinton, de forma a obter um crescimento confluyente. Após a secagem das placas, os seguintes discos de antimicrobianos foram usados: ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), canamicina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), colistina (10 µg), estreptomina (10 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), sulfonamidas (300 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim + sulfamoxazole

(25 µg). As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Os discos foram testados previamente com a cepa de *E. coli* ATCC 25922, sensível a todos os agentes antimicrobianos. Os resultados foram determinados medindo-se os halos de inibição de crescimento e comparando-os com os valores apresentados nas tabelas padrões.

No teste de patogenicidade em leitões foram utilizados 20 leitões da raça Landrace, filhos de matrizes primíparas, desmamados aos 28 dias de idade. O inóculo foi produzido a partir do cultivo das cepas BK125 e a cepa K12-711 foi usada como controle negativo do teste, em TSB a 37°C, durante 18 horas e no dia seguinte padronizado em espectrofotômetro para conter 5×10^8 UFC/ml. Através da sonda intragástrica estéril foi administrado 20 ml de inóculo em cada leitão no terceiro dia após o desmame. Foi observada diariamente a ocorrência de diarreia e a mortalidade dos leitões até nove dias após a inoculação. Nos leitões mortos foi realizada a necropsia e registrado os achados macroscópicos principais a nível intestinal. Ao mesmo tempo foram coletados conteúdo fecal, jejuno e íleo, para exames bacteriológicos, sendo isolado também 5 colônias lactose positivas. Culturas das colônias isoladas dos animais necropsiados foram então examinadas quanto a expressão da fímbria F18 e hemolisina, estes dois fatores de virulência foram escolhidos como marcadores de virulência da cepa estudada, devido a facilidade de detectar a expressão nas colônias a serem testadas. A detecção foi realizada através da metodologia descrita nos itens anteriores. Durante o período experimental foram escolhidos aleatoriamente três leitões inoculados com a cepa K12-711, os quais foram sacrificados e realizados os exames bacteriológicos descritos acima.

Resultados e Discussão

A cepa BK125 foi classificada sorologicamente como sorotipo E57 (O139:K82). Este sorotipo tem sido detectado em levantamentos epidemiológicos realizados por pesquisadores em outros países (IMBERECHTS *et al.*, 1993; BERTSCHINGER; GYLES, 1994). No Brasil, Brito *et al.* (1995) verificaram este sorotipo em cepas de *E. coli* que causaram diarreias em leitões de granjas do Paraná. Recentemente Silva *et al.* (2001) estudaram 99 cepas de *E. coli*, produtoras de Stx2e, isoladas de leitões com doença do edema, criados em granjas da região Sudoeste e Norte do Paraná, e verificaram que 41 apresentavam o antígeno somático 139, sendo o sorogrupo de maior ocorrência na região.

Em relação aos fatores de virulência presentes na BK125 observamos que expressou a fímbria F18, além de hemolisina e a citotoxina Stx2e. A cepa BK125 foi resistente aos seguintes antimicrobianos: estreptomicina (ST^R), tetraciclina (TT^R) e sulfonamidas (SF^R). A amostra foi sensível ao ácido nalidíxico, ampicilina, canamicina, cloranfenicol, colistina, gentamicina, neomicina, nitrofurantoína e trimetoprim+sulfamethoxazole.

Dos 10 animais inoculados com a cepa BK125, 7 (70%) animais apresentaram manifestação clínica da

doença do edema. Os 10 animais inoculados com a cepa K12-711 não apresentaram nenhuma alteração clínica no período experimental. Três animais inoculados com a cepa BK125 morreram e na necropsia apresentaram diarreia, intestino congesto com zonas hemorrágicas, gases no estômago e edema no mesentério.

Os resultados dos exames bacteriológicos realizados a fim de detectar, no conteúdo intestinal e nas fezes dos leitões inoculados, a presença de colônias produtoras dos fatores de virulência F18 e hemolisina, originalmente presente na cepa usada para o preparo do inóculo. Foi verificado que nas quinze cepas isoladas dos leitões, 14 (93,3%) cepas expressaram a fímbria F18 e 15 (100%) cepas sintetizaram hemolisina, estes dados sugerem que os leitões foram eficientemente colonizados. Os leitões inoculados com a cepa K12-711, utilizados como controle negativo no experimento, não apresentaram diarreia. O exame bacteriológico do conteúdo fecal e das fezes de três animais sacrificados, não revelou cepas portadoras dos fatores de virulência estudados.

Vários pesquisadores que inocularam culturas de *E. coli* em leitões, não tiveram êxito na reprodução experimental da doença do edema dos suínos (LLOYD, 1957; SMITH; JONES, 1963; BERTSCHINGER; GYLES, 1994). Smith e Halls (1968) foram os primeiros pesquisadores a reproduzirem a doença em suínos. As falhas na reprodução experimental devem-se a resistência genética dos animais, a inexistência de fatores de virulência bacterianos importantes na colonização intestinal ou na produção da verotoxina (BERTSCHINGER; GYLES, 1994). A reprodução experimental da doença do edema, tem sido realizada com o uso de cepas VTEC portadoras da fímbria F18 por diversos pesquisadores (KAUSCHE *et al.*, 1992; SARRAZIN; BERTSCHINGER, 1997; JOHANSEN *et al.*, 2000). Os nossos resultados permitiram caracterizar os mecanismos de virulência da cepa BK125, isolada de leitão com doença do edema de granja do Paraná e ao mesmo tempo demonstraram a capacidade da cepa de reproduzir a doença do edema através do uso de uma cepa de *E. coli* isolada no Brasil.

Conclusões

A cepa BK125 classificada sorologicamente como E57 (O139:K82) portadora dos seguintes fatores de virulência: hemolisina, verotoxina, F18⁺ e com perfil de resistência antimicrobiano: estreptomicina, tetraciclina e sulfonamidas, reproduziu experimentalmente a doença do edema em suínos.

Agradecimento

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pelo financiamento do projeto.

Referências

BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493-496, 1966.

- BERTSCHINGER, H.U.; GYLES, C.L. Oedema disease of pigs. In: GYLES, C.L. *Escherichia coli in domestic animals and humans*. Oxon:CAB International, 1994. p.193-219.
- BLANCO, M. *et al.* 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.*, v.35, p.2958-2963, 1997.
- BRITO, B.G. *et al.* Etiologia da diarréia de leitões lactentes em granjas suínolas do sudoeste do Paraná. *Semina*, v. 16, n.1, p.7-13, 1995.
- BRITO, B.G. de *et al.* Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet. Microbiol.*, v.65, p.123-132, 1999.
- COWAN, S.T.; STEEL, K.J. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge: Cambridge University, 1970. 217 p.
- FAIRBROTHER, J.M., LARIVIÈRE, S., LALLIER, R. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infect. Immun.*, v. 51, n. 1, p. 10-15, 1986.
- GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.*, v. 36, p. 734-746, 1992.
- GYLES, C.L. *Escherichia coli* verotoxins and other cytotoxins. In: GYLES, C.L. *Escherichia coli in domestic animals and humans*. Oxon:CAB International, 1994. p.365-398.
- IMBERECHTS, H. *et al.* La maladie de l'oedème du porcelet. *Rec. Méd. Vét.*, v.169, n.8/9, p.665-674, 1993.
- JOHANSEN, M. *et al.* Prevention of edema disease in pigs by passive immunization. *Can. J. Vet. Res.*, v.64, n.1, p. 9-14, 2000.
- JOHNSON, W.M. *et al.* Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p.2351-2353, 1990.
- KAUSCHE, F.M. *et al.* An experimental model for subclinical edema disease (*Escherichia coli* enterotoxemia) manifest as vascular necrosis in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 3, p. 281-287, 1992.
- KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v.18, n.3, p.774-779, 1977.
- LLOYD, M.K. Oedema disease in swine. Discussion of paper given by J.F. Timoney. *Vet. Rec.*, v.69,p.1160-1175, 1957.
- LUDWIG, A.; GOEBEL, W. Haemolysins of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. *Escherichia coli mechanisms of virulence*. Cambridge:Cambridge University, 1997. p. 281-329.
- MARQUES, L.R.M. *et al.* *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.44, p.33-38, 1987.
- MARTINS, M.F. de *et al.* Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.76, p.51-59, 2000.
- MORRIS, J.A.; SOJKA, W.J. *Escherichia coli* as a pathogen in animals. In: SUSSMAN, M. *The virulence of Escherichia coli*. London:Academic, 1985. p. 47-77.
- POST, K.W., BOSWORTH, B.T., KNOTH, J.L. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea and edema disease in North Carolina. *Swine Health Prod*, v.8, n.3, p.119-120, 2000.
- SARRAZIN, E.; BERTSCHINGER, H.U. Role of fimbriae F18 for actively acquired immunity against porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, v.54, p.133-144, 1997.
- SILVA, A.S. da *et al.* *Escherichia coli* strains from edema disease: O serogroups, and genes for Shiga toxin, enterotoxins, and F18 fimbriae. *Vet. Microbiol.*, v.80, p.227-233, 2001.
- SMITH, H.W.; HALLS, S. The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. *J. Med. Microbiol.*, v.1, p.45-59, 1968.
- SMITH, H.W.; JONES, J.E.T. Observations on the alimentary tract and its bacterial flora in healthy and diseased pigs. *J. Pathol. Bacteriol.*, v.86, p.387-412, 1963.
- SMYTH, C.J.; MARRON, M.; SMITH, S.G.J. Fimbrial of *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L. *Escherichia coli in domestic animals and humans*. Oxon:CAB International, 1994. p.399-435.
- SOJKA, W.J. *Escherichia coli domestic animals and poultry*. Weybridge: Commonwealth Agric. Bureau (Review series 7 of the Commonwealth Bureau of Animal Health), 1965. 112 p.
- VAN DEN BOSCH, J.F., EMÖDY, L., KÉTYI, I. Virulence of haemolytic strains of *Escherichia coli* in various animal models. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 13, p. 427-430, 1982.