

ESTUDO GENÉTICO DE FATORES DE PATOGENICIDADE EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE SUÍNOS NA REGIÃO DE LONDRINA, PR.*

IMARILDA C. VIDOTTO^a
ERNST E. MULLER^b
JULIO CESAR DE FREITAS^b
AMAURI A. ALFIERI^b

RESUMO

No presente trabalho foram estudadas 25 culturas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia, quanto a produção dos seguintes fatores de virulência: enterotoxina termolábil (LT), enterotoxina termoestável (STa) e os fatores de colonização K88 e K99. Foi testada a produção de hemolisina, colicina V e resistência a drogas antimicrobianas, além do estudo de transferência por conjugação dos plasmídios Col V, STa, Hly e K88. Nove amostras (36% produziram hemolisina e Colicina V, 4 (16%) LT, 3 (12%) STa e 3 (12%) K88. Das 25 cepas estudadas, 24 (96%) mostraram resistência a drogas e 21 (84%) resistência múltipla, das amostras resistentes 12 (50%) transferiram os marcadores de resistência às drogas das 9 amostras colicinogênicas, 5 transferiram o plasmídeo Col V. Em 1 das 3 cepas produtoras de STa, os genes para STa foram transferidos juntos com os da colicina V num mesmo plasmídeo. Em outra cepa, o plasmídeo STa foi transferido para amostra receptora simultaneamente com o plasmídeo que codifica a produção de colicina V e resistência à tetraciclina e estreptomicina. A informação genética para produção de hemolisina e antígeno K88 não foram transferidos para amostras receptoras.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*, virulência, plasmídios, resistência a drogas.

1. INTRODUÇÃO

As doenças entéricas em suínos são da maior importância em virtude das perdas econômicas que causam ao produtor (BEER, 1981; HARRIS & LOCK, 1975), destacando-se por sua prevalência, a *E. coli* enteropatogênica que afeta os leitões em diferentes faixas etárias, principalmente nas primeiras horas após o nascimento, causando diarreia (WILLINGER, 1981).

As cepas de *E. coli* enteropatogênicas envolvidas nas diarreias dos suínos, estão mais freqüentemente distribuídas nos sorogrupos 08, 09, 020, 045, 0101, 0138, 0139, 0141, 0147, 0149 e 0157 (CHEN et alii 1984); ORSKOV & ORSKOV, 1979).

A enteropatogenicidade da *E. coli* está estreitamente relacionada com a capacidade de adesão pelo pili ou fimbriae desta bactéria à parede do intestino delgado e de produzir enterotoxina (KOHLENER, 1972; GAATRA & GRAAF, 1982), sendo o fator de colonização freqüentemente detectado, o K88 (ORSKOV et alii, 1979) com três tipos: K88 ab, K88 ac e K88 ad (GUINEE, 1979). Em algumas amostras enteropatogênicas para suínos também tem sido identificados os antígenos K99, 987p e F41 (MOON, 1977, MORRIS, 1982 e 1983).

Os determinantes genéticos responsáveis pela produção destes antígenos de superfície assim como a produção de enterotoxinas LT (termolábil) e ST (termoestável) localizam-se nos plasmídios (ORSKOV, 1966; SMITH & HALLS, 1968). A presença dos plasmídios Ent e K88 é suficiente para converter cepas de *E. coli* da flora intestinal normal de suínos em amostras enteropatogênicas (SMITH & LINGGOOD, 1971).

Determinadas cepas de *E. coli* podem produzir colicina, que diferentes pesquisadores procuram correlacionar com a eventual patogenicidade da amostra (BRANDIS & SMARDA, 1971) e uma porcentagem relativamente alta das cepas enteropatogênicas de *E. coli* também apresentam propriedades hemolisantes. (WITTIG, 1968).

Em relação a resistência a antimicrobianos, um número cada vez maior de cepas de *E. coli* apresentam resistência à uma ou mais drogas (WILLINGER, 1981 e CHEN et alii, 1984). Parte desta resistência é mediada por plasmídios R, os quais podem mobilizar ou contrtransferir os fatores de virulência (ELWELL et alii, 1980). Um plasmídeo conjugativo com informação genética para a síntese de toxina ST e LT e resistência à tetraciclina (Tc) e estreptomicina (Sm), foi isolado de *E. coli* de origem suína (GYLES et alii, 1977). A transferência "in vivo" deste plasmídeo foi demonstrada em 1978, pelo mesmo pesquisador.

O objetivo deste trabalho foi o de estudar diferentes cepas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia na região de Londrina, no que se refere a transferência genética de plasmídios que medeiam a produção de enterotoxina, antígenos de aderência, hemolisina e colicina assim como a contrtransferência destas características com os plasmídios R. transmissíveis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram estudadas 25 cepas de *E. coli* isoladas a partir de fezes coletadas de suínos com diarreia.

Para os experimentos de conjugação foram utilizadas co-

^a Depto. Patologia Geral do CCB/Uel

^b Depto. Medic. Vet. Prev. Patologia Animal e Zootecnia do CCA/Uel

* Financiada pelo CNPq e CPG/Uel.

mo receptoras as amostras de *E. coli* K 12 711 (phe his pro trp lac Nal^R), C 600 (thr leu thy thi lac Nal^R) e J 53 (pro met thi). Como indicadoras para a produção de colicina foi empregada a cepa MA 335 e para a tipagem as linhagens 20 R 675 (Col E₁), 20 R 676 (Col E₂), 22 R 81 (Col I), 22 R 82 (Col Ia), 22 R 83 (Col Ib), 20 R 914 (Col K), 20 R 915 (Col V) e 20 R 996 (Col B).

Para o isolamento de *E. coli* seguiu-se o esquema recomendado por WILLINGER (1981), a tipagem sorológica foi realizada no Departamento de Microbiologia e Imunologia, UNICAMP, a colicina foi tipificada pela técnica de AZEVEDO e COSTA (1973) e a produção de hemolisina em ágar sangue ovino.

Os testes de resistência a drogas antimicrobianas foram efetuadas pelo método da diluição em placa utilizando-se o ágar de Muller Hinton (DIFCO) ou Trypticase Soy agar (Difco).

Para a detecção da enterotoxina Sta foi empregado o teste do camundongo neonato segundo DEAN et alii (1972) e a LT foi testada pelo método da imunohemólise passiva (CASTRO et alii, 1980). Os antígenos de aderência foram verificados pelo método de hemaglutinação manose resistentes. (JONES e RUTTER, 1974).

A transferência dos plasmídios Ent, Hly, K 88, Col e R foi efetuada segundo SMITH & LINGGOOD. A transferência do antígeno K 88 foi testada em 200 colônias selecionadas em meio MacConkey contendo Nal e a transferência da produção de colicina em 50 colônias, crescidas no mesmo meio. Os transconjugantes resistentes às drogas e os produtores de colicina foram testados para produção de toxina Sta.

Os plasmídios foram analisados pela eletroforese em gel de agarose descrita por ECKHARDT (1978) e os pesos moleculares estimados utilizando-se os plasmídios de referência Ent P 307 (LT, ST, 54 x 10⁶ daltons) RR 4 (Tc Km, Ap, 35 x 10⁶ daltons) Sa(Su, Sm Ap Km, 23 x 10⁶ daltons) e p BR 322 (Tc, Ap, 2,6 x 10⁶ daltons).

3. RESULTADOS

Das 25 culturas de *E. coli* examinadas 2 foram tipificadas como sendo do sorogrupo O 149; K 91 K 88 ac. As demais cepas não foram classificadas sorologicamente pelo conjunto de antisoros utilizados.

Na tabela I estão relacionados os resultados referentes a produção de hemolisina, colicina V, antígenos de aderência e toxinas. Das 25 culturas, 9 (36%) apresentaram hemolisina, 9 (36%) produziram colicina V, e destas, 2 ainda produziram Sta e 1 Sta e LT. A enterotoxina foi identificada em

7 (28%) amostras sendo a LT detectada em 4 (16%) e a Sta em 3 (12%). Uma cepa mostrou as duas toxinas. O antígeno de aderência K88 foi demonstrado em 3 (12%) culturas produtoras de LT. Nenhuma cepa apresentou o K99.

A Tabela II mostra o nível e o modelo de resistência antimicrobiana das *E. coli* isoladas. Das 25 culturas pesquisadas, 24 (96%) apresentaram resistência a destas 21 (84%) resistência múltipla. À tetraciclina 24 (96%) se apresentaram resistentes, à sulfadiazima 17 (68%), á estreptomicina 14 (56%) e ao cloranfenicol 10 (40%).

As amostras foram analisadas eletroforéticamente em gel de agarose constatando-se a presença de um número de plasmídios que variou entre 2 a 6 (Fig. I e II).

Os experimentos de conjugação mostraram que 50% das amostras possuíam plasmídios R conjugativos (Tabela III). Das 9 amostras colicinogênicas, 5 transferiram os plasmídios Col V (amostras 8, 14, 17, 22 e 25) e a produção de hemolisina foi transferida apenas na amostra 25, de 8 amostras testadas. Nas tentativas de transferência do antígeno K88 não se obteve nenhum transconjugante K88+ com o número de amostras testadas.

Além da alta percentagem de plasmídios R e col conjugativos, foi encontrado 1 plasmídios codificando a produção de colicina V e toxina Sta na amostra 22. Esta amostra também apresentou um plasmídio R conjugativo responsável pela resistência à Tc e Sm. A amostra 711 que recebeu os dois plasmídios (transconjugante 711/R Col Sta) foi utilizada para o estudo de retransferência com a amostra C600 e eletroforese em Gel de agarose.

A figura 3 mostra a análise eletroforética da amostra 22 e os transconjugantes obtidos. A amostra 22 possui 4 plasmídios, bandas A, B, C e D (1); o transconjugante 711/R Col Sta também apresentou as bandas A, B e C (2); o transconjugante 711/Col Sta apresentou apenas a banda B (3) e o transconjugante obtido da retransferência, C600/Col ST também recebeu o mesmo plasmídio, banda B(4)

A amostra 8 transferiu por conjugação para a receptora 711, a produção de colicina V, toxina Sta e resistência a Tc e Sm. A análise eletroforética da amostra mostrou a presença de 5 plasmídios (Fig. 4, bandas A, B, C, D e E). Ainda na Fig. 4 verifica-se que o transconjugante 711/R Col ST (2) recebeu 2 plasmídios (bandas B e E), enquanto que o transconjugante obtido da retransferência C600/R Col (5,6) apresentaram apenas a banda B. Estes transconjugantes não apresentaram a produção de toxina Sta, indicando que o plasmídio Sta é o de baixo peso molecular aproximadamente 1,6 x 10⁶ daltons e provavelmente foi mobilizado pelo plasmídio de resistência à Tc, Sm e Col V. (54 x 10⁶ daltons).

TABELA 1
FATORES DE VIRULÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADOS DE SUÍNOS, LONDRINA - PR.

Fatores	Amostras	Nº amostras	%
Hly	1, 2, 4, 7, 12, 14, 23, 24 e 25	09	36
Col V	7, 8, 12, 14, 17, 18, 20, 22 e 25	09	36
ST(a)	7, 8 e 22	03	12
LT	2, 4, 8 e 24	04	16
K88	2, 4 e 24	03	12
Hly	– Hemolisina		
Col V	– Colicina		
STa	– Toxina termoestável		
LT	– Toxina termolábil		
K88	– Antígeno de adesão		
Total de amostras analisadas: 25			

TABELA 2
Nível e modelo de resistência às drogas antimicrobianas em 25 amostras de *E. coli* isoladas de suínos

Amostras	Ap	Cm	Tc	Su	Km	Sm	Modelo de Resistência
1	> 1000	350	150	350	—	50	Ap Cm Tc Su Sm
2	—	350	200	—	—	50	Cm Tc Sm
3	—	—	50	—	—	—	Tc
4	> 1000	350	200	350	> 1000	50	Ap Cm Tc Su Km
5	—	—	200	> 1000	—	100	Su Tc Su
6	—	—	200	> 1000	—	150	Su Tc Sm
7	—	—	100	—	—	100	Tc Sm
8	—	—	200	—	—	150	Tc Sm
9	—	—	150	—	—	—	Tc
10	—	—	200	> 1000	—	150	Tc Su Sm
11	> 1000	200	200	> 1000	1000	200	Ap Cm Tc Km Su Sm
12	—	—	200	> 1000	500	—	Tc Su Km
13	—	—	200	> 1000	—	—	Tc Su
14	—	350	150	> 1000	—	150	Cm Tc Su Sm
15	—	—	150	—	—	—	Tc
16	—	—	100	> 1000	—	150	Tc Su Sm
17	—	—	—	—	—	—	—
18	—	200	200	1000	—	100	Tc Cm Su Sm
19	> 1000	350	200	> 1000	> 1000	—	Ap Cm Tc Su Km
20	—	200	200	1000	—	—	Tc Cm Su
21	—	—	200	1000	—	100	Tc Su Sm
22	—	—	350	—	—	50	Tc Sm
23	—	350	200	1000	—	—	Ap Cm Tc
24	—	350	200	1000	—	—	Ap Cm Tc
25	—	—	200	350	—	—	Tc Su

Ap (ampicilina), Cm (cloranfenicol), Tc (tetraciclina), Su (sulfadiazina), Km (Kanamicina), Sm (estreptomicina).
Concentração de antibióticos: ug/ml

TABELA 3
Transferência da resistência aos antimicrobianos (R) de 12 amostras resistentes de *E. coli* isoladas de suínos para a receptora K12.711.

Amostras	Modelo Resistência	Resistências transferidas					
		Ap	Cm	Km	Sm	Su	Tc
1	Ap Cm Tc Sm Su	+	+				+
2	Cm Tc Sm		+	+		+	
3	Tc						+
4	Ap Cm Tc Su Km	÷	+	+		+	+
8	Tc Sm				+		+
11	Ap Cm Tc Km Su Sm	+			+		+
13	Tc Su						+
19	Ap Cm Tc Su Km	+					
20	Cm Tc Su						+
22	Tc Sm						+
23	Ap Cm Tc	+	+				+
24	Ap Cm Tc	+	+				+

Ap (ampicilina), Cm (cloranfenicol), Tc (tetraciclina), Su (sulfadiazina), Km (kanamicina), Sm (estreptomicina).

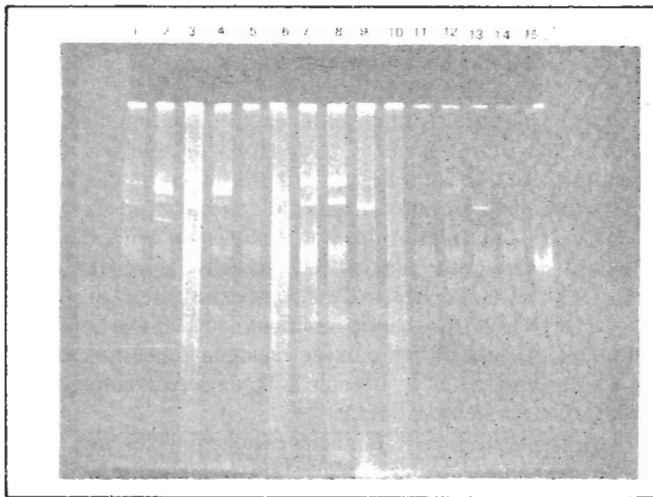


Figura 1

Análise eletroforética das amostras de *E. coli*, linhagem 1 a 11 (1 - 11), e os plasmídios de referências: P307, RP4, Sa e pBR322 (12 - 15).

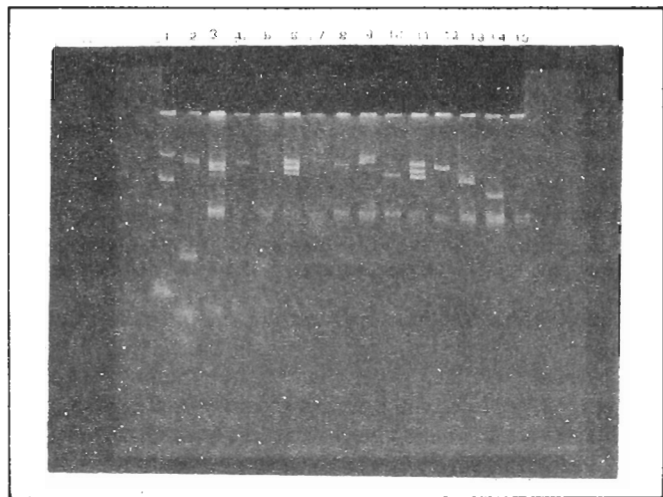


Figura 2

Análise eletroforética das amostras de *E. coli*, linhagem 12 a 22 (1 - 11) e os plasmídios P307, RP4, Sa e pBR322 (12 - 15).

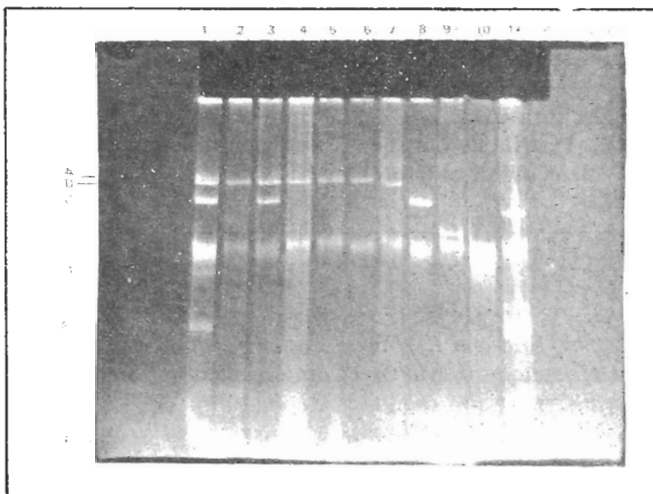


Figura 3

Análise eletroforética da amostra 8(1), 711/R Col STa (2), 2 transconjugantes 711/R Col (3 e 4), 2 C600 / R Col (5 e 6) e os plasmídios de referências P307, RP4, Sa, pBR322 e V517 (7 - 11).

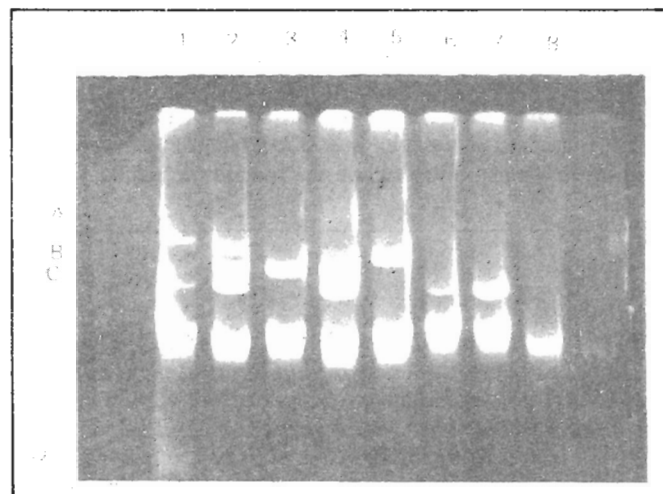


Figura 4

Análise eletroforética da amostra 22 (1), 711 / R col STa (2), 711 / Col STa (3), C600 / Col STa (4) e os plasmídios P307, RP4, Sa, pBR322 (5 - 8).

4. DISCUSSÃO

Foram detectados fatores de virulência em 25 amostras de *E. coli* isoladas de suínos na região de Londrina e alguns destes fatores demonstraram ser transferíveis para amostras não patogênicas.

Em 127 culturas, CHEN et alii (1984) verificaram ST em 21,3%, ST em 8,7%, antígeno K99 em 11% e K88 em 1 amostra; e CASTRO et alii (1981), examinando 477 amostras de *E. coli* detectaram LT em 8(1,67%) das quais uma com antígeno K88, enquanto que das 86 (18,02%) STa-positivas, 9 com K88. Embora o número de amostras analisadas neste trabalho tenha sido limitado (25) encontrou-se 3 (12%) amostras produtoras de STa, 4 (16%) LT, 3 (12%) K88 e 9 (36%) Col V.

DJONNE (1985) examinando 315 cepas de *E. coli* causadoras de diarreias em leitões neonatos, verificou que 100% das cepas produtoras de enterotoxina e 99% das produtoras de antígeno K88 e K99 produziram colicina, mas 17% das não enteropatogênicas e 23% das cepas que não possuíam antígeno K, também o fizeram.

Apesar dos dados de DJONNE indicar que praticamente todas *E. coli* produtoras de ST, LT e antígenos de aderência serem também colicinogênicas, assim como BRANDIS & SMARDA (1971) e OZANNE (1977), correlacionarem a produção de colicina com enteropatogenicidade, neste trabalho foram encontradas 3 amostras LT e K88 não produtoras de colicinas, indicando ser esta uma característica não essencial. Entretanto, também foi detectado alta frequência de plasmídios Col conjugativos, inclusive cotransferindo os

genes para toxina STa (amostra 22), dados estes concordantes com os de HARNETT (1985), o que poderia explicar a alta incidência de amostras enteropatogênicas colicinogênicas. Ainda, a alta incidência destas amostras poderia ser explicada, pela ação da colicina, que parece conferir à bactéria, a capacidade de sobrevivência no trato digestivo de uma variedade de animais. Este fato ficou demonstrado no trabalho de SMITH, (1976), quando uma mistura de cepas Col V⁺ e Col V⁻ foi administrado a voluntários humanos; as amostras Col V⁺ apresentaram-se dominantes nas fezes.

A produção de hemolisinas tem sido encontrada em porcentagem relativamente alta nas cepas isoladas de suínos com diarreia (WITTIG, 1968). Esta característica foi detectada em 9 (36%) das amostras estudadas e verificou-se que duas delas (8 e 22) eram enterotoxigênicas mas não hemolíticas. Portanto, a hemólise não pode ser utilizada como prova definitiva de patogenicidade, já que em diferentes regiões ocorrem cepas enteropatogênicas não hemolíticas (WITTIG, 1968). SMITH & LINGGOOD, (1971) estudando o plasmídeo Hly em associação com plasmídios Ent e K88, não conseguiram também correlacionar o seu papel com a enteropatogenicidade.

SMITH & HALLS (1967) encontraram plasmídios Hly transmissíveis, e neste trabalho das 8 amostras analisadas, apenas uma conseguiu transferir o fator Hly.

O antígeno K88 não foi transferido das 3 amostras K88⁺, mas isto não exclui a possibilidade de transferência porque este plasmídeo poderia ser transferido em baixa fre-

quência e não ter sido detectado em função do pequeno número de amostras analisadas. A informação genética para o K88 pode estar em plasmídios conjugativos ou não conjugativos (GAATRA & GRAAF, 1982).

Outro plasmídeo importante encontrado em alta frequência nas amostras de *E. coli* enteropatogênicas foi o plasmídeo R, que além de conferir resistência múltipla aos antimicrobianos em altos níveis de concentração da droga (Tabela II) foi transferido por conjugação em 50% das amostras, resultados coincidentes aos achados de CHEN et alii, 1984. Esta transferência foi demonstrada "in vivo" por SMITH (1970), quando verificou que com a administração da mistura de Sm e oxytetraciclina aos suínos, ocorria a transferência da resistência à Tc da cepa doadora para a receptora resistente à Sm.

Alguns plasmídios R também carregam genes para produção de toxinas como o plasmídeo pCG86 que codifica resistência à Su, Sm e Tc e produção de LT ST (GYLES et alii, 1977) ou mobilizam outros plasmídios de virulência não conjugativos como foi verificado na amostra 8, onde o plasmídeo codificando resistência à Tc e Sm e produção de Colicina V mobilizou a transferência do plasmídeo STa.

Estes dados sugerem que o uso indiscriminado de antibióticos na suinocultura moderna como aditivos em ração animal, pode aumentar a distribuição de bactérias enterotoxigênicas resistentes às drogas.

Agradecimento:

Ao Dr. Pestana de Castro pela tipagem sorológica das amostras e detecção de enterotoxina LT.

ABSTRACT

The production of heat-stable (STa) and heat-labile (LT) enterotoxins, K88 and K99 colonization factors were studied in 25 E. coli strains isolated from diarrhoeal piglets. The production of hemolysin, colicin V, drug resistance characteristics of the same strains and the transference of Col V, STa, Hly and K88 plasmids were also analysed by conjugation. 9(36%) strains produced both hemolysin and colicin V, 4(16%) LT, 3(12%) ST and 3(12%) K88. 24 (96%) strains were resistant to antibiotic, with 21 (84%) of them showing multiple resistance. The antibiotic resistance markers and colicin, 12(50%) and 5(55%) strains were capable of transferring these characteristics. After studying 3 STa producing strains, it was seen that in one of them STa genes were located along with colicin V on a conjugative plasmid. In the other strains the STa plasmid was transferred simultaneously with the plasmid carrying colicin V and drug resistance gene against tetracycline and streptomycin. Genetic information coding the production of hemolysin and K88 were not in plasmid conjugative.

KEY-WORDS: *Escherichia coli*, virulence, plasmids, drugs resistance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, J. L. & COSTA, S.O. *Exercícios práticos de genética*. Editora Nacional e Edusp, São Paulo, Brasil, 1973.
- BEER, J. *Enfermedades Infecciosas de Los animales domésticos*. Fomo II, Editorial Acribia, 1981. p. 81-97.
- BRANDIS, H. & SMARDA, J. *Bacteriocine und bacteriocin ahnliche Substanzen*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1971.
- CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B.; GOMES, I.A.; GATTI, M.S.V. Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. of. Clin. Microb.*, 12: 714-17, 1980.
- CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B.; BRITO, J.R.F.; BARCELLOS, D. S.E.N.; COLLI, I.A.G. Virulence factors presente in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concordia Santa Catarina - Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 4(3):83 - 109-114, 1984.
- CHEN, C.; KUME, T.; TERAKADO, N.; ANDO, K. *Escherichia coli* originated from diarrhea of sucking piglets in Taiwan. IV Drug resistance. *Kitasato Archives of Experimental Medicine.*, 37(4):247-252, 1984.
- CHEN, C.; KUME, T.; NAKAZAWA, M.; TSUBAKI, S. *Escherichia coli* originated from diarrhea of suckling piglets in Taiwan. II Serological Properties. *Kitasato Archives of Experimental Medicina*, 57(3):211-220, 1984.
- DEAN, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G.; Harden, L.B.

- Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant nice application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125:407-411, 1972.
9. DJONNE, B.K. Colicin Production in Relation to Pathogenicity Factors in Strains of *Scherichia coli* isolated from the intestinal tract of piglets. *Acta. Vet. Scand.* 26(2): 145-152, 1985.
 10. ECKHARDT, T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1: 584-588, 1978.
 11. ELWELL, L.P. & SHIPLEY, P.L. Plasmid mediated factors associated with Virulence of bacteria to animals. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:465-496, 1980.
 12. GAASTRA, W.; & GRAAF, F.K. Host specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains *Microb. Reviews*. 46:129-161, 1982.
 13. GUINEE, P.A. & JANSEN, W.H. Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac, K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and hemagglutination. *Infect. Immun.* 23:700-705, 1979.
 14. GYLES, C.L.; PALCHANDHURI, S.; MAAS, W.K. Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. *Science*, 198:198-199, 1977.
 15. GYLES, C.L.; FALKOW, S.; ROLLINS, L. In vivo transfer of and *Escherichia coli* enterotoxin plasmid possessing genes for drug resistance. *Am. J. Vet. Res.*, 29(9): 1438-1441, 1978.
 16. HARNETT, N.M. & GYLES, G.L. Linkage of Genes for heat-stable enterotoxin, drug resistance, K99 antigen, and colicin in bovine and porcine strains of enterotoxigenic, *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* 46:428-433, 1985.
 17. HARRIS, D.L. & GLOCK, R.D. Swine dysentery. In: DUNNE, H.W. e LEMAN, A.D., Ed. *Disease of swine*. 4. ed. Ames, the Iowa University Press, 1975. p. 541-553.
 18. JONES, G.W. & RUTTER, J.M. The Association of K88 with haemagglutinating activity in porcine strains of *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.* 84:135-144, 1974.
 19. JOHLER, E.M. Pathogenesis of neonatal enteric coli-bacillosis of pigs. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 160:574-581, 1972.
 20. MOON, H.W.; NAGY B., ISAACSON, R.E.; ORSKOV, I. Occurrence of K99 antigen on *E. coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99 + enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.* 15:614-620, 1977.
 21. MORRIS, J.A.; SOJKA, W.J.; WELLS, G.A.H. K99 and 987 p adhesins on *E. coli* enteropathogenic for piglets. *The Vet. Record*, 21: 165-166, 1982.
 22. MORRIS, J.A.; THORNS, C.J.; Wells, G.A.H.; Scott, A.C.; SOJKA, W.J. The production to F 41 fimbriae by piglet strains of enterotoxigenic *E. coli* that lack K88, K99 and 987 p fimbriae. *J. of Gen. Microbiol.* 129: 2753-2759, 1983.
 23. ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SOJK, W.J.; LEACH, J.M. Simultaneous occurrence of *E. coli* and L antigens in strains from diseased swine. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 53: 404-422, 1961.
 24. ORSKOV, I. & ORSKOV, F. Episome-carried surface antigen K 88 of *E. coli* 1. Transmission of the determinate of the transfer of chromosomal markers. *J. Bacterial*, 91: 69-75, 1966.
 25. ORSKOV, F. & ORSKOV, I. Especial *Escherichia coli* serotypes From Enteropathies in Domestic Animals And Man. *ZBL. Vet. Med.* 29: 7-14, 1979.
 26. OZANNE, G.; MATHIEU, L.G.; BARIL, J.P. Production of colicin V in vitro and in vivo and observations on its effects in experimental animals. *Infect Immun*, 17(3): 497-503, 1977
 27. SMITH, H.W. & HALLS, S. The Transmissible nature of the genetic factor in *E. coli* that controls haemolysin production. *J. Gen. Microbiol.*, 47: 153-161, 1967.
 28. SMITH, H.W. & HALLS, S. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol.*, 52: 319-334, 1968.
 29. SMITH, H.W. The transfer of antibiotic resistance between strains of enterobacteria in chickens, calves and pigs. *J. of Med. Microb.*, 3: 165-180, 1970.
 30. SMITH, H.W.; LINGGOOD, M.A. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *E. coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med. Microbil.*, 4: 467-485, 1971.
 31. SMITH, H.W. & HUGGINS, M.B. Further observations on the association of the colicine V plasmid of *E. coli* with patogenicity and survival in the alimentary tract. *J. Gen. Microbiol.*, 92: 335-350, 1976.
 32. WILLINGER, H. *Escherichia coli*. In: Blobel, H. & Schiesser, T. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. 3. ed. Stuttgart, G. Fischer Verlag, 1981. p. 257-343.
 33. WITTIG, W. Aetiologia und Prophylaxie von Koli-Infektionen Ceim Schwein. *Mk. Vet. Med.*, 23: 326-331, 1968.