

Detecção de fatores de virulência de Escherichia coli através da PCR em tempo real

FABRÍCIO ALVES CERVEIRA¹
JOANA BITTENCOURT MATHIAS²
YARA SILVA CASANOVA³
BEATRIZ MACHADO TERRA LOPES⁴
FERNANDA KIELING MOREIRA⁵
JOSIANE FAGANELLO⁴
ANA PAULA WOBETO⁴
PRISCILLA KARINA VITOR KOERICH⁶
EDMUNDO KANAN MARQUES⁷
ANDRE SALVADOR KAZANTZI FONSECA⁴
VAGNER RICARDO LUNGE⁸
NILO IKUTA⁹

RESUMO

A Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é um patógeno diretamente relacionado ao desenvolvimento da colibacilose dos suínos. A diferenciação de cepas patogênicas de comensais é confirmada pela detecção de fatores de virulência (FVs) como fimbrias (F4, F5, F6, F18, F41) e toxinas (STb, STaP, STx2e, LT). Este trabalho descreve

¹ Aluna do Curso de Biologia/ULBRA - Bolsista PROICT/ULBRA

² Aluna do Curso de Biologia/ULBRA - Aluna voluntária PRO-ICT/ULBRA

³ Aluna do Curso de Biomedicina/ULBRA - Bolsista PROICT/ULBRA

⁴ SIMBIOS Biotecnologia

⁵ Bióloga - Laboratório sequenciamento da ULBRA

⁶ Perdigão Agroindustrial S/A - Videiro SC

⁷ Professor do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

⁸ Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA e PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

⁹ Professor-Orientador do Curso de Biologia e do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (ikuta@ulbra.br)

sobre a caracterização de 63 isolados de *E. coli* provenientes de granjas da região Sul do Brasil, pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). Somente 25 isolados (39,7%) apresentaram os genes de fímbrias e/ou toxinas pesquisados. No Paraná (PR) e Santa Catarina (SC) foram detectadas as fímbrias F18 e F4, e no Rio Grande do Sul (RS) F5, F6 e F41. Nos Estados do PR e SC as 4 toxinas investigadas foram detectadas, e no RS as toxinas STb, STx2e e StaP. Entre os isolados com FVs, o perfil (Stb, F-) foi o mais frequente e comum aos 3 Estados (24%), seguido por 12% de (STx2e, F-) presente no PR e RS, e 12% de (STaP, F-) em amostras de SC e PR. A PCR em tempo real demonstrou ser um método rápido e fácil para detectar os fatores de virulência em *Escherichia coli* e recomendado como teste confirmatório ao isolamento bacteriano para identificação de ETECs.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, ETEC, PCR tempo real, colibacilose, fatores de virulência.

ABSTRACT

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) is related with swine colibacillosis and differentiation from commensal strains could be confirmed by virulence factors detection as fimbriae (F4, F5, F6, F18, F41) and toxins (STb, STaP, STx2e, LT). This study describes about characterization of 63 E. coli isolates from Southern Brazil farms by real time PCR assay (qPCR). The investigated fimbriae and/or toxin genes were detected only in 25 isolates (39,7%). F18 and F4 fimbriae were detected in Paraná (PR) and Santa Catarina (SC) states and F5, F6 e F41 in Rio Grande do Sul. The 4 investigated toxins were detected in PR and SC states, and STb, STx2e e StaP toxins in RS. Among the isolates with FVs, the (Stb, F-) profile was the most prevalent (24%) and found in all studied states, followed by (STx2e, F-) (12%) in PR and RS and (STaP, F-) in SC and PR (12%). The real time PCR showed to be a fast and and easy method for E. coli virulence factors detection and recommended as confirmatory test for ETECs identification.

Key words: *Escherichia coli*, ETEC, real time PCR, colibacillosis, virulence factors

INTRODUÇÃO

A suinocultura industrial brasileira destaca-se como grande produtor internacional (KATAYAMA, 2007). A região Sul, forte polo das agroindústrias, é responsável por 61% da produção do país e considerada a mais tecnificada da América do Sul. (ABIPECS, 2008). Fatores ligados ao manejo, ambiente e nutrição são as grandes preocupações na produção, e entre as patologias mais importantes se destacam as doenças entéricas como a colibacilose (SMITH e LINGOOD, 1971; MOON, 1978;

ALEXANDER, 1994; BERBEROV et al., 2004; Zhang et al., 2006).

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria anaeróbia facultativa predominante na microbiota normal de animais homeotérmicos. Algumas cepas denominadas ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*) possuem fatores de virulência (fímbrias e toxinas) capazes de causar doenças entéricas como a colibacilose (NATARO e KAPER, 1998). As fímbrias F4, F5, F6, F18 e F41 permitem que as bactérias se liguem às vilosidades intestinais (WILSON

e FRANCIS, 1986; NAGY e FEKETE, 1999), e as toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (STa, STb) estimulam o enterócito a bombear líquido no lúmen, aumentando a motilidade intestinal (MOON et al., 1986; NAGY e FEKETE, 1999; CHOI et al., 2001), induzindo a diarreia (SALDARRIAGA et al., 2000).

Durante a produção de suínos, é frequente a separação dos animais nas fases pré-desmame (maternidade) e pós-desmame (creche, crescimento-terminação) o que auxilia a minimizar os riscos de infecções respiratórias, sistêmicas e entéricas (SMITH e LINGOOD, 1971; MOON, 1978; ALEXANDER, 1994; BERBEROV et al., 2004; ZHANG et al., 2006). Sabe-se que as porcas podem ser portadoras assintomáticas de cepas patogênicas de *E. coli* em seu intestino, o que propicia leitões na etapa pré-desmame se contaminarem através do contato com suas fezes e do meio ambiente.

O diagnóstico da colibacilose é baseado em sinais clínicos, no isolamento bacteriano a partir de amostras de fezes com diarreia e na atividade hemolítica da bactéria em ágar sangue (BARCELLOS et al., 1980; BRITO et al., 1999; KUHNERT et al., 2000; MACÊDO et al., 2007). Nestes casos, o isolamento da *E. coli* em altas concentrações é utilizado como um forte indicativo de que estes estejam relacionados com ETEC (LUDWIG e GOEBEL, 1997; BRITO et al., 1999; KUHNERT et al., 2000). Métodos de diagnóstico fenotípicos e moleculares têm sido utilizados como testes definitivos para diferenciar cepas de *E. coli* patogênicas das comensais, sendo que a detecção dos fatores de virulência é fundamental para que seja estabelecido o tratamento adequado da colibacilose.

Já são amplamente descritos na literatura artigos com a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de ETEC

(FRANKLIN et al., 1996; BOSWORTH e CASEY, 1997; KWON et al., 1999; OSEK, 2002; VIDAL et al., 2004; OLASZ et al., 2005; WEST et al., 2007; MACÊDO et al., 2007; OJENIYI et al., 1994; STACY-PHIPPS et al., 1995; BLANCO et al., 1997; OSEK et al. 1999). A PCR em tempo real (qPCR) tem sido amplamente utilizada no diagnóstico molecular de doenças infecciosas, que permite a redução do tempo para obter os resultados, possibilita um diagnóstico mais sensível, específico e redução significativa do risco de contaminação, pois não se faz necessária a manipulação do produto pós-PCR (MACKAY, 2004). Recentemente foi descrita a utilização da qPCR na detecção de ETEC (WEST et al., 2007), e o presente trabalho teve como objetivo através desta técnica caracterizar isolados de *E. coli*, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de Referência

As cepas enterotoxigênicas de referência *E. coli* 2568 (F18, STb, STaP e STx2e), 2569 (F4, STb e LT), 2570 (F6 e STaP) e 2571 (F5, F41 e STaP) foram gentilmente cedidas pela empresa Perdigão, e utilizadas neste trabalho como controles de amplificação das fímbrias e toxinas.

Isolados de Campo

Neste trabalho foram utilizados 63 isolados de *E. coli* obtidos de amostras clínicas de suínos coletadas em granjas comerciais localizadas nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina - região Sul do Brasil.

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de uma suspensão bacteriana, através da utilização do kit NewGene Prep® e posteriormente transferido para uma suspensão de sílica. O sedimento passou por diversas lavagens utilizando-se o kit NewGene PreAmp® (tiocianato de guanidina + Tris-HCl, etanol 80% e etanol 96%).

Amplificação de FV através de PCR Multiplex em Tempo Real

A detecção dos fatores de virulência F4, F5, F6, F18, LT, e STaP foi realizada através da PCR em tempo real com iniciadores e sondas descritos por West, et al. (2007) e Frydenthal et al. (2001). Iniciadores e sondas específicos para os genes F41, STx2e e STb foram desenhados neste trabalho utilizando-se o software Primer Express (ABI). O DNA das cepas de referência foi analisado simultaneamente com as amostras clínicas em cada set

de qPCR multiplex, sendo constituídos por três pares de iniciadores distintos e três sondas marcadas com 3 agentes fluorescentes distintos (FAM, VIC e ROX).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a aplicação do PCR multiplex em tempo real para caracterização de fatores de virulência (FV), presentes em isolados de *Escherichia coli*. Numa primeira etapa, foram realizadas as otimizações de 3 reações multiplex PCR: qPCR1 (F4, STx2e e STb), qPCR2 (F5, F18, LT) e qPCR3 (F6, F41 e STaP). A técnica se demonstrou eficiente, confirmando a presença das toxinas e fímbrias nas 4 cepas de referência. A Figura 1 apresenta um exemplo dos resultados obtidos com a amplificação do qPCR2, detectando respectivamente, os alvos das cepas de referência 2569 (alvo LT), 2571 (alvo F5) e 2568 (alvo F18).

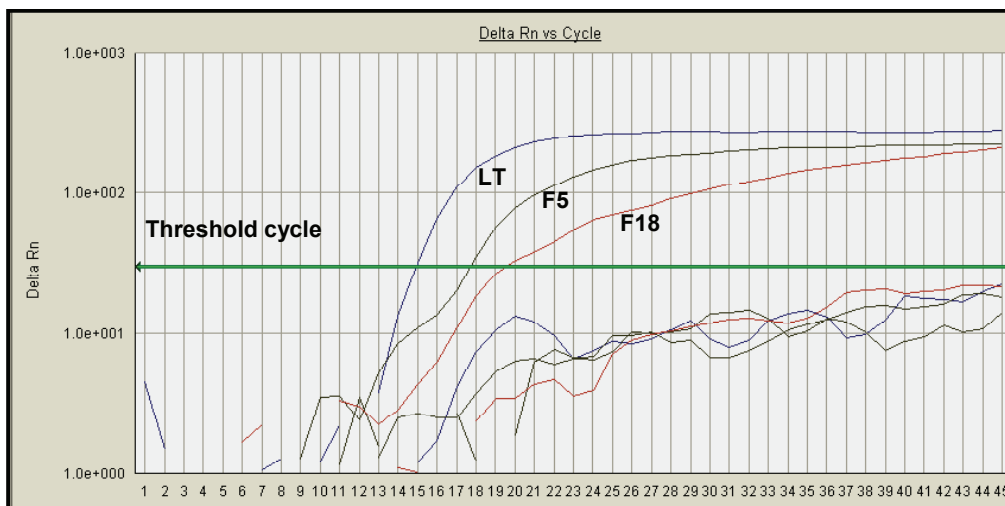


Figura 1 - Multiplex qPCR2 - gráfico de amplificação dos alvos LT, F5 e F18 detectados, respectivamente, nas cepas de referência 2569, 2571 e 2568.

Posteriormente, foram analisadas 63 *E. coli* isoladas de animais com diarreia provenientes dos 3 Estados da região Sul do Brasil. No nosso trabalho 39,7% (25/63) dos isolados apresentaram as fímbrias e/ou toxinas pesquisadas, o que corrobora os resultados prévios encontrados por nosso grupo (Moreira et al. 2007), com amostras clínicas da mesmas regiões do país. Macêdo et al. (2007) analisando amostras do Estado de Minas Gerais, encontraram uma frequência mais reduzida (29%), o que demonstra que a incidência pode variar dependendo da região analisada. Estes dados indicam que o diagnóstico da colibacilose baseado unicamente no isolamento de *E. coli* em animais com diarreia apresenta grande índice de resultados falsos positivos, já que a incidência de isolados sem FV é elevada. Frequentemente este tipo de diagnóstico é utilizada em nosso país (Baccaro et al., 1999; Baccaro et al., 2000; Calderaro et al., 2001) o que acarreta na utilização de antibióticos em situações desnecessárias.

Na análise dos 25 isolados com FV, foram detectadas todas as 5 fímbrias e 4 toxinas pesquisadas (Tabela 1), sendo que 40% das amostras positivas foram encontradas no PR, 32% no RS e 28% em SC. Foram caracterizados isolados com uma (36%) ou duas (16%) fímbrias, e bactérias com uma (48,3%), duas (16%) e três (4%) toxinas (Tabela 2).

Tabela 1 - Distribuição de fímbrias e toxinas detectadas pela qPCR em cepas de *E. coli* provenientes do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

ESTADO	FÍMBRIAS					TOXINAS			
	F4	F5	F6	F18	F41	LT	STb	STx2e	STaP
PR	2	0	0	3	0	1	5	2	3
RS	0	2	4	0	2	0	1	1	6
SC	1	0	0	3	0	1	2	3	5
TOTAL	3	2	4	6	2	2	8	6	14

A frequência das cepas patogênicas investigadas nos três Estados da Região Sul apresentou uma distribuição heterogênea em relação às fímbrias. No Paraná (PR) e Santa Catarina (SC) foram detectadas apenas F18 e F4, e no Rio Grande do Sul (RS) foram encontrados as fímbrias F5, F6 e F41. Nos Estados de SC e PR foram encontradas as 4 toxinas investigadas e no RS foram detectadas as toxinas STb, STx2e e STaP (Tabela 1).

Tabela 2 - Perfis dos fatores de virulência encontrados em *E. coli* isoladas de fezes com diarreia de suínos da região Sul do Brasil. (*ausência de fímbria/toxina)

FÍMBRIAS	TOXINAS							ESTADO
	STb	STx2e	STaP	STb, LT	STx2e, STaP	STb, LT, STaP	*T-	
F4				1				SC
F6			4					RS
F18			1		3			PR e SC
F4, F18						1	1	PR
F5, F41			2					RS
*F-	6	3	3					PR, SC e RS

Os perfis dos fatores de virulência apresentaram-se de forma diversificada (Tabela 2), e chamou-nos a atenção a grande incidência de isolados com toxinas e ausência das fímbrias pesquisadas (48%). Nos três Estados foram detectados bactérias com perfil (Stb, F-) representando 24% dos isolados com FV. No PR e RS 12% dos isolados com FV apresentaram o perfil (STx2e, F-), e no PR e SC 12% com o perfil (STaP, F-). Uma hipótese para a ausência de fímbrias seria a atuação de outras não investigadas neste estudo, como F17 descrita por West et al. (2007). Pode-se levantar como outra hipótese, a ocorrência de mutações nas regiões de anelamento nas fímbrias investigadas que impossibilitem a detecção pela multiplex PCR. Entretanto não devemos atribuir uma menor patogenicidade a estes isolados, pois a ocorrência de infecções concomitantes por outros agentes causadores de diarreia podem acentuar

a patogenicidade de isolados de ETEC (NAKAMINE et al., 1998). Outros perfis foram encontrados neste trabalho (Tabela 2), podendo-se destacar 16% dos isolados foram encontrados no RS com o perfil (STaP, F6) e 12% (STx2e, STaP, F18) em SC.

Estes achados demonstraram que através de uma análise retrospectiva de isolados de fezes de suínos com diarreia e sintomas de colibacilose, obtidos de granjas do Sul do Brasil, apenas uma parte dos isolados (39,7%) apresentaram os genes que codificam os fatores de virulência de ETEC investigados. A utilização da PCR em tempo real apresentou-se de forma eficiente como teste complementar para detecção de fímbrias e toxinas, sendo o diagnóstico da colibacilose baseado apenas no isolamento bacteriano pouco fidedigno e com alto índice de resultados falso-positivos para os principais fatores de virulência de ETEC descritos na literatura. Espera-se que com a utilização de métodos moleculares seja possível contribuir para o melhor manejo da colibacilose em nosso país.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA. **Relatório 2008**. São Paulo: ABIPECS. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/relatorios/ABIPECS_relatorio_2008_pt.pdf> Acesso em 18 março de 2009.
- ALEXANDER, T.J.L. Neonatal diarrhoea in pigs. In: GYLES, C.L. (Ed.). **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford, England: CAB International, 1994. p.151-170.
- BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; BRONZONI, P.V.M. Detecção de genes codificadores de enterotoxinas e verotoxinas através da PCR em amostras de *E. coli* isoladas de leitões lactentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: ABRAVES, 1999. [n.p.].
- BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P. Occurrence of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates piglets in Brazil. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne, 2000. p.52.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; GUIZZARDI, I.I.; FALLAVENA, L.C.B. Frequência e causa de diarreias bacterianas em suínos nas zonas criatórias do Vale do Taquari e Missões, Rio Grande do Sul, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, v.7, n.1, p.27-37, 1980.
- BERBEROV, E.M. et al. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *E. coli* that produces multiple enterotoxins. **Infection and Immunity**, v.72, p.3914-3924, 2004.
- BLANCO, M. et al. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K O:H serotypes: relationship with toxigenic phenotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2958-2963, 1997.
- BOSWORTH, B.T.; CASEY, T.A. Identification of toxin and pilus genes in porcine *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) with multiple primer pairs. **General Meeting of the American Society for Microbiology B**, v. 509, 1997. [n.p.].

- BRITO, B.G. et al. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.65, p.123-132, 1999.
- CALDERARO, F.F. et al. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.68, n.1, p.29-34, 2001.
- CHOI, C. et al. Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. **Veterinary Microbiology**, v.81, p.65-71, 2001.
- FRANKLIN, M.A. et al. A PCR-based method of detection and differentiation of K88+ adhesive *Escherichia coli*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.460-463, 1996.
- FRYDENDAHL, K.; IMBERECHTS, H.; LEHMANN, S. Automated 5' nuclease assay for detection of virulence factors in porcine *Escherichia coli*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p.151-160, 2001.
- KATAYAMA, A. Avicultura e suinocultura: perspectivas 2007. **Porkworld**, v. 36, p.70-72, 2007.
- KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.107-117, 2000.
- KWON, D.; KIM, O.; CHAE, C. Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.146-151, 1999.
- LUDWIG, A.; GOEBEL, W. Haemolysins of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli mechanisms of virulence**. Cambridge: Cambridge University, 1997. p.281-329.
- MACÊDO, N.R. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1117-1123, 2007.
- MACKAY, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.190-212, 2004.
- MOON, H.W. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.172, p.443-448, 1978.
- MOON, H.W.; SCHNEIDER, R.A.; MOSELEY, S.L. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.210-212, 1986.
- MOREIRA, F.K. et al. Caracterização de fatores de virulência presentes em isolados de *Escherichia coli* provenientes da região Sul do Brasil. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n.6, p. 63-74, 2007.
- NAGY, B.; FEKETE, P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v.30, p.259-284, 1999.
- NAKAMINE M. et al. Dual infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus, observed in weaning pigs that died suddenly. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.60, p.555-561, 1998.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142–201, 1998.

OJENIYI, B.; AHRENS, P.; MEYLING, A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assays, polymerase chain reaction and phenotypic assays. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.41, p.49–59, 1994.

OLASZ, F. et al. Characterization of an F18+ enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from post weaning diarrhoea of swine, and of its conjugative virulence plasmid pTC. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, p.281-289, 2005.

OSEK, J. Rapid and specific identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.304-310, 2002.

OSEK, J. et al. The use of polymerase chain reaction for determination of virulence factors of *Escherichia coli* strains from pigs in Poland. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.22, p.163-174, 1999.

SALDARRIAGA, F.T.; CALLE, S.E.; CAMACHO, C.S. Resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* provenientes de lechones lactantes criados em uma granja tecnificada de Lima. **Revista de Investigaciones Veterinárias del Perú, Lima**, v.11, n.2, p.195-200, 2000.

SMITH, H.W.; LINGOOD, M.A. Observations of the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v.4, p.467-685, 1971.

STACY-PHIPPS, S.; MECCA, J.J.; WEISS, J.B. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during the course of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.1054-1059, 1995.

VIDAL, R. et al. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.1787-1789, 2004.

ZHANG, W. et al. Significance of heat stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity study. **Infection and Immunity**, v.76, p.3107-3114, 2006.

WEST, D.M. et al. Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan PCR assays. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.323-331, 2007.

WILSON, R.A.; FRANCIS, D.H. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.213-217, 1986.