

REPRODUÇÃO EXPERIMENTAL DA COLIBACILOSE SUÍNA EM LEITÕES¹

ANTONIO F. PESTANA DE CASTRO², ITAMAR A. PIFFER³, MARLENE B. SERAFIM²,
DOMINGOS S. LEITE² e IZILDINHA A. G. COLLI²

ABSTRACT.- Castro A.F.P., Piffer I.A., Serafim M.B., Leite D.S. & Colli, I.A.G. 1990. [Experimental reproduction of colibacillosis in piglets.] Reprodução experimental da colibacilose em leitões. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 10(1/2):11-18. Depto Microbiol. Imunol. Unicamp, Campinas, SP 13081, and Embrapa-CNPISA, Cx.Postal D-3, Concórdia, SC 89000, Brazil.

Experimental neonatal colibacillosis, in newborn piglets was attempted using 4 groups of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains, as follows: 1) Two strains from serogroup O149:K91, both producing thermolabile enterotoxin (LT) and K88 colonization factor; 2) Two strains from serogroup O101:K30, producing thermostable enterotoxin (STa) and K99 colonization factor; 3) One strain from serogroup O157:K?, producing thermostable enterotoxin of the STb type and K88 antigen, and 4) One strain from serogroup O8:K?, producing STa enterotoxin and a new colonization factor, named F42. All fourteen piglets inoculated orally with these strains of ETEC developed clinical disease and died up to 42 hours after inoculation, being possible to visualize, by indirect fluorescent antibody technique, in all of them, that colonization of small intestine by the inoculated ETEC had occurred. The production of STa "in vivo", into the gut, by strains from group 2 and 4 was an important factor to prove that experimental colibacillosis did occur. In fact, coprocultures either from the diarrheic stools or from the gut contents revealed a high rate of LT⁺-K88⁺ and STa⁺-K99⁺ colonies recovery. Though some quantitative differences among the examined materials have been observed, the recovery of STa⁺-F42⁺ colonies was lower than in the former groups of ETEC strains. However clinical symptoms, production of STa "in vivo" and colonization of the gut of inoculated piglets proved that F42 antigen is undoubtedly a new colonization factor among ETEC involved in porcine colibacillosis.

INDEX TERMS: Porcine colibacillosis, experimental reproduction, virulence factors LT, STa, K88, K99 and F42.

SINOPSE.- Foi tentada a reprodução experimental da colibacilose suína neonatal, em leitões recém-nascidos, usando-se para tal 4 grupos de amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC), a saber: 1) Duas amostras do sorogrupo O149:K81, produtoras da enterotoxina termolábil (LT) e do fator de colonização K88; 2) Duas amostras do sorogrupo O101:K30, produtoras da enterotoxina termoestável (STa) e do fator de colonização K99; 3) Uma amostra do sorogrupo O157:K?, produtora da enterotoxina termoestável do tipo STb e do fator de colonização K88, e 4) Uma amostra do sorogrupo O8:K?, produtora da enterotoxina termoestável (STa) e de um novo fator de colonização, denominado F42. Todos os 14 leitões inoculados por via oral com estas amostras de ETEC desenvolveram doença clínica com morte até 42 horas após a inoculação, tendo sido possível detectar em todos eles a colonização do intestino delgado pelas amostras de ETEC inoculadas, através da técnica de imunofluorescência indireta. A produção de STa "in vivo", por amostras dos grupos 2 e 4 foi um fator importante na comprovação de que a reprodução experi-

mental da doença por estas amostras realmente ocorreu. De fato, a coprocultura, quer das fezes diarréicas, quer do conteúdo intestinal dos animais, revelou um alto índice de recuperação de colônias LT⁺-K88⁺ e STa⁺-K99⁺. Embora tenham ocorrido entre os diversos materiais examinados algumas diferenças quantitativas, a recuperação de colônias STa⁺-F42⁺ foi menor do que nos casos anteriores, porém os achados referentes a doença clínica, produção de STa "in vivo" e colonização do intestino delgado dos leitões inoculados, comprovaram que o antígeno F42 é, sem dúvida, um novo fator de colonização em amostras de ETEC envolvidas na colibacilose suína.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Colibacilose suína, reprodução experimental, fatores de virulência LT, STa, K88, K99 e F42.

INTRODUÇÃO

Na etiologia da colibacilose suína, em especial na diarréia neonatal, estão envolvidos vários sorogrupos de *Escherichia coli* (Ørskow et al. 1961, Söderlind & Möllby 1979, De Boy III et al. 1980, Gatti et al. 1985). Independentemente do sorogrupo a ser considerado, dois fatores de virulência são fundamentais: a produção de enteroto-

¹ Aceito para publicação em 1 de julho de 1988.

² Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, Campinas, SP 13081.

³ Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), Embrapa, Caixa Postal D-3, Concórdia, Santa Catarina 89700.

xinas e a presença nestas amostras dos chamados fatores de colonização, ou antígenos de aderência, também designados de adesinas (Guineé & Jansen 1979, Gaastra & De Graaf 1982). Entre as enterotoxinas temos a enterotoxina termolábil clássica ou LT-I (Gyles 1971, Clements & Finkelstein 1979) e a LT-II (Guth et al. 1986a, 1986b). Enquanto a primeira, muito semelhante a toxina colérica, está relacionada à patogenia da doença (Gyles 1974, Clements & Finkelstein 1978), o papel da LT-II, imunologicamente distinta da toxina colérica e recentemente descrita, carece de investigações adicionais (Guth et al. 1986b). No outro grupo de enterotoxinas, ditas termoestáveis, estão descritos dois sub-tipos: STa, detectável pelo teste do camundongo recém-nascido e STb, ativa biologicamente apenas no teste de alça ligada de leitão de 5-7 semanas (Gyles 1971, Moon et al. 1980, Castro et al. 1984). A enterotoxina STa está sem dúvida relacionada com a enfermidade ao passo que a STb, embora experimentalmente seja ativa em leitões, precisa ser melhor investigada quando a uma correlação com a colibacilose suína (Whipp et al. 1981).

Entre os fatores de colonização são mais conhecidos não só pela prevalência mas pela incontestável importância os antígenos K88 (F4), K99(F5) e 987P(F6) (Jones & Rutter 1972, Nagy et al. 1976, Nagy et al. 1977, Moon et al. 1977). Recentemente outros fatores de virulência tem sido descritos como ocorrendo em suínos, tais como o F41 (De Graaf & Roorda 1982), F165 (Fairbrother et al. 1986), um fator descrito por Aning et al. (1983) e finalmente o antígeno F42 relatado em nosso meio (Yano et al. 1986), em amostras produtoras da enterotoxina STa.

Em outros países, a reprodução experimental em leitões da forma diarréica da colibacilose neonatal, principalmente com amostras dos sorogrupos envolvidos na mesma, tem sido relatada com certa frequência. No Brasil, tanto quanto saibamos, experimentos desta natureza não tem sido levados a efeito e algumas poucas tentativas foram infrutíferas (Itamar Piffer, comunicação pessoal). Portanto, além da reprodução experimental da colibacilose neonatal suína, com amostras de *E. coli* enterotoxigênicas e portadoras dos fatores de colonização K88 e K99, já relatados como ocorrendo em nosso meio (Gatti et al. 1985), o presente trabalho teve como objetivo importante verificar se uma amostra de *E. coli*, produtora do antígeno F42 e da enterotoxina STa, seria capaz de causar doença diarréica semelhante em leitões recém-nascidos, experimentalmente inoculados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram selecionadas 6 amostras enterotoxigênicas de *E. coli*, cujas características quanto aos respectivos fatores de virulência e sorogrupos estão discriminados no Quadro 1. Como controle negativo dos experimentos biológicos e testes laboratoriais foi utilizada a amostra de *E. coli* K12 (711 nal). Durante toda a realização dos experimentos as amostras em questão foram mantidas a -70°C, em meio de BHI, contendo 15% de glicerol.

Animais

Foram utilizados leitões da raça Landrace, com 24 a 48 horas de idade, impedidos de mamar o colostro, porém mantidos com uma mistura de leite em pó (180 g), óleo de soja (20 ml); óleo de milho (20 ml); emulsão de óleo de fígado de bacalhau (2 ml) e água (1000 ml), administrada "ad libitum". O número de animais recém-nascidos inoculados com as amostras de *E. coli* estudadas se encontra também no Quadro 1.

Inóculo

Para todas as amostras estudadas utilizou-se como inóculo, para cada animal, 20 ml de cultivo em meio de "Trypticase Soy Broth" (TSB) (Difco Lab.), incubado a 37°C por 18 h, correspondendo, aproximadamente a 2×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por ml.

Todas as amostras de *E. coli* utilizadas foram previamente investigadas quanto às suas características toxigênicas e produção dos respectivos fatores de colonização, conforme mencionado no Quadro 1, através de técnicas descritas a seguir.

Preparação de enterotoxinas

Para a detecção de enterotoxinas, as amostras de *E. coli* foram cultivadas em meio de "Casamino Acids-Yeast Extract" (CA-YE) (Evans et al. 1973) distribuído em erlenmeyers de 125 ml, contendo 10 ml do meio acima. Os frascos foram incubados em uma estufa de agitação (New Brunswick, U.S.A.) (150 rpm), a 37°C, por 18 h. Em seguida, 1,0 ml de solução de polimixina, contendo aproximadamente 2,2 mg/ml foi adicionado cada frasco. Após agitação adicional por 15 min as culturas foram centrifugadas a 8000 x g por 30 min e os sobrenadantes obtidos (extratos) foram pesquisados quanto a produção das enterotoxinas LT, STa e STb, conforme descrito abaixo.

Pesquisa da enterotoxina LT

Foi feita através do teste de imunohemólise passiva (IHP), modificado. O procedimento para a realização desta prova foi semelhante ao descrito anteriormente (Serafim et al. 1979), exceto que tampão fosfato foi substituído por tampão veronal em solução fisiológica, com íons cálcio e magnésio (VBS) (Castro et al. 1980). Resumidamente, hemácias de carneiro (HC), mantidas a 4°C em solução de Alsever, foram lavadas três vezes com 8 volumes de solução salina tamponada (PBS), com fosfato 0,04 M, e, depois suspensas em VBS. As HC foram então padronizadas de modo tal que parte da suspensão quando lisada com água destilada na diluição de 1:20, dava uma liberação de hemoglobina correspondente a uma absorbância de 0,42 a 550 nm ou aproximadamente 2.10^9 HC/ml (Serafim et al. 1979). Para a reação de IHP propriamente dita, tubos 10 x 100, em duplicata, recebiam 50 µl de cada preparação de extrato e 100 µl da suspensão de HC padronizadas. Em seguida, 100 µl de antitoxina colérica, diluída 1:80, eram adicionados aos tubos que eram incubados a 37°C por 30 min., a fim de permitir a reação do anticorpo (antitoxina colérica) com os complexos HC-LT. Posteriormente, em cada tubo, foram adicionados 100 µl de complemento de cobaia (diluído 1:10 em VBS), procedendo-se nova incubação a 37°C por 60 min. A hemólise resultante, quando presente, foi então quantificada adicionando-se ao volume dos tubos reação 3,6 ml de VBS, sendo estes então centrifugados a 2000 x g por 5 min para sedimentar as HC não hemolisadas. A concentração de hemoglobina nos sobrenadantes era então lida espectrofotometricamente a 420 nm. Qualquer resultado com leitura de $A_{420} =$

0,17 ou mais era considerado como positivo para a produção de LT (Serafim et al. 1979).

Pesquisa da enterotoxina STa

Camundongos albinos, recém-nascidos (2-4 dias de idade), foram separados de suas mães imediatamente antes de serem usados, sendo então divididos em grupos de 4 animais. Os procedimentos para o ensaio da enterotoxina STa pelo teste do camundongo recém-nascido (CRN) foram semelhantes aqueles relatados anteriormente (Dean et al. 1973). Aliquotas de 0,1 ml de cada extrato, ao qual 0,1% de uma solução de azul de Evans (2%) tinha sido adicionado, foram inoculadas em cada camundongo por via intragástrica. Os camundongos eram então sacrificados por inalação com éter. Foi então calculada a relação do peso dos intestinos/peso das carcaças para cada lote de camundongos. Resultados cuja relação foi igual ou superior a 0,085 foram considerados como positivos para a produção de enterotoxina STa.

Pesquisa da enterotoxina STb

Foi feita através do teste de alça ligada (AL) de leitões de 6 semanas (Castro et al. 1984). Extratos preparados a partir da amostra V17 (STb⁺K88⁺) foram testados em dois animais que foram mantidos em jejum 24 h antes do teste, porém com água fornecida "ad libitum". A laparotomia dos leitões foi feita sob anestesia geral, por inalação com éter, preparando-se 5 alças ligadas no intestino delgado anterior, compreendendo o jejum distal. Duas alças foram inoculadas com 2ml de sobrenadante da cultura em teste, sendo as demais inoculadas com igual volume de controle negativos, representados pelo meio de CAYE, solução fisiológica estéril e extrato da amostra de *E.coli* K12 (711 nal). Dezesesseis horas após a inoculação os animais foram sacrificados, necropsiados e as alças examinadas para a presença de dilatação. Calculou-se em seguida, para cada alça, a relação do volume de líquido acumulado/comprimento da alça. Resultados iguais ou superiores a 0,7 foram considerados positivos (Castro et al. 1984).

Provas de microhemaglutinação manose-resistente (MHMR), para a detecção presuntiva dos fatores de colonização

Em relação ao antígeno K88 as amostras de *E.coli* foram cultivadas em ágar glicosado com fosfato (Jones & Rutter 1974). As culturas a serem examinadas quanto a possível presença do antígeno K99 foram semeadas em meio de Minca (Guinée et al. 1977) e aquelas a serem testadas para o antígeno F42 em meio mínimo sólido, com 0,5% de glicose (Yano et al. 1986). A prova de MHMR foi realizada conforme preconizado anteriormente (Jones & Rutter 1974), utilizando-se suspensões bacterianas devidamente padronizadas, que foram diluídas em razão de 2 diretamente em placas de microtítulo, usando-se como diluente PBS 0,01 M, pH 7,2, contendo 1% de D-manose. Após as diluições adicionou-se o mesmo volume (100 µl) de hemácias padronizadas (1%), empregando-se para a detecção dos antígenos K88, K99 e F42 respectivamente hemácias de cobaia, cavalo e galinha. A reação foi feita em banho de gelo e lida após 2 h. Consideraram-se como positivas as reações que dessem um título hemaglutinante igual ou superior a 1:4. Como todos os testes realizados foram apenas qualitativos não houve interesse em se averiguar a ocorrência de títulos superiores a 1:32.

Preparo dos antissoros anti-K88, anti-K99 e anti-F42

Os antígenos K88 e K99 purificados foram gentilmente cedidos por R.E. Isaacson (Pfizer Co., U.S.A.). O antígeno F42 foi

purificado conforme descrito previamente (Leite D.S. et al., manuscrito submetido a publicação). Resumidamente, a amostra 56717 (STa⁺-F42⁺) foi cultivada sob agitação, num fermentador de bancada com capacidade para 14 l (New Brunswick), contendo 3 l de meio mínimo líquido, adicionado de 0,5% de glicose (Yano et al. 1986). Após incubação sob agitação (15 psi) a 37°C por 18 h, a cultura foi centrifugada e o sedimento ressuspense em PBS 0,05M, contendo NaCL 1M. Esta suspensão foi aquecida a 60°C por 30 min, com agitação intermitente de acordo com o preconizado originalmente (Stirm et al. 1967). A preparação foi novamente centrifugada, nas mesmas condições, sendo o sobrenadante precipitado com 45% de saturação com sulfato de amônio. O precipitado foi ressuspense em PBS 0,05M, pH 7,4 e dialisado exaustivamente contra o mesmo tampão. Esta preparação bruta do antígeno F42 foi então tratada com 0,5% de desoxicolato de sódio (DOC), por 72 h a 4°C. O material solúvel em DOC foi dialisado no tampão acima e então submetido a cromatografia em gel de Sepharose 4B (coluna 2 x 95 cm) equilibrado com PBS 0,05M, pH 7,4, contendo uréia 2M. Resultados da dupla difusão em gel e da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) revelaram que a preparação purificada do antígeno F42 correspondia às frações 20-25 do material eluído em Sepharose 4B.

Para a preparação dos antissoros foram usados coelhos albinos adultos. Cada antígeno purificado, em alíquotas de 1,0 ml (100 µg/ml) foi emulsionado em igual volume de adjuvante completo de Freund (Difco Lab.). Com este inóculo cada coelho foi injetado subcutaneamente, utilizando-se 2 animais para cada antígeno. Uma dose de reforço idêntica foi dada 21 dias depois, sendo os animais sangrados a branco após 15 dias, se uma sangria de prova, realizada na véspera, fornecesse um título na reação homóloga de aglutinação em lâmina, igual ou superior a 1:20.

Reações de soroaglutinação em lâmina para a detecção dos antígenos K88, K99 e F42

Para tal foram utilizados cultivos feitos nos meios específicos para a produção dos fatores de colonização K88, K99 e F42, conforme descrito acima. As reações foram feitas em lâminas de microscópio, utilizando-se diluições apropriadas dos antissoros específicos, previamente determinadas com as culturas das amostras padrão (Quadro 1). A 0,02 ml de cada antissoro colocado sobre as lâminas emulsionou-se pequena quantidade das culturas a serem examinadas, observando-se a ocorrência ou não de aglutinação, em tempo não superior a 2 min.

Coleta de materiais dos leitões inoculados e exames realizados

Todos os animais, após a inoculação, foram observados diariamente quanto a presença de diarreia e sua respectiva evolução. Das fezes de cada animal foi feita o exame bacteriológico, utilizando-se técnicas convencionais (Edwards & Ewing 1972) de semeadura em meio de Mac Conkey e identificação bioquímica de 5 colônias lactones positivas de cada material, para exames posteriores.

Quando aplicável, de cada animal inoculado com amostras STa⁺, coletou-se ainda cerca de 5 ml de fezes diarréicas com a finalidade específica de se detectar a produção desta enterotoxina "in vivo". Para tal, sobrenadantes destes materiais foram examinados pelo teste do CRN, conforme descrito anteriormente.

Dos leitões mortos procedeu-se a necrópsia, registrando-se os achados macroscópicos principais a nível intestinal. Igualmente, quando possível, foi coletado conteúdo fecal, jejuno e fêeo, para exames bacteriológicos, isolando-se também 5 colônias lactose

positivas. Culturas das colônias isoladas das fezes e do conteúdo fecal dos animais necropsiados foram então examinados quanto a pesquisa dos fatores de virulência, através da metodologia descrita nos itens anteriores. Na detecção dos diferentes fatores de virulência levou-se sempre em conta a origem das amostras e suas características quanto a tais fatores, conforme mencionado no Quadro 1. Apenas, a detecção da produção da enterotoxina STb não pode ser realizada, em relação a estas culturas, pela indisponibilidade de se conseguir um número adequado de leitões.

Quadro 1. Amostras enterotoxigênicas de *Escherichia coli*, seus respectivos fatores de virulência e identificação dos leitões inoculados, Concórdia, SC, Brasil, 1986

Amostras de <i>E. coli</i>	Sorogruppo	Fatores de virulência			Leitões inoculados	
33	0149:K91	LT ⁺	STa ⁻	STb ⁻	K88 ⁺	33-1 33-2
15	0149:K91	LT ⁺	STa ⁻	STb ⁻	K88 ⁺	15-1 15-2
3728	0101:K30	LT ⁻	Sta ⁺	STb ⁻	K99 ⁺	3728-1 3728-2 3728-3
3730	0101:K30	LT ⁻	Sta ⁺	STb ⁻	K99 ⁺	3730-1 3730-2 3730-3
V17	0157:K?	LT ⁻	Sta ⁻	STb ⁺	K88 ⁺	V17-1 V17-2
56717	08:K?	LT ⁻	Sta ⁺	STb ^(?) (a)	F42	56717 (1-1) 56717 (1-2) 56717 (2-1) 56717 (2-2) 711-1
711 nal (<i>E. coli</i> K12)	-	-	Controle negativo			711-2

(a) Não foi realizado o teste de alça ligada em leitão de 6 semanas, para detecção de STb.

Finalmente, ainda por ocasião da necropsia, foram retirados fragmentos do jejuno para a preparação de cortes a serem examinados pela técnica de imunofluorescência indireta (Awad-Masalmeh et al. 1982) com algumas modificações.

Resumidamente, pequenos fragmentos do jejuno foram submetidos a cortes histológicos em criostato a -20°C, colocados sobre lâminas de microscopia e fixados com metanol. Diluições dos

antissoros anti-K88, anti-K99 e anti-F42 foram feitas em PBS 0,05M pH 7,2, dos quais 20 µl foram aplicados sobre os cortes e incubados por 60 minutos em câmara úmida à 37°C. Ao término deste, as lâminas eram lavadas exaustivamente com PBS, quando então 20 µl do soro de cabra anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína diluído em PBS contendo 0,002% de Azul de Evans eram aplicados sobre os cortes e novamente incubados à 37°C em câmara úmida por 1 hora. Após seguidas lavagens com PBS, os cortes eram cobertos com glicerina tamponada pH 8,6 e lamínulas, sendo então observados em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. Reações positivas foram fotografadas, utilizando-se filme branco e preto de alto contraste (400 ASA), com tempo de exposição variando de 1 a 2 minutos.

RESULTADOS

Os resultados dos quatro leitões inoculados com as amostras de *E. coli* 15 e 33, do sorogruppo 0149:K91, ambas produtoras dos fatores de virulência LT e K88, se encontram no Quadro 2.

Com exceção do leitão 15-2, os demais morreram 18 h após a inoculação, apresentando à necropsia, em todos os casos, diarreia, intestino congesto, gases no estômago bem como líquido sanguinolento na cavidade torácica. No animal 15-2, que morreu após 42 h, pôde-se observar um grau de desidratação mais pronunciado que nos demais (dados não apresentados).

Os resultados dos exames bacteriológicos realizados a fim de se detectar, no conteúdo intestinal (jejuno e íleo) e nas fezes dos leitões inoculados, a presença de colônias produtoras dos fatores de virulência LT e K88, originalmente presentes nas amostras usadas para o preparo do inóculo, também se encontram no Quadro 2. Pode-se observar que, no computo geral, com exceção de algumas poucas variações, como por exemplo, no número de colônias K88⁺ do leitão 15-2 ou na presença de colônias LT⁺ nas fezes diarreicas do leitão 33-2, houve uma boa

Quadro 2. Reprodução experimental da colibacilose em leitões recém-nascidos com amostras de *E. coli* do sorogruppo 0149:K91 (LT⁺, K88⁺), Concórdia, SC, Brasil, 1986

Leitão n ^o	Evolução (horas)		N ^o de colônias positivas para os fatores de virulência LT e K88/n ^o de colônias examinados										Imunofluorescência
			Jejuno		Íleo		Fezes diarreicas(g)		Totais (%)				
			LT ⁺ (e)	K88 ⁺ (f)	LT ⁺	K88 ⁺	LT ⁺	K88 ⁺	LT ⁺	K88 ⁺			
15-1	M ^(a)	-	-	-	5/5	4/5	5/5	3/5	5/5	3/5	15/15 ⁽¹⁰⁰⁾	10/15 ^(66,6)	
15-2	dd ^(b)	dd	M	-	5/5	3/5	5/5	2/5	5/5	3/5	15/15 ⁽¹⁰⁰⁾	8/15 ^(53,3)	+
33-1	M	-	-	-	5/5	4/5	4/5	4/5	3/5	3/5	12/15 ⁽⁸⁰⁾	14/15 ^(93,3)	+
33-2	M	-	-	-	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	4/5	12/15 ⁽⁸⁰⁾	14/15 ^(93,3)	+
711-1(c)	N ^(d)	N	N	N	NR ^(h)	NR	NR	NR	0/5	0/5	2/5 ⁽⁰⁾	0/5 ⁽⁰⁾	+
711-2(c)	N	N	N	N	NR	NR	NR	NR	0/5	0/5	2/5 ⁽⁰⁾	0/5 ⁽⁰⁾	NR

(a) Morte;

(b) Diarreia e desidratação;

(c) Controles negativos;

(d) Normal;

(e) Detectada pelo teste de imunohemólise passiva;

(f) Detectado pelo teste de microhemaglutinação manose-resistente com hemácias de cobaia e soroaglutinação em lâmina com soro anti-K88;

(g) Fezes coletadas quando do aparecimento do quadro diarreico (Suabe retal);

(h) Exame não realizado.

Quadro 3. Reprodução experimental da colibacilose em leitões recém-nascidos com amostras de *E. coli* do sorogrupo 0101:K30 (STa⁺, K99⁺), Concórdia, SC, Brasil, 1986

Leitão nº	Evolução (horas)				Nº de colônias positivas para os fatores de virulência Sta e K99/nº de colônias examinadas								Imunofluorescência
					Jejuno		Íleo		Fezes diarréicas(g)		Totais (%)		
	18	25	42	72	STa ⁺ (e)	K99 ⁺ (f)	STa ⁺	K99 ⁺	STa ⁺	K99 ⁺	STa ⁺	K99 ⁺	
3728-1	M(a)	-	-	-	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5*(i)	5/5	14/15(93,3)	15/15(100)	+
3728-2	dd(b)	dd	M	-	3/5	3/5	5/5	5/5	4/4*	4/4	12/15(80)	13/15(86,6)	+
3728-3	dd	M	-	-	5/5	3/5	4/5	5/5	NR	NR	9/10(90)	8/10(80)	+
3730-1	M	-	-	-	3/5	5/5	5/5	4/5	5/5*	5/5	13/15(86,6)	14/15(93,3)	+
3730-2	dd	dd	M	-	5/5	2/5	5/5	5/5	4/5*	5/5	14/15(93,3)	12/15(80)	+
3730-3	dd	dd	M	-	4/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	14/15(93,3)	14/15(93,3)	+
711-1(c)	N(d)	N	N	N	NR(h)	NR	NR	NR	0/5	0/5	0/5(0)	0/5(0)	NR
711-2(c)	N	N	N	N	NR	NR	NR	NR	0/5	0/5	0/5(0)	0/5(0)	NR

- (a) Morte;
- (b) Diarréia e desidratação;
- (c) Controles negativos;
- (d) Normal;
- (e) Detectada pelo teste do camundongo;
- (f) Detectado pelo teste de microhemaglutinação manose-resistente com hemácias de cobaia e soroaglutinação em lâmina com soro anti-K99;
- (g) Fezes coletadas quando do aparecimento do quadro diarréico (suabe retal);
- (h) Exame não realizado.
- (i) Animais positivos para a produção STa "in vivo".

porcentagens de recuperação variaram de 80% a 100% para LT e de 53,3% a 93,3% para K88. Estes dados sugerem que todos os leitões foram eficientemente colonizados pelas amostras 15 e 33, o que foi aliás demonstrado também pelo teste de imunofluorescência indireta realizada com o antissoro K88 (Quadro 2).

Os leitões 711-1 e 711-2, inoculados com a amostra de *E. coli* K12, 711 nal, incluídos como controles negativos em todos os experimentos, dentro do período de observação, não apresentaram sintomas dignos de nota, embora viessem posteriormente, depois de 42 h, evidenciar patologia respiratória e/ou sistêmica, não relacionada com os

experimentos da presente pesquisa. O exame das fezes destes animais, durante o período do experimento, não revelou amostras portadoras de quaisquer dos fatores de virulência estudados (Quadros 2, 3 e 4).

Os resultados dos experimentos feitos com 6 leitões inoculados com as amostras 3728 e 3730, do sorogrupo 0101:K30, ambas produtoras dos fatores de virulência STa e K99, se encontram na Tabela 3. Dois animais morreram 18 h após a inoculação, sendo que 3 outros vieram a falecer após 42 h. Nestes últimos se conseguiu observar um grau de desidratação pronunciado. Os achados necroscópicos foram semelhantes aos relatados para os ani-

Quadro 4. Reprodução experimental da colibacilose em leitões recém-nascidos com amostra de *E. coli* do sorogrupo 0157:K (STb⁺(a), K88⁺), Concórdia, SC, Brasil, 1986

Leitão no.	Evolução (horas)				Nº de colônias positivas para os fator de colonização K88/Nº de colonias examinadas				Totais (%)	Imunofluorescência
					Jejuno		Íleo			
	18	25	42	72	K88 ⁺ (f)	K88 ⁺	K88 ⁺	K88 ⁺		
V17-1	dd(b)	M(c)	-	-	2/5		2/5	2/5	6/15(40)	NR
V17-2	dd	M	-	-	0/5		0/5	0/5	3/15(13,3)	NR
711-1(d)	N(e)	N	N	N	NR(h)		NR	0/5	0/5(0)	NR
711-2	N	N	N	N	NR		NR	0/5	0/5(0)	NR

- (a) O teste de alça ligada para a detecção da enterotoxina STb não foi realizado com as coproculturas de jejuno, íleo e fezes diarréicas, pela falta de leitões disponíveis;
- (b) Diarréia e desidratação;
- (c) Morte;
- (d) Controles negativos;
- (e) Normal;
- (f) Detectado pelo teste de microhemaglutinação manose-resistente com hemácias de cobaia e soroaglutinação em lâmina com soro anti-K88;
- (g) Fezes coletadas quando do aparecimento do quadro diarréico (suabe retal);
- (h) Exame não realizado.

Quadro 5. Reprodução experimental da colibacilose em leitões recém-nascidos com amostras de *E. coli* do sorogrupo 08:K? (STa⁺, F42⁺), Concórdia, SC, Brasil, 1986

Leitão no.	Evolução (horas)				Nº de colônias positivas para os fatores de virulência STa e F42/nº de colônias examinados								Imunofluorescência
					Jejuno		Íleo		Fezes diarréicas (g)		Totais (%)		
					Sta ⁺ (e)	F42 ⁺ (f)	Sta ⁺	F42 ⁺	Sta ⁺	F42 ⁺	Sta ⁺	F42 ⁺	
567/71-1	dd ^(b)	dd	M ^a	—	3/5	3/5	4/5	4/5	2/5 ⁽ⁱ⁾	3/5	9/15 ⁽⁶⁰⁾	10/15 ^(66,6)	+
567/71-2	dd	dd	M	—	0/5	2/5	0/5	1/5	3/5*	3/5	3/15 ⁽²⁰⁾	8/15 ^(53,3)	+
567/71-1	dd	dd	M	—	3/5	3/5	5/5	5/5	3/5*	2/5	11/15 ^(73,3)	10/15 ^(66,6)	+
567/71-2	dd	dd	M	—	5/5	5/5	5/5	2/5	3/5*	2/5	13/15 ^(86,6)	9/15 ⁽⁶⁰⁾	+
711-1 ^(c)	N ^(d)	N	N	N	NR ^(h)	NR	NR	NR	0/5	0/5	0/5(0)	0/5(0)	NR
711-2	N	N	N	N	NR	NR	NR	NR	0/5	0/5	0/5(0)	0/5(0)	NR

(a) Morte;

(b) Diarréia e desidratação;

(c) Controles negativos;

(d) Normal;

(e) Detectada pelo teste do camundongo recém-nascido;

(f) Detectado pelo teste de microhemaglutinação *in nose*-resistente com hemácias de galinha e soroaglutinação em lâmina com soro anti-F42;

(g) Fezes coletadas quando do aparecimento do quadro diarréico (suabe retal);

(h) Exame não realizado;

(i) Animais positivos para a produção STa "in vivo".

mais inoculados com as amostras do sorogrupo 0149 (dados não apresentados). Os resultados dos exames bacteriológicos, para detectar colônias produtoras dos fatores de virulência STa e K99, se encontram no Quadro 3. Verifica-se que os resultados deste lote de experimentos foram bastante semelhantes ao anterior, inclusive no que concerne ao leitão 3730-2 que no exame do material de jejuno apresentou baixa recuperação de colônias K99⁺. Na média dos totais, entretanto, a recuperação de colônias STa⁺, nos 6 animais, variou de 80% a 93,3%, enquanto para o fator de colonização K99 esta variação se situou entre 80% a 100%. A colonização do intestino delgado dos animais experimentalmente inoculados com estas amostras, sugerida por estes achados, foi confirmada pelos resultados de imunofluorescência indireta, realizado com o antissoro K99 (Quadro 3). Nesta Tabela, pode-se verificar ainda que a produção de STa, "in vivo" foi detectada em 5 sobrenadantes de fezes, com exceção do material obtido do leitão 3728-3, que se apresentou impróprio para exame.

Os resultados dos experimentos com os leitões 17-1 e 17-2, inoculados com as amostras de *E. coli* V17, produtora de STb e K88, não foram muito elucidativos. Ambos animais morreram 25 h após a inoculação, mas na impossibilidade de se realizar o teste de STb, pela falta de leitões, utilizou-se como marcador da recuperação da amostra inoculada, a detecção de colônias K88⁺, nas culturas de fezes destes animais. Com relação ao leitão 17-1, das 15 colônias isoladas da coprocultura e do conteúdo do jejuno e íleo, apenas 6 (40%) apresentaram o antígeno K88. Em relação ao leitão 17-2 das 15 colônias de *E. coli* examinadas foram negativas as isoladas do conteúdo fecal, jejuno e íleo, fornecendo apenas 2 (13,3%) K88⁺, exatamente das fezes diarréicas. Infelizmente, os materiais para imunofluorescência, que poderiam ajudar esclarecer estes achados, se extraviaram durante a remessa de

Concórdia para Campinas. Os dados referentes à amostra V-17 se acham apresentados no Quadro 4.

Os resultados da inoculação experimental em 4 leitões com a amostra 567/7, produtora dos fatores de virulência STa e F42 se encontram no Quadro 5.

Todos os leitões morreram 42 h após a inoculação, tendo antes apresentado quadro pronunciado de desidratação e diarréia. Mais uma vez, os achados de necropsia não diferiram dos observados para os demais grupos, ressaltando-se apenas o encontro, em todos os leitões, de estômago bastante cheio de leite coagulado e gás (dados não apresentados).

Os exames bacteriológicos realizados para se detectar, no conteúdo intestinal dos animais mortos e nas fezes diarréicas, a ocorrência nos cultivos de colônias produtoras dos fatores de virulência STa e F42 também podem ser vistos no Quadro 5. Neste caso, em particular foi observada uma variação maior na recuperação de colônias STa⁺ e F42⁺, tanto de animal para animal, como, por vezes, em relação a diferentes materiais coletados do mesmo leitão. A recuperação de colônias STa⁺, a partir das fezes de leitões inoculados, variou de 20% a 86,6%. Em relação ao antígeno F42 a variação situou-se entre 53,3% e 66,6%. Apesar destas cifras serem menos elevadas do que as encontradas para os dois sorogrupos citados acima, não houve dúvida que ocorreu a colonização do intestino delgado dos 4 leitões, uma vez que, o exame dos cortes histológicos, estudados pela técnica de imunofluorescência indireta, usando antissoro F42, foi positiva para os 4 animais. Por outro lado, a semelhança do que ocorreu com as amostras do sorogrupo 0101 foi possível se detectar a produção da enterotoxina STa "in vivo" nos leitões inoculados (Quadro 5).

DISCUSSÃO

A reprodução experimental da colibacilose suína neona-

tal, em sua forma diarreica, tem sido realizada por diversos pesquisadores de outros países (Morgan et al. 1978, Nagy et al. 1978, Chidlow et al. 1979, Söderlind et al. 1982) utilizando para tal amostras de ETEC portadoras de fatores de colonização mais frequentes e já relatados há algum tempo, como por exemplo, K88 e K99. Quando de casos de diarreia em leitões, amostras de *E. coli*, produtoras de novos antígenos de aderência ou adesinas são descritas, tomando-se como base, para a caracterização destas adesinas, apenas provas indiretas tais como, hemaglutinação manose-resistente, adesão em células de linhagem contínua e a enterócitos (Moon et al. 1980, Gaastra & de Graaf 1982, Fairbrother et al. 1986), se torna necessário averiguar através da reprodução experimental da colibacilose em leitões, o verdadeiro papel desempenhado por estes novos antígenos de aderência, na etiologia e evolução desta enfermidade.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi a reprodução experimental da colibacilose em leitões, por amostras de ETEC portadoras do antígeno de aderência F42 (Yano et al. 1986), comparando-se estes resultados com aqueles obtidos, em experimentos semelhantes, com outras amostras de ETEC, portadoras dos fatores de colonização K88 e K99.

Os resultados obtidos com a amostra de ETEC STa⁺ - F42⁺ e com as amostras de ETEC LT⁺ - K88⁺ e STa⁺ - K99⁺ foram bastante semelhantes. Mesmo no caso das amostras K88⁺, apesar de estar descrito na literatura que a existência de receptores para este antígeno no intestino delgado de leitões é controlado geneticamente, podendo existir animais que não os produzam (Sellwood 1982), os quatro leitões utilizados demonstraram possuir tais receptores, uma vez que foram efetivamente colonizados pelas amostras de colibacilos K88⁺. Algumas diferenças mais evidentes foram observadas com o leitão 15-2, cujo exame bacteriológico das fezes apresentou uma recuperação média de colônias K88⁺ de 53% (Quadro 2). Poder-se-ia sugerir que este animal teria ausência de receptores e que a cifra acima seria apenas ocasional, conseqüente a eliminação das bactérias inoculadas pelo peristaltismo intestinal. Todavia, o quadro clínico observado, os resultados dos testes de imunofluorescência e a produção de STa "in vivo" eliminam esta possibilidade, comprovando que o leitão em questão foi realmente infectado.

Os resultados obtidos com os quatro leitões inoculados com a amostra de *E. coli* 567/7, produtora de STa e do fator de colonização F42, foram extremamente interessantes. A evolução clínica da doença experimental pareceu ser menos aguda do que para as amostras dos sorogrupos 0149 e 0101, levando porém todos os animais a morte, com sinais de desidratação mais evidentes, provavelmente neste caso pela duração ligeiramente mais prolongada da enfermidade. A colonização do intestino delgado dos leitões, evidenciada através da imunofluorescência indireta, bem como também a detecção da produção de STa "in vivo", como no caso das amostras K99⁺, comprovam que a infecção experimental pela amostra

567/7 teve êxito e que o antígeno F42 é de fato um novo fator de colonização para amostras de *E. coli* de origem suína, produtoras da enterotoxina STa.

Em dados não publicados (Leite et al., comunicação pessoal) relatam para alguns municípios do Estado de São Paulo uma prevalência de 12% do antígeno F42, o que torna este fator de colonização tão importante quanto ao K99 e 987P (Nagy et al. 1977, Moon et al. 1980).

A porcentagem de recuperação de colônias STa⁺ - F42⁺ na coprocultura dos leitões infectados foi menor do que em relação às amostras STa⁺ - K99⁺, observando-se em relação ao antígeno F42 frequências que variaram de 53,3% a 66%. Este aspecto demonstra que, pelo menos em relação a este antígeno, deva ocorrer uma maior segregação "in vivo", o que aliás aconteceu também com a enterotoxina STa, cuja recuperação variou entre 20% e 86,6%. Ainda que não tenha ocorrido uma correspondência absoluta entre a perda de F42 e STa, estes achados estariam de acordo com o relato sobre a codificação de STa e F42 por um mesmo plasmídeo de 21.1 Mdal (Silveira et al. 1987).

Entre as amostras de *E. coli* estudadas apenas em relação a V-17, produtora da enterotoxina STb e do fator de colonização K88, apesar da ocorrência de diarreia e morte dos animais inoculados, os achados não foram muito conclusivos, pela impossibilidade de se testar, em relação às colônias isoladas das fezes destes animais, a produção da enterotoxina Stb. Por outro lado, a pesquisa do antígeno K88, que poderia ser um parâmetro útil, mostrou uma cifra de recuperação bastante baixa (Quadro 4), que poderia muito bem ser resultado da eliminação da bactéria nas fezes, pelo peristaltismo intestinal. Como os materiais enviados para os testes de imunofluorescência se extraviaram durante a remessa, não seria confiável, basear-se apenas nos achados clínicos, para comprovar a infecção experimental por este colibacilo.

De modo geral, apesar destas diferenças quantitativas entre os leitões inoculados com as várias amostras de ETEC estudadas e produtoras de diferentes fatores de colonização, podemos concluir que, na presente pesquisa, o modelo usado para reprodução experimental da colibacilose suína foi altamente eficiente, possibilitando, em diversos aspectos, uma comparação da evolução da doença produzida por grupos de ETEC já comprovadamente envolvidos na mesma, com aquela causada por uma amostra de ETEC, produtora de um novo fator de colonização denominado F42 (Yano et al. 1986), recentemente descrito no Brasil.

Agradecimentos. - A presente pesquisa foi financiada com recursos do Centro Nacional de Pesquisas de Suínos e Aves (CNPISA-Embrapa) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

REFERÊNCIAS

- Aning K.G. Thomlinson J.K. Wray C. & Sojka W.Y. 1983. Adhesion factor distinct from K88, K99, F41 CFA/I and CFA/II in porcine *Escherichia coli*. Vet. Rec. 112:251.
- Awad-Masalmeh M., Moon H.W., Runnels P.L. & Schneider R.A. 1982. Pilus production, hemagglutination and adhesion by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 35:305-313.

- Dean A.G., Ching Y.C., Williams R.G. & Harden L.B. 1973. Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125:407-411.
- De-Boy III J.M., Wachsmuth J.K. & Davis B.R. 1980. Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in the United States. *Infect. Immun.* 29:361-368.
- De-Graaf F.K. & Roorda I. 1982. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect. Immun.* 36:751-753.
- Castro A.F.P., Serafim M.B., Gomes J.A. & Gatti M.S.V. 1980. Improvements in the passive immune haemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 12:714-717.
- Castro A.F.P., Serafim M.B., Brito J.R.F., Barcellos D.E.S.N. & Colli I.A.G. 1984. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concordia, Santa Catarina, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 3:109-114.
- Chidlow J.W., Blades J.A. & Porter P. 1979. Sow vaccination by combined oral and intramuscular antigen: a field study of maternal protection against neonatal *Escherichia coli* enteritis. *Vet. Rec.* 105:437-440.
- Clements J.D. & Finkelstein R.A. 1979. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.* 24:760-769.
- Clements J.D. & Finkelstein R.A. 1978. Immunological crossreactivity between heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and sub-units of *Vibrio cholerae* enterotoxins. *Infect. Immun.* 21:1036-1039.
- Edwards P.R. & Ewing W.H. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, U.S.A.
- Evans D.J. Jr., Evans D.G. & Gorbach S.L. 1973. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* 8:725-730.
- Fairbrother J.M., LaRivière S. & Lallier R. 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup 0115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infect. Immun.* 51:10-15.
- Gaastra W. & De Graaf F.K. 1982. Host-specific fimbrial adhesive of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46:129-161.
- Gatti M.S.V., Serafim M.B. & Castro A.F.P. 1985. Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas para suínos isoladas no Brasil. *Revta Microbiol.*, S. Paulo, 16:21-30.
- Guinée P.A.M., Veldkamp J. & Jansen W.H. 1977. Improved Minca Medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 15:676-678.
- Guinée P.A.M. & Jansen W.H. 1979. Detection of enterotoxigenic and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin: a comparative study. *Zb. Bakt. Hyg., I Abt. Orig.*, 243:245-257.
- Guth B.E.C., Twiddy E.M., Trabulsi L.R. & Holmes R.K. 1986a. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 54:529-536.
- Guth B.E.C., Pickett C.L., Twiddy E.M., Holmes R.K., Gomes T. A.T., Lima A.A.M., Guerrant R.L., Franco B.D.G.M. & Trabulsi L.R. 1986b. Production of type II heat-labile enterotoxin by *Escherichia coli* isolated from foods and human feces. *Infect. Immun.* 59:587-589.
- Gyles C.L. 1974. Relationship among heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* 129:277-283.
- Gyles C.L. 1971. Discussion: heat-labile and heat-stable forms of enterotoxin from *Escherichia coli* strains enteropathogenic for pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 176:314-322.
- Jones G.W. & Rutter J.M. 1972. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immun.* 6:918-927.
- Jones G.W. & Rutter J.M. 1974. The association of K88 antigen with hemagglutinating activity of porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 84:135-144.
- Moon H.W., Nagy B., Isaacson R.E. & Ørskov I. 1977. Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99 enterotoxigenic *Escherichia coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.* 15:614-620.
- Moon H.W., Kohler E.M., Schneider R.A. & Whipp S.C. 1980. Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types and enteropathogenicity among K88 negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.* 27:222-230.
- Morgan R.L., Isaacson R.E., Moon H.W., Brinton C.C. & To C.C. 1978. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pilus protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infect. Immun.* 22:771-777.
- Nagy B., Moon H.W. & Isaacson R.E. 1976. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal adhesion by enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. *Infect. Immun.* 13:1214-1220.
- Nagy B., Moon H.W. & Isaacson R.E. 1977. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*: selection of piliated forms "in vivo", adhesion of piliated forms to epithelial cells "in vitro" and incidence of pilus antigen among porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 16:344-352.
- Nagy B., Moon H.W., Isaacson R.E., To C.C. & Brinton C.C. 1978. Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.* 21:269-274.
- Ørskov I., Ørskov F., Sojka W.J. & Leach J.M. 1961. Simultaneous occurrence of *E. coli* B and L antigens in strains from diseased swine. *Acta Microbiol. Scand., Sect. B.*, 53:404-422.
- Sellwood R. 1982. *Escherichia coli*-associated porcine neonatal diarrhea: antibacterial activities of colostrum from genetically susceptible and resistant sows. *Infect. Immun.* 35:396-401.
- Silveira W.D., Yano T., Azevedo J.L. & Castro A.F.P. 1987. Plasmid-mediated production of a new colonization factor (F42) in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Revta Brasil. Genet.* 10:635-646.
- Serafim M.B., Castro A.F.P., Reis M.H.L. & Trabulsi L.R. 1979. Passive immune haemolysis for the detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 24:606-610.
- Söderlind O., Olsson E., Smith C.J. & Möllby R. 1982. Effect of parenteral vaccination of dams on intestinal *Escherichia coli* in piglets with diarrhea. *Infect. Immun.* 36:900-906.
- Stirm S., Ørskov F., Ørskov I. & Manisa B. 1967. Episomecarried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. II. Isolation and chemical analysis. *J. Bacteriol.* 93:731-739.
- Yano T., Leite D.S., Camargo I.J.B. & Castro A.F.P. 1986. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Microbiol. Immunol.* 30:495-508.