



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**PERFIL PARASITOLÓGICO E DETECÇÃO DE GENES DE
ENTEROTOXINAS E ADESINAS DE *Escherichia coli*, ISOLADAS DE
FEZES DE BEZERROS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

DIEGO MAUÉS COSTA RIBEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
JULHO/2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**PERFIL PARASITOLÓGICO E DETECÇÃO DE GENES DE
ENTEROTOXINAS E ADESINAS DE *Escherichia coli*, ISOLADAS DE
FEZES DE BEZERROS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

DIEGO MAUÉS COSTA RIBEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 144/2017

BRASÍLIA/DF
JULHO/2017

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

RIBEIRO, D.M.C. **Perfil parasitológico e detecção de genes de enterotoxinas e adesinas de Escherichia coli, isoladas de fezes de bezerros no Distrito Federal, Brasil** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 48p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos. Foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rp RIBEIRO , DIEGO MAUÉS COSTA
PERFIL PARASITOLÓGICO E DETECÇÃO DE GENES DE
ENTEROTOXINAS E ADESINAS DE Escherichia coli, ISOLADAS DE
FEZES DE BEZERROS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL / DIEGO MAUÉS
COSTA RIBEIRO ; orientador SIMONE PERECMANIS. -- Brasília,
2017.
48 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Saúde Animal) --
Universidade de Brasília, 2017.

1. Diarreia . 2. Bezerros. 3. Parasitologico. 4.
Distrito Federal. I. PERECMANIS, SIMONE, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**PERFIL PARASITOLÓGICO E DETECÇÃO DE GENES DE
ENTEROTOXINAS E ADESINAS DE *Escherichia coli*, ISOLADAS DE
FEZES DE BEZERROS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

DIEGO MAUÉS COSTA RIBEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE
ANIMAL

APROVADO POR

SIMONE PERECMANIS, Profa. Dra. (UnB)
(ORIENTADORA)

ANGELA PATRÍCIA SANTANA, Prof. Dra. (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

LIGIA MARIA CANTARINO DA COSTA, Prof. Dra. (UnB)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 06 DE JULHO DE 2017

A virtude está no meio termo

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe e meus irmãos, por me apoiarem, me incentivarem, pela paciência compreensão e por estarem sempre ao meu lado.

À minha orientadora, Simone Perecmanis, por todo esse tempo ter me acolhido, pelo respeito, pelos ensinamentos, principalmente pela paciência, muita paciência, oportunidade, e todo apoio e amizade.

Às professoras Ângela Patrícia e Ligia Maria por terem aceitado participar da minha banca e pelos ensinamentos, contribuições para este trabalho.

Ao Bruno Dallago pelo apoio, suporte técnico-científico, pela paciência, tempo e enorme ajuda contribuindo para este trabalho.

Aos professores Gino Chaves e Fabrício Souza Campos pelas orientações e apoio.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília: Cléia Nunes, Maurício Macedo, pelo apoio, ajuda e conversas.

Ao pessoal da Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural em especial ao núcleo Gama e a grande amiga Luciana Lana por ter me ajudado nas coletas das amostras, pelos conselhos, dicas e demais pessoas: Rosemar, Rodrigo, Elio e Harur.

Aos residentes do laboratório de Micro Med Vet: João, Alice, Yara, Dalila (prima Dalis) e Gustavo, pelo apoio e suporte que me deram.

À Marcela Scalon, por ter me ajudado muito a fazer PCR no laboratório de biologia molecular; pelos momentos de paciência quando tudo parecia dar errado.

Agradeço à Universidade de Brasília pelo apoio técnico e científico e a CAPES pelo suporte financeiro.

Por fim dedico a meu pai João (*in memoriam*) grandioso homem que dedicou amor e ensinamentos por mim.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I.....	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. Bovinocultura.....	16
2.2. Trato gastrointestinal como habitat de parasitos e microrganismos	16
2.3. Classificação de tipos de fezes.....	16
2.4. Diarreia	17
2.5. Agentes patogênicos identificados em fezes de bezerros	18
2.5.1. Protozoários	18
2.5.2. Helmintos.....	20
2.5.3. <i>Escherichia coli</i>	20
2.5.4. <i>Salmonella</i> spp.	22
2.5.5. Agentes virais.....	22
3. Objetivos.....	23
3.1. Objetivos gerais.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
CAPÍTULO II	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO III	41
RESUMO.....	41

ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

		Página
Tabela 1	Oligonucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplicons	27
Tabela 2	Temperaturas e tempos utilizados na PCR	28
Tabela 3	Testes bioquímicos realizados em 83 amostras	29
Gráfico 1	Total de ovos e cistos visualizados em 83 amostras fecais	30
Gráfico 2	Total de ovos e cistos visualizados em fezes normais e diarreicas	30

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Patotipos de <i>Escherichia coli</i> patogênicas e seus mecanismos de patofisiologia	3
Figura 2	Os locais de coleta	25
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação do gene intimina	31
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação do gene intimina	32

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

A/E	Lesão de fixação e esfacelamento
AAF	Fímbria de aderência agregativa
aEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogenica atípica
<i>afa</i>	Adesina
<i>agg</i>	gene presente no pAA
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARP2/3	Complexo de proteínas relacionadas ao filamento de actina
BCoV	Coronavírus Bovino
BFP	<i>Bundle forming pilus</i>
<i>cad</i>	gene de virulência
Cdc42	proteína de sinalização
CDTIII	toxinas distensoras citoletais tipo 3
CFA	Antígenos de fator de colonização
CFTR	Canal de Cloreto
<i>cnf</i>	Fator de necrose celular
<i>daa</i>	Genes codificadores de adesinas
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DAF	<i>Decay acceleration factor</i>
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirionucleico
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	gene para Intimina
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	<i>EPEC adherence factor</i>
EAST-1	Toxina termoestável 1 de <i>E.coli</i> enteroagregativa
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
EMB	ágar Eosina azul de metileno
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESPs	Proteínas secretadas por <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
GKIIc	proteína kinase II GMPC
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
GTPase	Enzima que converte GTP a GDP
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
<i>hly</i>	Alfa hemolisina
HUS	Síndrome hemolítica urêmica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
Ipa	Proteínas de invasão
K99	Gene de adesina

Kb	kilo base
LA	Aderência localizada
<i>LEE</i>	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
Lpf	Fímbria polar longa
LPS	Lipopolissacarídeo
LT-I	Toxina termolábil-I
LT-II	Toxina termolábil-II
ml	Mililitros
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NSP	Proteína não estrutural
NTEC	<i>Escherichia coli</i> necrotoxigênica
N-WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
O/F	Oxidação fermentação
OPG	Ovos por Grama
ORFs	<i>Open reading frames</i>
pAA	plasmídeo de virulência
PAIs	Ilhas de patogenicidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>pet</i>	Plasmid encoded toxin
pH	potencial hidrogenionico
<i>pic</i>	Gene que codifica proteína envolvida na colonização intestinal
pINV	Plasmidio de invasão
pmol	pico mol
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Ras	Enzimas monomérica envolvida na sinalização de estímulo de divisão Enzimas monomérica envolvida na sinalização de rearranjo do citoesqueleto
Rho	
ShET	Enterotoxina Shigella
STa	Toxina termoestável a
STb	Toxina termoestável b
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga
<i>stx1</i>	Shiga toxina 1
<i>stx2</i>	Shiga toxina 2
T3SS	Sistema de secreção tipo III
TEB	Tris Borato EDTA
tEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica
TIR	Receptor de intimina translocado
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSI	Triplo açúcar ferro
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
VASP	Proteína integrante do complexo ARP2/3
Vir	gene que codifica o complexo ARP2/3
VM	Vermelho de metila
VP	Voges Proskauer
PV	Proteína viral
μ l	Microlitros

RESUMO

A diarreia, considerada uma síndrome multifatorial, é uma das principais causas de morte em bezerros. Tem como maiores agentes causadores a bactéria Gram negativa *Escherichia coli*, os parasitas *Giardia intestinalis* e *Eimeria* spp., importantes enteropatógenos que causam perdas econômicas em diferentes setores do agronegócio dentre eles na bovinocultura.

Comumente cepas de *Escherichia coli* são divididas em patotipos baseados na presença de genes que, se expressos, contribuem para a codificação de proteínas que auxiliam na aderência e patogenicidade da bactéria. *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteropatógena (EPEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* produtora de toxina shiga (STEC) e *E.coli* necrotóxigênica (NTEC) são os principais patotipos que causam diarreia em bezerros.

Além desses, outros patotipos estão associados à diarreia nos humanos principalmente em crianças e em pessoas imunodeprimidas como *E.coli* enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* difusamente aderente (DAEC) e *E.coli* enteroagregativa (EAEC). Essas cepas possuem genes que são reconhecidos como fatores de virulência, pois são codificadores de proteínas que garantem a aderência e toxigenicidade bacteriana, aderindo na mucosa e alterando o fluxo de sinalizações dos enterócitos. Foram coletadas 83 amostras de fezes de bezerros, de ambos os sexos, no Distrito Federal de novembro e março de 2015 e de 2016, época das águas. As amostras foram submetidas ao exame parasitológico (no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias) cultivadas em ágar sangue (no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária) realizado testes bioquímicos, extração do DNA e pesquisa dos genes LT-I, *stx*₁, K99 e *eae* responsáveis por conferir patogenicidade a cepas de *E.coli*. Foram visualizados, cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Eimeria* spp., ovos de estrogilídeos e ovos de estrogiloides em 18 (21,7%), 30 (36,1%), 28 (33,7%) em apenas 8 (9,6%) respectivamente. Quanto aos genes, foram amplificados em cepas isoladas de *E.coli* 16 (19,3%) para *eae*, 6 (7,2%) para o gene de shiga toxina (*stx*₁) e 5 (6,0%) para ambos os genes *eae* e *stx*₁.

Palavras chaves: Diarreia, Bezerros, *Escherichia coli*, *Giardia* spp., estrogilídeo, estrogiloide, Distrito Federal

ABSTRACT

Diarrhea, considered a multifactorial syndrome, is one of the main causes of death in calves and has the Gram negative bacteria *Escherichia coli*, parasites: *Giardia intestinalis* and *Eimeria* spp., important enteropathogens that cause economic losses in different agribusiness sectors, among them dairy and beef cattle.

Commonly strains of *Escherichia coli* are divided into pathotypes based on their presence of genes that are expressed and contribute to proteins coding that aid in the adherence and pathogenicity of the bacteria. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), producing shiga toxin *E. coli* (STEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC).

In addition, other pathotypes are associated with diarrhea in humans especially in children immunocompromised, they are enteroinvasive *E. coli* (EIEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC). These diarrheogenic strains have genes that encode virulence factors that guarantee adherence and toxigenicity to the bacteria by attaching to the mucosa and altering the flow of enterocyte information. 83 calves faeces of both sexes were collected in the Distrito Federal during November 2015 to March 2016 during the water seasons. These samples were submitted to parasitological examination at the Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, cultivated in blood agar in the Laboratory of Veterinary Medical Microbiology, biochemical characterization, DNA extraction and genes research responsible for conferring pathogenicity to strains of pathogenic *E. coli* already found in other papers. Cysts of *Giardia* spp., *Eimeria* spp. oocysts, strongyloid eggs and strongyloid eggs in 18 (21.7%), 30 (36.1%), 28 (33.7%) in only 8 (9.6%), respectively. As for the genes, they were amplified in strains isolated from *E. coli* 16 (19.3%) to *eae*, 6 (7.2%) to the shiga toxin gene (*stx₁*) and 5 (6.0%) to both Genes *eae* and *stx₁*.

Keywords: Diarrhea, calves, *Escherichia coli*, Strongylids, Strongyloids, Federal District

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A diarreia é uma doença multifatorial e uma das principais causas de morte em bezerros. Em função do baixo desempenho produtivo além dos custos com medicações e manejo dos animais doentes a doença apresenta impacto econômico para bovinocultura de corte e de leite (Blanchard, 2012). Sabe-se que diversos fatores podem contribuir para o aumento do risco da doença nos animais jovens como falhas no manejo, características do ambiente e infecção por micro-organismos parasitários, virais e bacterianos (Millemann, 2009).

Dentre os fatores infecciosos, podemos encontrar os protozoários *Giardia duodenalis* (Xiao e Herd, 1994; O'handley e Olson, 2006; Silva, 2007; Santin *et al.*, 2012), *Eimeria* spp. (Almeida *et al.*, 2011; Bangoura *et al.*, 2012; Bruhn *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017) *Cryptosporidium* spp. (Santín *et al.*, 2004; Šlapeta, 2006; Lopes e Araújo-Junior, 2013; Do Couto *et al.*, 2014). Os helmintos Estrongiloides e Estrongilídeos (Batista, 2016). As bactérias *E. coli* (Wells *et al.*, 1991; Dean-Nystrom *et al.*, 1998; Valat *et al.*, 2014; Coura, Fernanda Morcatti *et al.*, 2015) e *Salmonella* spp. (Tsolis *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003; El-Seedy *et al.*, 2016) e os vírus Rotavírus e Coronavírus (Asano; Jerez *et al.*, 2002).

No DF foram realizados poucos levantamentos sobre estes agentes infecciosos isolados de fezes de bezerros (Ueno, 2005; Faria, 2013). Por serem de grande risco para a saúde humana, muitos trabalhos no Brasil são de agentes infecciosos isolados a partir da água de esgoto e hortaliças (Hachich *et al.*, 2004; Santos, 2007; Nascimento, 2011; Queiroz e Santana, 2016). Alguns autores realizaram a pesquisa destes agentes diretamente de fezes de bezerros (Bianchin e Honer, 1987; Leomil *et al.*, 2003; Coêlho *et al.*, 2017).

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento parasitológico, isolamento de *Escherichia coli* através de exames e cultivos de fezes coletados de bezerros no Distrito Federal bem como a detecção de genes de enterotoxinas e adesinas pela técnica molecular da reação em cadeia da polimerase.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Bovinocultura

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo com 215,2 milhões de cabeças, sendo o segundo maior produtor de carne bovina com a produção per capita de 35 Kg/hab/ano perdendo apenas para os Estados Unidos. A Região Centro Oeste é responsável por 34,1% do rebanho nacional com aproximadamente 73,4 milhões de cabeças e neste contexto, o Distrito Federal possui 96.576 cabeças, contribuindo com 0,13% apenas (EMATER, 2016).

A maioria dos problemas sanitários dentro da bovinocultura ocorre na fase de cria, no qual, a diarreia tem sido apontada como a mais importante enfermidade de bovinos jovens com perdas econômicas ao redor de 20% a 52%, com custos totais em relação a doenças entéricas equivalentes a US\$ 33,46 bezerro/ano (Cho et al., 2013).

2.2. Trato gastrointestinal como habitat de parasitos e microrganismos

O trato gastrointestinal tem a quebra de sua esterilidade após o nascimento do animal, e é colonizado por microrganismos de diferentes gêneros em algumas horas (QUINN et al, 2005).

A colonização e também a infecção, via oral, por microrganismos vai ocorrer durante toda a vida dos animais, com o contato destes com alimento e fômites contaminados. De forma similar vai ocorrer a infestação por parasitos no trato gastrointestinal (QUINN et al, 2005, ALMEIDA et al, 2008, SILVA et al, 2008, COSTA, 2007).

As infecções bacterianas e protozoárias bem como as infestações por parasitos podem produzir alterações visíveis nas fezes dos ruminantes, devido a ações diretamente exercidas sobre a mucosa intestinal, como a hipersecreção, atrofia de vilosidades, alteração infiltrativa e proliferativa da mucosa e necrose (QUINN et al, 2005)

2.3. Classificação de tipos de fezes

As fezes e como elas se apresentam (forma e consistência) podem dizer um pouco sobre a ocorrência de alterações no trato gastrointestinal e suas implicações na saúde e desempenho dos animais. As fezes podem ser avaliadas e pontuadas com base em sua consistência, cor, presença de sangue ou muco, o que podem indicar desequilíbrios na dieta e suas fontes alimentares ou sinalizar potenciais problemas sanitários (FERREIRA et al., 2015). Alguns autores utilizam escores para caracterização das fezes de bovinos (WALKER et al., 1998; STOKES et al., 2000).

Dentre as possíveis classificações encontramos segundo Walker et al., 1998:

- a) Fezes consideradas normais ou bem formadas (firmes);
- b) Fezes anormais tendendo a pastosas, mais ainda não diarreicas;
- c) Fezes pastosas caracterizando diarreia moderada;
- d) Fezes aquosas caracterizando diarreia intensa.

2.4. Diarreia

A diarreia ocorre devido ao aumento da peristalse e segmentação geral, causados por inflamação e desequilíbrio na absorção e secreção da mucosa intestinal, segue-se um aumento do fluxo de fezes com quantidade excessiva de água resultando em uma diminuição do tempo de permanência dos alimentos no trato gastrointestinal. Por causa da deficiência na absorção de líquido, as fezes geralmente são pastosas e mais moles que o normal. A frequência da defecação é geralmente aumentada (Blood e Henderson, 1979; Foster e Smith, 2009).

A diarreia pode ser classificada de acordo com o local de origem (intestino delgado, intestino grosso), quanto ao agente etiológico e quanto ao mecanismo. Quanto ao mecanismo fisiopatológico podem ser classificadas em três tipos (Ettinger e Feldman, 2009).

A diarreia osmótica ocorre devido à quantidade excessiva de líquido no lúmen intestinal, que não é absorvido, causando aumento da pressão osmótica no lúmen intestinal. No caso da diarreia esudativa, ocorre aumento dos produtos inflamatórios levando a uma redução na absorção de líquidos e eletrólitos devido à necrose da mucosa intestinal, que gera um acúmulo de líquido no lúmen intestinal. Por fim o desequilíbrio entre absorção e secreção sem alteração da mucosa é classificada em diarreia secretora (Cunha, 2010).

A diarreia pode provocar desidratação progressiva, acidose metabólica e devido à atrofia das micro vilosidades a capacidade da absorção intestinal fica alterada, sendo uma das principais causas de morte em bezerros (Oliveira Filho, 2006).

Diversos fatores favorecem a predisposição de diarreia em bezerros. Muitos são relacionados à alta contaminação ambiental, pela presença de outras espécies animais; a baixa higienização de bebedouros e comedouros; a alta concentração de fezes no bezerreiro.

Fatores relacionados ao aumento do estresse - transporte, privação de água ou alimento, período de desmama, ingestão inadequada de colostro, corte e cura inadequada do umbigo e alta densidade populacional - são falhas no manejo que favorecem as condições para a proliferação de micro-organismos patogênicos.

A severidade clínica da diarreia depende dos tipos de micro-organismos, das condições do hospedeiro e do ambiente em que se encontra.

2.5. Agentes patogênicos identificados em fezes de bezerros

2.5.1. Protozoários

Foram observados pela primeira vez por Antony van Leeuwenhok, em 1681, em suas próprias fezes tendo estes protozoários diversas denominações durante muito tempo. Em 1915 Stiles denominou *Giardia lamblia* em homenagem ao Dr. Vilem Lambl, de Praga que descreveu com detalhes a presença destes protozoários no intestino de humanos. Atualmente este protozoário é denominado de *Giardia duodenalis* embora a classificação ainda esteja em transformação conforme o hospedeiro em que foi encontrada (Adam, 2001). De forma semelhante, *Eimeria* foi primeiramente descrita por Leeuwenhoek em bile de coelho 1674, sendo o gênero proposto por Schneider em 1875 (Hammond & Long, 1973).

De acordo com a recente revisão de classificação dos organismos eucarióticos, *Giardia* spp. pertence ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida, Subordem Diplomonadina Família Hexamitidae, Gênero *Giardia* (Fava, 2013).

Giardia duodenalis é um protozoário intestinal flagelado intracelular de distribuição mundial presente em diversas espécies capaz de causar sinais clínicos relacionados à diarreia exsudativa e distúrbios intestinais (Xiao e Herd, 1994; Thompson, 2000; Cunha, 2010; Demeu *et al.*, 2011). Embora a giardíase seja uma doença subestimada e subdiagnosticada (Cacciò e Sprong, 2010), o micro-organismo possui grande importância epidemiológica e clínica por sua alta morbidade sendo escassos os trabalhos sobre *Giardia* spp. em bovinos no Brasil.

A *Giardia duodenalis* é encontrada em bezerros saudáveis e, com menos frequência, em bovinos adultos, o que causa certa incerteza sobre o seu papel de agente causador de diarreia em bezerros (Trout *et al.*, 2004; (Blanchard, 2012; Fava, 2013). Podem estar presentes em infecções subclínicas como também podem causar diarreia exsudativa devido à atrofia das vilosidades com diminuição da digestão de nutrientes; inflamação linfocítica, associados a outros agentes infecciosos, marcada pela alta morbidade e baixa mortalidade.

A transmissão de um hospedeiro para outro é por ingestão de cistos excretados nas fezes de bezerros infectados importante para a dispersão e sobrevivência dos parasitas. A transmissão pode ser direta de um hospedeiro para outros ou indireta por alimentos, águas contaminadas pelas fezes, ou também transmitidas possivelmente, por insetos vetores mecânicos (Olson *et al.*, 2004; O'handley e Olson, 2006; Blanchard, 2012).

Os coccídios são representados pelo gênero *Eimeria* spp., cujas espécies são parasitas gastrintestinais em ampla variedade de vertebrados. Uma vez ingeridos, multiplicam-se nas células epiteliais do intestino delgado e grosso.

A eimeriose ou coccidiose bovina é conhecida como diarreia de sangue ou curso vermelho, causada por protozoários do gênero *Eimeria bovis* e *Eimeria zuernii*. Pertencem à família Eimeriidae, subordem Eimeriorina, ordem Eucoccidiorida, subclasse Coccidiasina, classe Conoidasida, filo Apicomplexa e Reino protista.

Os sinais clínicos podem aparecer com o rompimento mecânico das células da mucosa pelos estágios sexuados dependendo do número de oocistos ingeridos, da espécie de *Eimeria*, da idade do bovino e do sistema de criação. A forma da coccidiose em bezerros pode ser clínica ou subclínica, depende da imunidade do animal. A diarreia nos bezerros geralmente é exudativa com intensa inflamação do intestino delgado e grosso; fezes aquosa e fétida, podendo ter a presença de sangue, chegando a ser sanguinolenta. Pode ocorrer prostração, perda de peso, anemia e febre em bezerros (Berne *et al.*, 1989; Bowman e De Georgis, 2010; Polizel, 2013; Hillesheim e Da Costa Freitas, 2016).

Embora descrito pela primeira vez na mucosa gástrica de camundongos por Tyzzer (1907), *Cryptosporidium* spp. foi primeiramente reconhecido como potencial agente de diarreia em bezerros na Turquia em 1955. Foi posteriormente identificado em outras espécies de animais em que se acha que a infecção era oportunista e inofensiva. Contudo o primeiro reconhecimento da gravidade do *Cryptosporidium parvum* em bezerros foi no final da década de 1970 como causa principal de surtos e casos esporádicos de diarreia. *C. parvum* surgiu, com a AIDS, nos humanos, no início da década de 80 como uma doença potencialmente fatal nesta subpopulação (Tzipori e Griffiths, 1998; Martins-Vieira *et al.*, 2009).

Cryptosporidium spp. pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Cryptosporidiidae. As principais espécies que causam diarreia em bezerros são - *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis* e *Cryptosporidium andersoni* (Xiao e Herd, 1994; Tzipori e Griffiths, 1998; O'handley e Olson, 2006).

Os sinais de criptosporidiose são semelhantes em bezerros são diarreia exudativa, presença de fezes amareladas pálidas com muco, letargia, anorexia e desidratação (Martins-Vieira *et al.*, 2009; Bowman e De Georgis, 2010).

Como diagnóstico da Criptosporidiose os oocistos são visualizados no exame fecal através de métodos de flutuação em solução concentrada de sacarose. Os oocistos também podem ser visualizados utilizando-se técnicas de coloração sobre esfregaços fecais (azul de metileno, Giemsa, iodo, Ziehl-Neelsen) (Xiao e Herd, 1994; Tzipori e Griffiths, 1998; O'handley e Olson, 2006).

2.5.2. Helmintos

A primeira descrição dos nematóides do gênero *Strongyloides* spp. remonta a 1856 por Wedl e Busk (1856) para parasitar o trato gastrointestinal de vários animais vertebrados incluindo seres humanos (Dorris *et al.*, 2002; Streit, 2008).

As infecções por *Strongyloides* spp. e *Strongylidios* spp. são moderadas e assintomáticas na maioria das espécies animais. A infecção nos animais ocorre geralmente em neonatos devido ao sistema imunológico ainda não totalmente desenvolvido e que são postos em situações de estresse. Tipicamente habitam o abomaso e intestino delgado apresentando diarreia quando a infecção é muito maciça. A infecção se caracteriza por fezes pastosas e diarreia persistente, desidratação, emagrecimento progressivo, pelo hirsuto e pode levar a morte, pois esta associada a quadros de desnutrição com deficiências nutricionais (Schuch, 1998; Viney e Lok, 2007; Bowman e De Georgis, 2010).

Existem quatro superfamílias de *Strongylidios* spp. – Trichostrongyloidea, Strongyloidea, Ancylostomatoidea e Metastrongyloidea (Bowman e De Georgis, 2010).

O gênero *Strongyloides* é o único entre os parasitas de nematodes de vertebrados de animais domésticos que possui gerações parasitárias de vida livre facultativa e parasitária obrigatória. A principal via de transmissão das espécies de *Strongyloides* spp. e *Strongylidios* spp. é a transmamária. Estes helmintos parasitam o intestino delgado e as fêmeas adultas depositam ovos de capsula delgada que contem embriões. Os ovos se rompem no intestino ou no pasto eliminando larvas de vida livre que são infectantes. As larvas infectantes penetram a mucosa do hospedeiro (Bowman e De Georgis, 2010).

2.5.3. *Escherichia coli*

A *E.coli* foi descrita pela primeira vez pelo pediatra alemão Theodore Escherich, em 1885, como *Bacterium coli commune*, bastonetes isolados das fezes de crianças saudáveis pelo cólon. Em 1919, após uma revisão de nomenclatura, a *Bacterium coli commune* passou a ser chamada de *Escherichia coli*. Em 1943, estudos de Kauffman et al; estabeleceram esquemas antigênicos para *E. coli*, o que possibilitou a classificação sorológica desse grupo (Koneman *et al.*, 2008).

Em 1945, uma epidemia de diarreia infantil em Londres foi relacionada a sorogrupos de *E.coli* por Bray. Em 1949, Taylor et al; descreveram outras cepas epidêmicas de *E.coli* futuramente identificadas pelo sorogrupo O111. Ao longo do tempo outros bastonetes foram relacionados à diarreia e a outras enfermidades em animais e nos seres humanos. Várias espécies compõe o gênero *Escherichia* como: *Escherichia blatte*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* e *Escherichia coli*, esta última é a mais importante para os

animais, a mais pesquisada como modelo de estudo para a evolução de procariontes (Moreira, 2007).

A bactéria *Escherichia coli* é um importante patógeno, em muitas espécies, e pode causar infecções intestinais e sistêmicas em bezerros (Salvadori *et al.*, 2003). O gênero *Escherichia*, membro da família *Enterobacteriaceae*, é composto de várias espécies patogênicas e não patogênicas (Drummond, 2011). Em animais imunocomprometidos, cepas de *E.coli* não patogênicas podem causar infecção (Nataro e Kaper, 1998).

Cepas patogênicas de *E.coli* são classificadas em grupos ou patotipos nos quais podem ser diarreio gênicos ou uropatogênicos dependendo dos genes que podem ser encontrados em ilhas de patogenicidade, plasmídeos ou bacteriófagos (Salvadori *et al.*, 2003; Gyles e Fairbrother, 2010; Coura, F. M. *et al.*, 2015). Cinco patotipos estão associados à diarreia em bezerros e seus mecanismos de aderência estão ilustrados na figura 1. *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* produtora de toxina shiga (STEC) e *E.coli* necrotoxigênica (NTEC) são os principais patotipos que causam diarreia em bezerros (Coura, F. M. *et al.*, 2015).

Estes fatores de virulência são codificados por genes em ilhas de patogenicidade ou em plasmídeos que podem ser transferidos entre cepas de *E.coli* (Coura, F. M. *et al.*, 2015). Muitas cepas de *E.coli* patogênicas e um perfil parasitológico já foram identificados em fezes de bezerros em outros estados brasileiros, porém no Distrito Federal ainda não foram feitos estudos sobre a identificação de genes de virulência em bezerros e um isolamento de protozoários de fezes de bezerros (Rigobelo *et al.*, 2006; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007; Etcheverria e Padola, 2013; Coura *et al.*, 2014b)

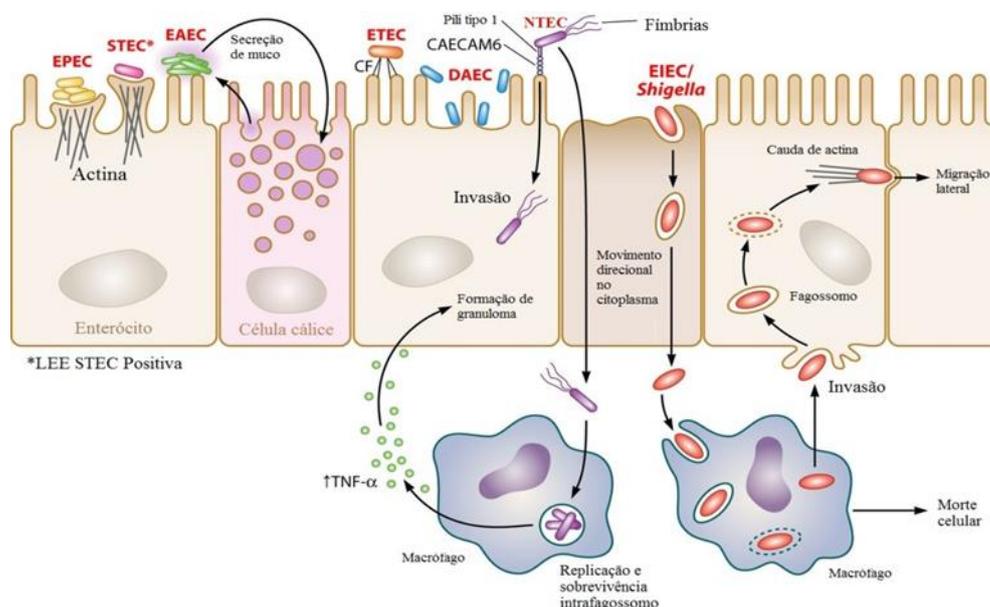


Figura 1: (Patotipos de *Escherichia coli* patogênicas e seus mecanismos de patofisiologia. Fonte: Adaptado de Croxen et al., 2013)

2.5.4. *Salmonella* spp.

A *Salmonella* entérica sorotipo Typhimurium (*Salmonella Typhimurium*) e sorotipo Dublin (*Salmonella Dublin*) são os sorotipos mais comuns isolados de fezes de animais adultos e jovens, causam septicemia, diarreia com fezes aquosas a mucoides amarelas a hemorrágicas, com fibrina, necrose intestinal, artrite séptica, meningite, gangrena das extremidades e morte súbita (Coura, F. M. et al., 2015). Surtos de salmonelose ocorrem com alta morbidade e mortalidade em animais jovens dependendo do manejo e idade destes animais sendo a via oral-fecal o principal meio de transmissão (Blanchard, 2012).

Salmonella Dublin, é um sorotipo, mais adaptado aos bezerros e causa diarreia em animais de cinco dias a adultos com septicemia e enterite. Outros sorogrupos não tão adaptados aos bezerros podem infectar outros animais, dependendo do grau de infecção, bezerros podem eliminar *Salmonella* spp. ao longo do tempo sem mostrar sinais clínicos (Blanchard, 2012; El-Seedy et al., 2016).

A salmonelose entérica pode causar intensa inflamação e enterite fibrino hemorrágica ocasionando em uma diarreia inflamatória e exudativa com fezes sanguinolentas. Na necropsia é observado edema e homorrágia de linfonodos mesentéricos, esplenomegalia, hepatomegalia, presença de petéquias hemorrágicas no peritônio e inflamação da porção distal do íleo e do colón (Cunha, 2010).

2.5.5. Agentes virais

Os Rotavírus são os principais agentes de diarreia nas primeiras semanas de vida dos bezerros infectados, com período de incubação de um a quatro dias, a infecção ocorre após o contato com o vírus no ambiente, que pode conter uma grande quantidade de partículas virais, as partículas virais são eliminadas nas fezes de animais infectados e contaminam o ambiente, aonde o vírus se mantém estável (Jerez et al., 2002).

O rotavírus é o patógeno entérico mais comum ou o segundo mais encontrado nas fezes diarreicas de bezerros neonatos, enquanto que o coronavírus é o terceiro patógeno mais comumente relatado. Ambos acometem a capacidade de absorção das vilosidades o que leva a uma incompleta indigestão de dissacarídeos e aumento na pressão osmótica no lúmen intestinal, causando diarreia osmótica em bezerros (Schuch, 1998; Foster e Smith, 2009; Blanchard, 2012; Coura, Fernanda Morcatti et al., 2015).

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento parasitológico, isolar *E.coli* e realizar a detecção de genes de enterotoxinas e adesinas através de técnica molecular, reação de polimerização em cadeia (PCR), das cepas de *Escherichia coli* isoladas de bezerros hígidos e com diarreia no Distrito Federal, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar genes codificadores de enterotoxinas termolábil-I (LT-I) shiga toxina-I (*stx1*), adesina da intimina (*eae*), e adesina (K99), das cepas de *E.coli* pelo método da PCR;
- Identificar agentes parasitários nas fezes de bezerros.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR-UGRINOVICH, L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 115, n. 3, p. 297-306, 2007. ISSN 0168-1605.

ALMEIDA, V. D. A. et al. Frequency of species of the Genus *Eimeria* in naturally infected cattle in Southern Bahia, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 78-81, 2011. ISSN 1984-2961.

ANDRADE, G. I. et al. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 7, p. 1783-1790, 2012. ISSN 0049-4747.

ASANO, K. M. **Detecção simultânea de Coronavírus bovino e Rotavírus do grupo A em amostras fecais de bovinos utilizando uma multiplex hemi-nested RT-PCR.** Universidade de São Paulo

BANGOURA, B. et al. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. **Parasitology research**, v. 110, n. 2, p. 875-881, 2012. ISSN 0932-0113.

BATISTA, B. M. M. Morfometria comparativa de larvas infectantes de *Cooperia* spp. e *Trichostrongylus* spp. de ruminantes. 2016.

BÉTIS, F. et al. Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial migration, which in turn promotes cytokine-dependent upregulation of decay-accelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins. **Infection and immunity**, v. 71, n. 4, p. 1774-1783, 2003. ISSN 0019-9567.

BIANCHIN, I.; HONER, M. Helminth parasites of beef cattle in the Cerrado Region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 19, n. 1, p. 39-45, 1987. ISSN 0049-4747.

BLANCHARD, P. C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 28, n. 3, p. 443-64, Nov 2012. ISSN 0749-0720.

BLANCO, M. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 2, p. 645-651, 2004. ISSN 0095-1137.

BLANCO, M. et al. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Vet Microbiol**, v. 54, n. 3-4, p. 309-19, Mar 1997. ISSN 0378-1135 (Print)

0378-1135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100331> >.

BOWMAN, D.; DE GEORGIS, P. V. **Parasitologia veterinária**. Elsevier, 2010.

BRANDAL, L. T. et al. Norwegian sheep is an important reservoir for human pathogenic *Escherichia coli* O26: H11. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 00186-12, 2012. ISSN 0099-2240.

BRUHN, F. R. P. et al. Occurrences of *Eimeria* spp. and gastrointestinal nematodes in dairy calves in southern Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2012. ISSN 1984-2961.

CASTANIE-CORNET, M.-P. et al. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 11, p. 3525-3535, 1999. ISSN 0021-9193.

CHO, Y.-I. et al. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 3, p. 375-385, 2013. ISSN 0378-1135.

COELHO, M. et al. Eimeriosis in dairy cattle of the municipality of Silveiras-SP. **PUBVET**, v. 11, n. 3, p. 267-271, 2017. ISSN 1982-1263.

CONNOLLY, J. P.; FINLAY, B. B.; ROE, A. J. From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 568, 2015. ISSN 1664-302X.

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical animal health and production**, v. 47, n. 1, p. 3-11, 2015. ISSN 0049-4747.

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Trop Anim Health Prod**, v. 47, n. 1, p. 3-11, Jan 2015. ISSN 1573-7438 (Electronic)

0049-4747 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25311440> >.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in calves: an update. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014a. ISSN 0100-736X.

_____. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014b. ISSN 0100-736X.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 822-80, Oct 2013. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811233/pdf/zcm822.pdf>>.

CUNHA, P. H. J. D. **Diagnóstico diferencial das Diarréias nos Bovinos** 2010.

DEAN-NYSTROM, E. A.; BOSWORTH, B. T.; MOON, H. W. Pathogenesis of Escherichia coli O157:H7 in weaned calves. **Adv Exp Med Biol**, v. 473, p. 173-7, 1999. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598.

DEAN-NYSTROM, E. A. et al. Escherichia coli O157: H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. **Infection and immunity**, v. 66, n. 9, p. 4560-4563, 1998. ISSN 0019-9567.

DO COUTO, M. C. M.; DE FREITAS LIMA, M.; DO BOMFIM, T. C. B. New Cryptosporidium parvum subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. **Acta tropica**, v. 130, p. 117-122, 2014. ISSN 0001-706X.

DORRIS, M.; VINEY, M. E.; BLAXTER, M. L. Molecular phylogenetic analysis of the genus Strongyloides and related nematodes. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1507-1517, 2002. ISSN 0020-7519.

DRUMMOND, V. O. Detecção de genes de enterotoxinas, caracterização bioquímica e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de Escherichia coli isoladas de suínos hípidos do Distrito Federal. 2011.

DUPONT, H. L. Travellers' diarrhoea: contemporary approaches to therapy and prevention. **Drugs**, v. 66, n. 3, p. 303-314, 2006. ISSN 0012-6667.

EL-SEEDY, F. et al. Prevalence of Salmonella and E. coli in neonatal diarrheic calves. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 45-51, 2016. ISSN 2314-8535.

ETCHEVERRIA, A. I.; PADOLA, N. L. Shiga toxin-producing Escherichia coli: factors involved in virulence and cattle colonization. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 366-372, 2013. ISSN 2150-5594.

FACURY FILHO, E. J. Evolução da infecção por Eimeria spp em bezerros naturalmente infectados e seu controle através da administração de anticoccídicos no suplemento mineral. 1992.

FARFAN, M. J.; TORRES, A. G. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains. **Infection and immunity**, v. 80, n. 3, p. 903-913, 2012. ISSN 0019-9567.

FARIA, F. D. S. Diarreia viral bovina: revisão de literatura e relato de casos. 2013.

FAUST, E. C. et al. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. **The Journal of Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 241-262, 1939. ISSN 0022-3395.

FERREIRA, M. R. A. et al. Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. **Tropical animal health and production**, v. 46, n. 4, p. 635-639, 2014. ISSN 0049-4747.

FIELD, M.; SEMRAD, C. Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. **Annual Review of Physiology**, v. 55, n. 1, p. 631-655, 1993. ISSN 0066-4278.

FOSTER, D.; SMITH, G. W. Pathophysiology of diarrhea in calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 13-36, 2009. ISSN 0749-0720.

FRANZIN, F. M.; SIRCILI, M. P. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. **BioMed research international**, v. 2015, 2015. ISSN 2314-6133.

GIRON, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 710-714, 1991. ISSN 0036-8075.

GOOSNEY, D. L.; GRUENHEID, S.; FINLAY, B. B. Gut feelings: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 16, p. 173-89, 2000. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research.**, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

GOULD, L. H. et al. Recommendations for diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. **MMWR Recomm Rep**, v. 58, n. RR-12, p. 1-14, 2009.

GUIMARAES, A.; GUEDES, E.; CARVALHO, R. Occurrence of *Giardia* spp. in dairy calves in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 652-653, 2001. ISSN 0102-0935.

GÜLER, L.; GÜNDÜZ, K.; OK, Ü. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. **Zoonoses and public health**, v. 55, n. 5, p. 249-257, 2008. ISSN 1863-2378.

GYLES, C.; FAIRBROTHER, J. *Escherichia coli*. 267-308. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Blackwell Publishing, Singapore, 2010.

HACHICH, E. et al. Giardia and Cryptosporidium in source waters of Sao Paulo State, Brazil. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 239-245, 2004. ISSN 0273-1223.

JARVIS, K. G. et al. Enteropathogenic Escherichia coli contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 17, p. 7996-8000, 1995. ISSN 0027-8424.

JEREZ, J. et al. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 19-23, 2002. ISSN 1808-1657.

JIANG, Z.-D. et al. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative Escherichia coli virulence factors in international travelers. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4185-4190, 2002. ISSN 0095-1137.

JOHNSON, T. J. et al. Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxicogenic Escherichia coli. **Veterinary microbiology**, v. 144, n. 1, p. 100-109, 2010. ISSN 0378-1135.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of Escherichia coli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 750-774, 2009. ISSN 1092-2172.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004. ISSN 1740-1526.

KONEMAN, E. W. et al. **Koneman Diagnostico microbiologico: texto e atlas colorido**: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008.

LEE, J. H.; HUR, J.; STEIN, B. D. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic Escherichia coli O26 and O111 in calves associated with diarrhea. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 2, p. 205-209, 2008. ISSN 1090-0233.

LEOMIL, L. et al. Frequency of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary microbiology**, v. 97, n. 1, p. 103-109, 2003. ISSN 0378-1135.

LIANG, S.; HAJISHENGALLIS, G. Heat-labile enterotoxins as adjuvants or anti-inflammatory agents. **Immunological investigations**, v. 39, n. 4-5, p. 449-467, 2010. ISSN 0882-0139.

LITHERLAND, N. Oklahoma Dairy Report – A dairy nutrition newsletter. Oklahoma State University Issue 2, vol. 1, 2007.

LOPES, R. S.; ARAÚJO-JUNIOR, J. P. Identification of Cryptosporidium species and genotypes in dairy cattle in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 22-28, 2013. ISSN 1984-2961.

MARTINS, F. H. et al. Lambs are an important source of atypical enteropathogenic Escherichia coli in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 196, p. 72-77, 2016. ISSN 0378-1135.

MCNAMARA, B. P. et al. Translocated EspF protein from enteropathogenic Escherichia coli disrupts host intestinal barrier function. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 5, p. 621-629, 2001. ISSN 0021-9738.

MILLEMANN, Y. Diagnosis of neonatal calf diarrhoea. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 160, n. 8/9, p. 404-409, 2009. ISSN 0035-1555.

MOREIRA, H. D. O. M. Isolamento de Escherichia coli ácido-resistentes em fezes de bovinos submetidos à dieta de volumoso e concentrado. 2007.

MOURA, R. A. et al. Clonal relationship among atypical enteropathogenic Escherichia coli strains isolated from different animal species and humans. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7399-7408, 2009. ISSN 0099-2240.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals. **Veterinary research**, v. 30, n. 2-3, p. 259-284, 1998. ISSN 0928-4249.

NASCIMENTO, M. F. Remoção de oocistos de Cryptosporidium por meio da filtração direta ascendente em areia: avaliação em escala piloto. 2011.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic escherichia coli. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998. ISSN 0893-8512.

NAYLOR, S. W. et al. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 in the bovine host. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1505-1512, 2003. ISSN 0019-9567.

NGUYEN, S. T. et al. Prevalence and first genotyping of Giardia duodenalis in beef calves in Vietnam. **Tropical animal health and production**, v. 48, n. 4, p. 837-841, 2016. ISSN 0049-4747.

NGUYEN, T. D.; VO, T. T.; VU-KHAC, H. Virulence factors in Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Vietnam. **J Vet Sci**, v. 12, n. 2, p. 159-64, Jun 2011. ISSN 1229-845x.

NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) pathogenesis. <http://journal.frontiersin.org/journal/cellular-and-infection-microbiology>, 2012.

O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 623-643, 2006. ISSN 0749-0720.

OBRIG, T. G. Escherichia coli Shiga toxin mechanisms of action in renal disease. **Toxins**, v. 2, n. 12, p. 2769-2794, 2010.

OLIVEIRA, C. V. D. S.; RIBEIRO, J. C.; ALMEIDA, K. S. D. PREVALÊNCIA DE EIMERIA EM BOVINOS LEITEIROS DO MUNICÍPIO DE SILVEIRAS-SP. 2017.

OLIVEIRA FILHO, J. P. D. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. 2006.

OLIVEIRA, S. J. Microbiologia veterinária. **Guia bacteriológico prático**, v. 2, p. 237, 2000.

OLSON, M. E. et al. Update on Cryptosporidium and Giardia infections in cattle. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2004. ISSN 1471-4922.

OPERARIO, D. J.; HOUPPT, E. Defining the etiology of diarrhea: novel approaches. **Current opinion in infectious diseases**, v. 24, n. 5, p. 464, 2011.

PETER, G. S. et al. Prevalence of Cryptosporidia, Eimeria, Giardia, and Strongyloides in pre-weaned calves on smallholder dairy farms in Mukurwe-ini district, Kenya. **Veterinary world**, v. 8, n. 9, p. 1118, 2015.

PICCO, N. Y. et al. Molecular screening of pathogenic Escherichia coli strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. **Revista argentina de microbiología**, v. 47, n. 2, p. 95-102, 2015. ISSN 0325-7541.

POLIZEL, F. F. Controle de eimeriose em bovinos. 2013.

POURTAGHI, H.; DAHPAHLAVAN, V.; MOMTAZ, H. Virulence genes in Escherichia coli isolated from calves with diarrhoea in Iran. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 3, p. 513-515, 2013. ISSN 1618-5641.

QUEIROZ, J. J. F.; SANTANA, R. F. D. Realidade bacteriológica de hortaliças: um risco à saúde. 2016.

QUINN, P. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005. ISBN 853630927X.

- RASHID, M. et al. Prevalence of gastrointestinal parasites in Brahman crossbred cattle of Bangladesh. **Age**, v. 101, n. 87.8, p. 46, 2015.
- RIGOBELLO, E. et al. Virulence factors of Escherichia coli isolated from diarrheic calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 305-310, 2006. ISSN 0102-0935.
- RODRIGUES, F. D. S. **Eimeria spp. em ruminantes no Estado de Mato Grosso do Sul**. 2014.
- RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strains of Escherichia coli of the classic serogroup O55. **Infection and immunity**, v. 64, n. 7, p. 2680-2686, 1996. ISSN 0019-9567.
- RUAS, J.; BERNE, M. Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos e ovinos. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**, v. 2, p. 19-162, 2001.
- SALVADORI, M. R. et al. Virulence factors of Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 230-235, 2003. ISSN 1517-8382.
- SANTIN, M.; DARGATZ, D.; FAYER, R. Prevalence of Giardia duodenalis assemblages in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. **Veterinary parasitology**, v. 183, n. 3, p. 231-236, Feb 10 2012. ISSN 0304-4017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21885196> >.
- SANTÍN, M. et al. Prevalence and age-related variation of Cryptosporidium species and genotypes in dairy calves. **Veterinary parasitology**, v. 122, n. 2, p. 103-117, 2004. ISSN 0304-4017.
- SANTOS, Y. T. O. Qualidade sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador-BA e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de escherichia coli. 2007.
- SCALETSKY, I.; SILVA, M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. **Infection and immunity**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984. ISSN 0019-9567.
- SCHUCH, L. Diarréia dos Bezerros. **RIET-CORREA, F.; SCHILD, AL; MENDES, LC LEMOS RAA Doenças de Ruminantes e Eqüinos**, v. 2, p. 408-420, 1998.
- SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 264-292, 2005. ISSN 0893-8512.
- SILVA, F. M. P. Diagnóstico e caracterização molecular de Giardia duodenalis e Cryptosporidium spp. em amostras fecais de bovinos e ovinos. 2007.
- ŠLAPETA, J. Cryptosporidium species found in cattle: a proposal for a new species. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 10, p. 469-474, 2006. ISSN 1471-4922.

STREIT, A. Reproduction in Strongyloides (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. **Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 285-294, 2008. ISSN 1469-8161.

SUZUKI, T. et al. Neural Wiskott–Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of Shigella flexneri. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 10, p. 2767-2776, 1998. ISSN 0261-4189.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical Enteropathogenic Escherichia coli.(Synopsis). **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-514, 2002. ISSN 1080-6040.

TROUT, J. M. et al. Prevalence of Giardia duodenalis genotypes in pre-weaned dairy calves. **Vet Parasitol**, v. 124, n. 3-4, p. 179-86, Oct 05 2004. ISSN 0304-4017 (Print)

0304-4017 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381298> >.

TSOLIS, R. M. et al. Contribution of Salmonella typhimuriumvirulence factors to diarrheal disease in calves. **Infection and immunity**, v. 67, n. 9, p. 4879-4885, 1999. ISSN 0019-9567.

UENO, T. E. H. **Prevalência das infecções por Toxoplasma gondii e Neospora caninum em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil**. 2005. Universidade de São Paulo

VALAT, C. et al. Assessment of adhesins as an indicator of pathovar-associated virulence factors in bovine Escherichia coli. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 23, p. 7230-7234, 2014. ISSN 0099-2240.

WEDL, C.; BUSK, G. Reviews: Rudiments of Pathological Histology. **Journal of Cell Science**, v. 1, n. 15, p. 225-227, 1856. ISSN 0021-9533.

WELLS, J. et al. Isolation of Escherichia coli serotype O157: H7 and other Shiga-like-toxin-producing E. coli from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 985-989, 1991. ISSN 0095-1137.

WIELER, L. et al. Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2980-2984, 1996. ISSN 0095-1137.

XIAO, L.; HERD, R. Infection patterns of Cryptosporidium and Giardia in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 55, n. 3, p. 257-262, 1994. ISSN 0304-4017.

ZHANG, S. et al. Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype Typhimurium-induced diarrhea. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 1-12, 2003. ISSN 0019-9567.

CAPÍTULO II

PERFIL PARASITOLÓGICO ENCONTRADO EM FEZES DE BEZERROS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL

RESUMO

Dentre os parasitas gastrointestinais de maior importância para bezerros encontram-se os estrongilídeos, estrongiloídes, *Eimeria* spp. e *Giardia* spp., agentes causadores de diarreia em animais jovens. No presente estudo foram visualizadas as ocorrências desses parasitas em fezes obtidas de bezerros no Distrito Federal, durante o período de novembro de 2015 a março de 2016, com fezes de diferentes características.

Foram coletadas 83 amostras de fezes de bezerros de ambos os sexos no intervalo de 3 meses a 9 meses de idade. Os resultados demonstraram a presença de cistos de *Giardia* spp. e oocistos do coccídeo *Eimeria* spp. em 21,7% (18/83) e 36,1% (30/83) das amostras respectivamente. Quanto aos helmintos foram observados 33,7% (28/83) ovos de estrongilídeos e 9,6% (8/83) ovos de estrongiloídes. A visualização e associação desses parasitas frente ao quadro clínico de bezerros são de extrema importância para a literatura, complementando a epidemiologia desses protozoários e helmintos.

Palavras chaves: eimeriose; bezerros; giardíase; helmintoses

PARASITOLOGICAL PROFILE FOUND FROM FECES OF CALVES IN THE FEDERAL DISTRICT, BRAZIL

ABSTRACT

Among the gastrointestinal parasites of major importance for calves are the strongilids, strongyloids, *Eimeria* spp. and *Giardia* spp., agents that cause diarrhea in young animals. In the present study, the occurrence of these parasites in feces obtained from calves in the Federal District, during the period from November 2015 to March 2016, with feces of different characteristics were visualized.

Eight (83) feces samples were collected from calves of both sexes between 3 months and 9 months of age. The results showed the presence of *Giardia* spp. and oocysts of the coccyx *Eimeria* spp. In 21.7% (18/83) and 36.1% (30/83) of the samples respectively. Regarding the helminths, 33.7% (28/83) strongyloid eggs and 9.6% (8/83) strongyloid eggs were observed. The visualization and association of these parasites with the clinical picture of calves are extremely important for the literature, complementing the epidemiology of these protozoa and helminths.

Key words: Eimeriosis; calves; Giardiasis; Helminthes

INTRODUÇÃO

A diarreia, uma das principais causas de mortalidade em bezerros é uma doença multifatorial e dentre os agentes infecciosos e parasitários encontramos os protozoários *Eimeria* spp., *Giardia* spp. e os helmintos strongilídeo e strongilóides cujas principais vias de transmissão ocorrem pela ingestão de rações contaminadas por animais infectados no rebanho e pela via fecal-oral direta.

Eimeria spp. durante o ciclo biológico, induz a destruição de enterócitos causando perda de água, sangue, albumina e eletrólitos para o lumen intestinal o que causa um impacto direto na produção de bezerros Dauschies e Najdrowski, (2005); Almeida *et al.*, (2011). Eimeriose bovina é mantida no rebanho com a presença de animais adultos contaminados, que se tornam portadores assintomáticos reconhecidos como fontes de infecção para animais mais jovens e mais susceptíveis a parasitose (Matjila e Penzhorn, 2002; Dauschies e Najdrowski, 2005).

Giardia spp. são protozoários flagelados não invasivos que se multiplicam assexuadamente na superfície do intestino delgado de hospedeiros vertebrados (Thompson, 2000). Possuem a forma de trofozoíto que aderem as células da mucosa do intestino delgado e cistos que são estruturas infectantes resistentes ao meio ambiente, e que podem causar atrofia das vilosidades, inflamação linfocítica e má absorção com aumento de secreção no lúmen intestinal acarretando em diarreia (O'handley e Olson, 2006; Bowman e De Georgis, 2010).

Bezerros podem se infectar durante o pastejo ao ingerirem larvas infectantes de helmintos e podem adquirir cargas altas de strongilídeos e strongilóides. Cargas altas de infecção e dependendo das espécies patogênicas envolvidas, esses hospedeiros podem causar diarreia (Bowman e De Georgis, 2010; Oliveira *et al.*, 2017).

No Distrito Federal, há poucos relatos sobre o perfil parasitológico da presença desses protozoários e helmintos na região através da visualização de cistos de *Giardia* spp. e ovos de helmintos pelos bezerros, sendo necessárias mais informações a respeito da visualização de cistos de *Giardia* spp. e ovos de helmintos frente a um quadro clínico de diarreia. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi à visualização de cistos de *Giardia* spp. e ovos de strongilídeos e strongilóides diretamente das fezes de bezerros de propriedades mistas na região do Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de novembro de 2015 a março de 2016, 14 propriedades de cinco locais diferentes no Distrito Federal (Gama, São Sebastião, Brazlândia, Planaltina e Paranoá) foram visitadas e coletadas amostras fecais de 83 bezerros de diferentes raças, variando de três dias a nove meses de idade.

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais com uso de luvas estéreis e acondicionadas em frascos estéreis apropriados para coleta de fezes, previamente identificados, transportados, armazenados em bolsa térmica com gelo reciclável e encaminhados ao laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade de Brasília (LPDP/UnB) onde foram processadas e classificadas de acordo com Walker *et al.* (1998), quanto à aparência, para auxiliar a interpretação do parasitismo.

A técnica de MacMaster (Gordon e Whitlock, 1939) foi utilizada para contagem de ovos por grama de fezes (OPG) sendo pesados dois gramas de fezes previamente homogeneizadas. Para a visualização dos cistos de *Giardia* spp. foi utilizada a técnica de Faust (Faust *et al.*, 1939) sendo pesados um grama de fezes.

Todos os exames foram realizados em até 24 horas após a coleta e as fezes que não estavam sendo processadas eram mantidas em refrigeração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, das 83 amostras de fezes colhidas, 35 eram fezes consideradas fezes de bezerros sem sinais clínicos de diarreia, normais (fezes formadas e bem firmes) e 48 eram fezes consideradas de bezerros com sinais clínicos de diarreia sendo 15 líquidas (caracterizando diarreia intensa), 24 consideradas pastosas (caracterizando diarreia moderada), 8 fezes consideradas mucoides (fezes pastosas com bastante muco) e uma sanguinolenta (considerada líquida com presença de sangue) de acordo com a classificação de Walker *et al.* (1998) como demonstrado na figura 1.

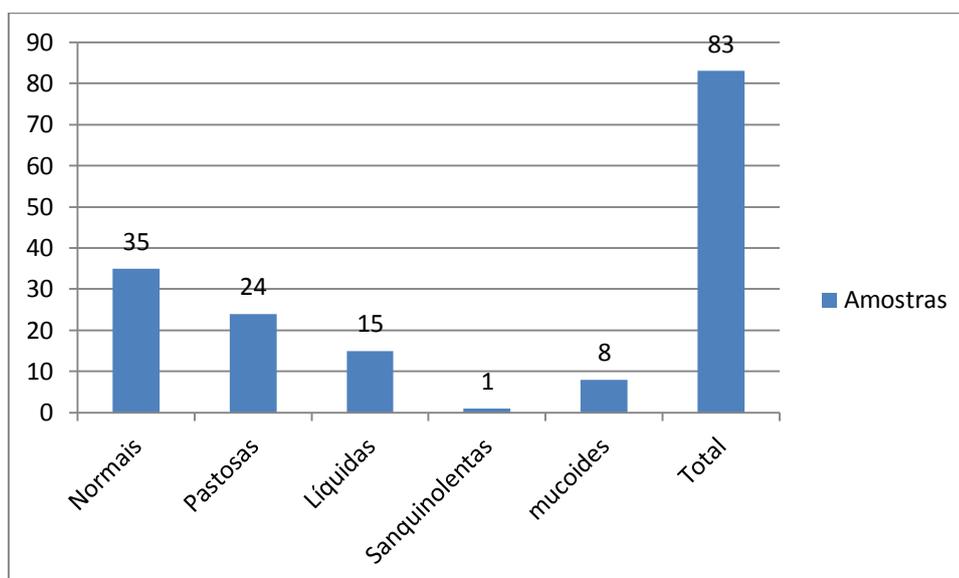


Figura 1: Classificação segundo Walker *et al.* (1998) das fezes coletadas de bezerros

O presente trabalho visualizou cistos de *Giardia* spp. em 18 amostras (21,7%), de fezes sendo que 10 (12%) foram oriundas de bezerros que apresentavam sinais clínicos de diarreia pastosa a aquosa e 8 (9,6%) de bezerros sem sinais clínicos (fig 2).

Os Resultados encontrados são superiores aos relatados por Guimaraes *et al.* (2001) para de cistos de *Giardia* spp. em fezes de bezerros leiteiros no município de Lavras, Minas Gerais.

Resultados mais aproximados foram encontrados por Fava (2013) que observou 18,7% cistos de *Giardia* spp. de fezes de bezerros em Uberlândia e por Nguyen *et al.* (2016) que observaram a presença dos cistos em 13,8% em fezes de bezerros neonatos na região do Vietnam.

Estudos realizados por Júnior *et al.* (2011) observaram resultados superiores ao presente trabalho 25,6% em propriedades de produção de leite na região do Campo das Vertentes de Minas Gerais de bezerros com até três meses de idade. Resultados superiores ao presente estudo também foram observados por Wade *et al.* (2000) 21,1% obtido de fezes de bezerros com até seis meses de idade no estado de Nova Iorque.

Os oocistos de *Eimeria* spp. foram visualizados em 30 amostras representando 36,1% sendo que 19 (22,9%) foram de bezerros com sinais clínicos de diarreia pastosa a mucoide e 11(13,2%) de animais sem sinais clínicos como demonstrado na figura 2.

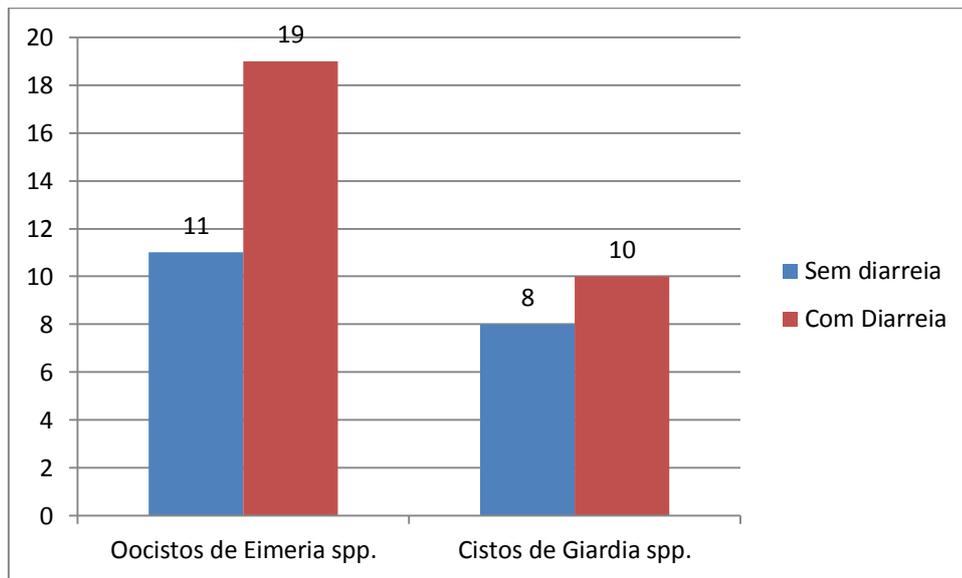


Figura 2: Presença de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Eimeria* spp. em fezes diarreicas e não diarreicas de bezerros.

Em relação à *Eimeria* spp. foram visualizados oocistos em 30(36,1%) das 83 amostras o que corrobora com a pesquisa feita por Peter *et al.* (2015) que visualizou (42.7%) amostras, oocistos de *Eimeria* spp e Florião *et al.* (2016) que encontrou (66.66 %). Porém resultados superiores a Rashid *et al.* (2015) que em 230 amostras identificaram 18 (7,83%) oocistos de *Eimeria* spp.

Em relação aos helmintos, das 28 amostras que continham ovos de strongilídeos, 14 (16,9%) foram de fezes de bezerros com sinais clínicos de diarreia pastosa e 14 (16,9%) de fezes de bezerros sem sinais de diarreia como demonstra a figura 3. Quanto aos ovos de strongiloides spp., o presente estudo observou em apenas 8 (9,6%), sendo 6 (7,2%) amostras oriundas de fezes de bezerros com sinais clínicos e 2 (2,4%) de fezes de bezerros sem sinais clínicos. Porcentagem semelhante ao encontrado por Peter *et al.* (2015) que encontrou em apenas 6 amostras de 110 (5,4%) ovos de strongiloides spp. e por Rashid *et al.* (2015) que em 230 amostras identificou 17 (7.39%).

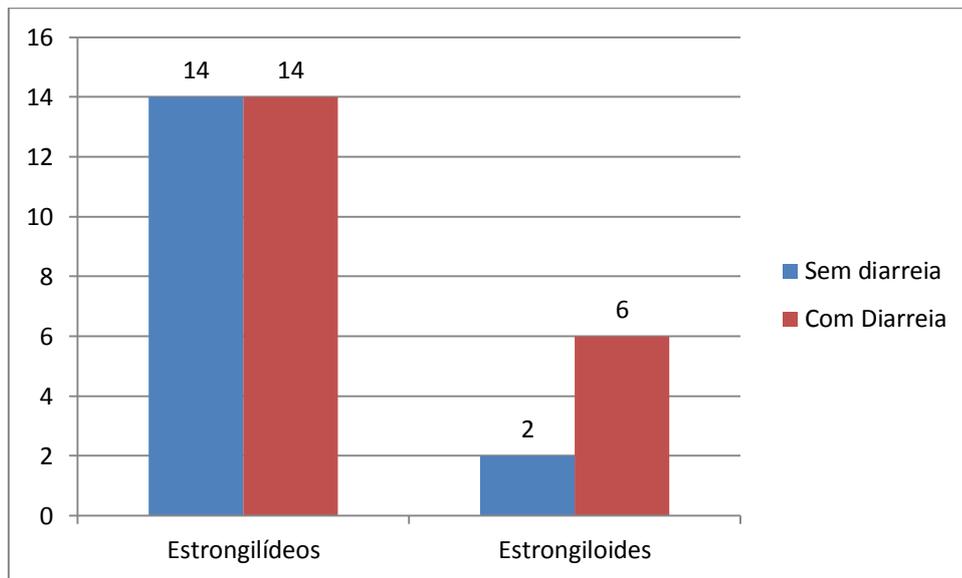


Figura 3: Presença de ovos de estrongilídeos e estrongiloides em fezes diarreicas e não diarreicas de bezerros.

Foram observados ovos de estrongilídeos em 28 (33,7%) superior ao trabalho feito por Rashid *et al.* (2015) que observaram apenas 21(9,13%) ovos de estrongilídios spp.

No presente estudo não foram observados ovos de *Eimeria* spp. em 53(63,8%) amostras sendo 29 e 24 de animais com sinais clínicos e sem sinais clínicos respectivamente. Não foram observados cistos de *Giardia* spp. em 65 (78,3%) amostras. Também não foram observados ovos de estrongilídios spp. e estrongiloides spp. em 53 e 75 amostras respectivamente.

CONCLUSÃO

Fatores como o manejo, parâmetros geográficos e climáticos, a idade do hospedeiro e o tipo de teste usado para diagnóstico influenciam na variação de cistos. Quanto à idade diversos autores (Xiao e Herd, 1994; Olson *et al.*, 1997) consideram os animais mais jovens como principais fontes de *Giardia* spp. com excreção intermitente de cistos o que dificulta ainda mais o diagnóstico (Geurden et al., 2010).

Embora o estudo tenha observado a presença de cistos, oocistos e ovos em fezes de bezerros que demonstraram sinais clínicos de diarreia, encontrar esses agentes nas fezes de bezerros doentes não justifica que sejam causadores primários de diarreia, da mesma forma que alguns animais apresentavam sinais clínicos de diarreia aquosa, mas não foram encontrados cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Eimeria* spp. e ovos de helmintos nesses animais o que sugere que possivelmente outros fatores estariam causando esses sinais clínicos ou os bezerros ainda não estariam transmitindo esses cistos, oocistos e ovos em suas fezes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. D. A. et al. Frequency of species of the Genus Eimeria in naturally infected cattle in Southern Bahia, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 78-81, 2011. ISSN 1984-2961.

BOWMAN, D.; DE GEORGIS, P. V. **Parasitologia veterinária**. Elsevier, 2010.

DAUGSCHIES, A.; NAJDROWSKI, M. Eimeriosis in cattle: current understanding. **Zoonoses and Public Health**, v. 52, n. 10, p. 417-427, 2005. ISSN 1439-0450.

FAUST, E. C. et al. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. **The Journal of Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 241-262, 1939. ISSN 0022-3395.

FAVA, N. D. M. N. Variabilidade genotípica dos isolados de Giardia duodenalis em diferentes espécies de animais. 2013.

FLORIÃO, M. M. et al. New approaches for morphological diagnosis of bovine Eimeria species: a study on a subtropical organic dairy farm in Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 48, n. 3, p. 577-584, 2016. ISSN 0049-4747.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Is Giardia a significant pathogen in production animals? **Experimental parasitology**, v. 124, n. 1, p. 98-106, 2010. ISSN 0014-4894.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research.**, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

GUIMARAES, A.; GUEDES, E.; CARVALHO, R. Occurrence of Giardia spp. in dairy calves in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 652-653, 2001. ISSN 0102-0935.

JÚNIOR, F. A. S. et al. Fatores de risco associados à infecção por Cryptosporidium spp. e Giardia duodenalis em bovinos leiteiros na fase de cria e recria na mesorregião do Campo das Vertentes de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 690-696, 2011. ISSN 0100-736X.

MATJILA, P. T.; PENZHORN, B. Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 2, p. 93-102, 2002. ISSN 0304-4017.

NGUYEN, S. T. et al. Prevalence and first genotyping of Giardia duodenalis in beef calves in Vietnam. **Tropical animal health and production**, v. 48, n. 4, p. 837-841, 2016. ISSN 0049-4747.

O'HANDLEY, R. M.; OLSON, M. E. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 22, n. 3, p. 623-643, 2006. ISSN 0749-0720.

OLIVEIRA, C. V. D. S.; RIBEIRO, J. C.; ALMEIDA, K. S. D. PREVALÊNCIA DE EIMERIA EM BOVINOS LEITEIROS DO MUNICÍPIO DE SILVEIRAS-SP. 2017.

OLSON, M. et al. Giardia and Cryptosporidium in Canadian farm animals. **Veterinary parasitology**, v. 68, n. 4, p. 375-381, 1997. ISSN 0304-4017.

PETER, G. S. et al. Prevalence of Cryptosporidia, Eimeria, Giardia, and Strongyloides in pre-weaned calves on smallholder dairy farms in Mukurwe-ini district, Kenya. **Veterinary world**, v. 8, n. 9, p. 1118, 2015.

RASHID, M. et al. Prevalence of gastrointestinal parasites in Brahman crossbred cattle of Bangladesh. **Age**, v. 101, n. 87.8, p. 46, 2015.

THOMPSON, R. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12, p. 1259-1267, 2000. ISSN 0020-7519.

WADE, S.; MOHAMMED, H.; SCHAAF, S. Prevalence of Giardia sp., Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium muris (C. andersoni) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. **Veterinary Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 1-11, 2000. ISSN 0304-4017.

WALKER, P. G. et al. A reliable, practical, and economical protocol for inducing diarrhea and severe dehydration in the neonatal calf. **Canadian journal of veterinary research**, v. 62, n. 3, p. 205, 1998.

XIAO, L.; HERD, R. Infection patterns of Cryptosporidium and Giardia in calves. **Veterinary Parasitology**, v. 55, n. 3, p. 257-262, 1994. ISSN 0304-4017.

CAPÍTULO III

DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS E ADESINAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE FEZES DE BEZERROS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL

DETECTION OF ENTEROTOXINS GENES AND ADHESION OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM FECES OF CALVES IN THE FEDERAL DISTRICT, BRAZIL

Diego Maués Costa Ribeiro¹; Simone Peregmanis²

¹ Mestrado em Saúde Animal, Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília- Distrito Federal

² Professora associada II da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – Distrito Federal

RESUMO

Um total de 83 cepas de *Escherichia coli* foi isolado de fezes de bezerros na região do Distrito Federal, procurando a detecção de genes de enterotoxinas e adesinas (LT-I, *stx*₁, *eae* e K99). Das cepas isoladas 16 (19,3%) amplificaram para o gene da adesina intimina (*eae*), 6 amostras (7,2%) amplificaram para o gene de Shiga toxina (*stx*₁) e 5 (6,0%) amostras amplificaram para ambos os genes *eae* e *stx*₁. Nenhuma das *E.coli* amplificou os genes K99 e LT-I. Esses resultados demonstraram a presença dos genes *eae* e *stx*₁ em cepas de *E.coli* isoladas de bezerros diarreicos e não diarreicos no Distrito Federal.

Palavras chaves: Diarreia, Bezerros, *Escherichia coli*, Distrito Federal

ABSTRACT

A total of 83 strains *Escherichia coli* were isolated from calf feces in the Federal District, Brazil, searching for the detection of enterotoxin and adhesin genes (LT-I, *stx*₁, *eae* and K99). 16 strains (19.3%) amplified for the Intinin Aminin (*eae*) gene, 6 samples (7.2%) amplified for the Shiga toxin gene (*stx*₁) and 5 (6.0%) samples amplified to both the *eae* and *stx*₁ genes. None of the *E. coli* amplified the K99 and LT-I genes. These results demonstrated the presence of *eae* and *stx*₁ genes from *E.coli* strains isolated from diarrheic and non-diarrheal calves in the Federal District.

Key words: Diarrhea, Calves, *Escherichia coli*, Federal District.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é considerado um microrganismo comensal do trato gastrointestinal em mamíferos, embora seja um importante patógeno associado à diarreia, devido a capacidade desse microrganismo perder ou adquirir genes codificantes de fatores de virulência tornando-o um patógeno altamente diversificado e adaptado a diferentes hospedeiros (Croxen *et al.*, 2013).

Bezerros aparentemente saudáveis podem transmitir cepas patogênicas de *E.coli* através da principal via de infecção, a via fecal-oral desta forma, alimentos, água, baldes, leite, cochos contaminados pelas fezes de bezerros portadores são importantes fontes de infecção para animais susceptíveis a adquirirem a bactéria. *E.coli* enterotoxigênica (ETEC); *E.coli* enteropatogênica (EPEC); *E.coli* enterohemorrágica (EHEC); *E.coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E.coli* necrotóxigênica (NTEC) (Coura *et al.*, 2014) são as principais cepas de *E.coli* diarreio gênicas para bezerros e são classificadas de acordo com os fatores de virulência que expressam.

A detecção de genes de virulência circulantes no rebanho de bezerros na região do Distrito Federal é importante para melhora sanitária da produção de bezerros.

Este estudo teve como objetivo a detecção dos genes codificadores para adesão, produção de adesinas K99, Intimina (*eae*) e de genes codificadores de enterotoxinas shigatoxinas (*stx*₁) e termolábil-I (LT-I), isoladas de fezes de bezerros com e sem sinais clínicos de diarreia coletados em propriedades localizadas no Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram coletadas amostras fecais diretamente da ampola retal dos animais com uso de luvas estéreis e acondicionadas em frascos estéreis apropriados para coleta de fezes, previamente identificados, de 83 bezerros de ambos os sexos, sendo 68 mestiços, 9 holandeses, 6 jérseis e com idades variando de três dias a nove meses. Durante o período de novembro de 2015 a março de 2016.

As amostras foram obtidas de cinco locais diferentes no Distrito Federal (Gama, São Sebastião, Brazlândia, Planaltina e Paranoá), em 14 propriedades diferentes. Os frascos foram armazenados e transportados em bolsa térmica com gelo reciclável e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília (UnB) para cultivo e análises. Para as análises microbianas e diagnósticas, as fezes foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey (Oxoid®), sendo incubadas em estufa a 37°C por 24h.

Após o período de incubação, foram observadas as características morfológicas das colônias. As colônias que apresentaram coloração rósea, típica de fermentação da lactose, foram repicadas em ágar sangue carneiro 5% e ágar eosina azul de metileno – EMB para posterior identificação bioquímica.

Todas as colônias foram submetidas aos testes bioquímicos: Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer, Citrato, Motilidade, Gelatina, Nitrato, Triplo açúcar e ferro (TSI), Malonato, Fenilalanina, Ureia, Esculina, Descarboxilação de lisina, Arginina e Ornitina e fermentação de açúcares: Glicose, Sacarose, Lactose, Ramnose, Rafinose, Xilose, Arabinose, Maltose, Manitol, Trealose, Salicina, Dulcitol e Sorbitol segundo Quinn *et al.* (2005) e Trabulsi e Alterthum (2004)

As colônias identificadas bioquimicamente e morfologicamente como sendo de *Escherichia coli* foram inoculadas em caldo infusão coração cérebro (BHI), colocadas em estufa a 37°C por 24h para criopreservação (800 µl do caldo com crescimento bacteriano acrescentado de 200 µl de glicerol) e futura extração de material genético para pesquisa de genes de enterotoxinas e adesinas.

Extração de DNA bacteriano e detecção de genes de enterotoxinas

As amostras criopreservadas foram expostas a temperatura ambiente, em seguida repicada em ágar sangue carneiro 5% colocadas em estufa a 37°C por 24h. Depois foram retiradas três alçadas de colônias previamente isoladas e com as mesmas características morfológicas, colocadas em 300 µl de água Mili-Q em microtubos do tipo eppendorf® e homogeneizados em vórtex. Os tubos foram colocados em banho maria a água fervente em 100°C por 10 minutos, para o rompimento celular e liberação de DNA sendo imediatamente centrifugadas a 13000 rpm (Centrífuga SIGMA® 2K15) previamente ligada por 15 minutos para alcançar a temperatura de 4°C. Após a centrifugação os sobrenadantes contendo DNA foram coletados e repassados em novos microtubos e congelados.

Seguindo protocolo adaptado de (Blanco *et al.*, 1997), as reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 µl, contendo 2µl de DNA extraído; 5,0µl de solução tampão 10x, (PHONEUTRIA® Belo Horizonte, MG); 1,5 MgCl₂ 50 mM, (PHONEUTRIA® Belo Horizonte, MG); 1,25 µl de dNTP 10 mM, (NEOBIO® Botucatu, SP); 1,0µl de Taq DNA polimerase (5U/µl, PHONEUTRIA® Belo Horizonte, MG) e 0,5 µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*) na diluição de 10 pmol/µl específico para cada enterotoxina e adesina. A sequência dos nucleotídeos dos *primers* utilizados, o tamanho dos amplicons e a temperatura de anelamento estão na tabela 1.

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho dos *amplicons*

Enterotoxinas e Adesinas	Sequências (5' - 3')	Temperaturas de anelamento	Tamanho do amplicons (pb)
LT-I	5'-TATCCTCTCTATATGCACAG-3' 5'-TATAACAGCTTCCACTACAG-3'	54,3°C	480
<i>stx₁</i>	5'AGGTTGCAGCTCTCTTTCAATA3' 5'CTCAGGGGATAATTTGTTTGA3'	58,4°C	364
<i>eae</i>	5'GACCCGGCAACAAGCATAAGC3' 5'-CCTCTTGTTGCTGCAGGTGG-3'	63,3°C	384
K99	5'TGGGACTACCAATGCTTCTG-3' 5'GCTCCGTCTAATGGTGGATA-3'	58,4°C	450

Fonte: Salvadori *et al.*, 2004

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese (BIOTECH[®]) em gel de agarose a 2% acrescido de TEB (108,0g de tris base; 55,0g de ácido bórico; 9,3g de EDTA e 90 ml de água destilada diluída), testados junto a um marcador de peso molecular (NORGEN[®]), visualizado no transiluminador de ultravioleta (UVP[®]). Os controles positivos foram adquiridos no banco de controles positivo do laboratório de Microbiologia Médica Veterinária.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total de 83 amostras, 16 (19,3%) amplificaram para o gene da adesina intimina (*eae*) de 384pb como mostra a figura 1 abaixo, 6 amostras (7,2%) amplificaram para o gene de shiga toxina (*stx₁*) e 5 (6,0%) amostras amplificaram para ambos os genes *eae* e *stx₁* e possivelmente.

Não foram encontrados genes codificadores da toxina termolábel LT-I e para a adesina K99.

Dos 35 bezerros sem sinais clínicos de diarreia foram encontrados, em 12 deles, os genes *eae*, *stx₁* e *stx₁/eae*, sendo 8 (9,6%) bezerros apenas o gene *eae*, em 2 (2,4%) apenas o gene *stx₁* e 2 (2,4%) com ambos os genes *stx₁/eae*. Dos 48 bezerros que apresentavam sinais clínicos de diarreia, foram encontrados em 14 bezerros os genes *eae*, *stx₁* e *stx₁/eae*, sendo que em 7 (8,4%) amplificaram apenas o gene *eae*, em 4 (4,8%) apenas o gene *stx₁* e em 3 (3,6%) para ambos os genes *stx₁/eae*. Identificamos amostras de *E.coli* das quais foram amplificados os genes de intimina (*eae*) em 16 amostras (19,3%), em apenas 6 amostras para *stx₁* e 5 amostras para ambos os genes *eae/stx₁*.

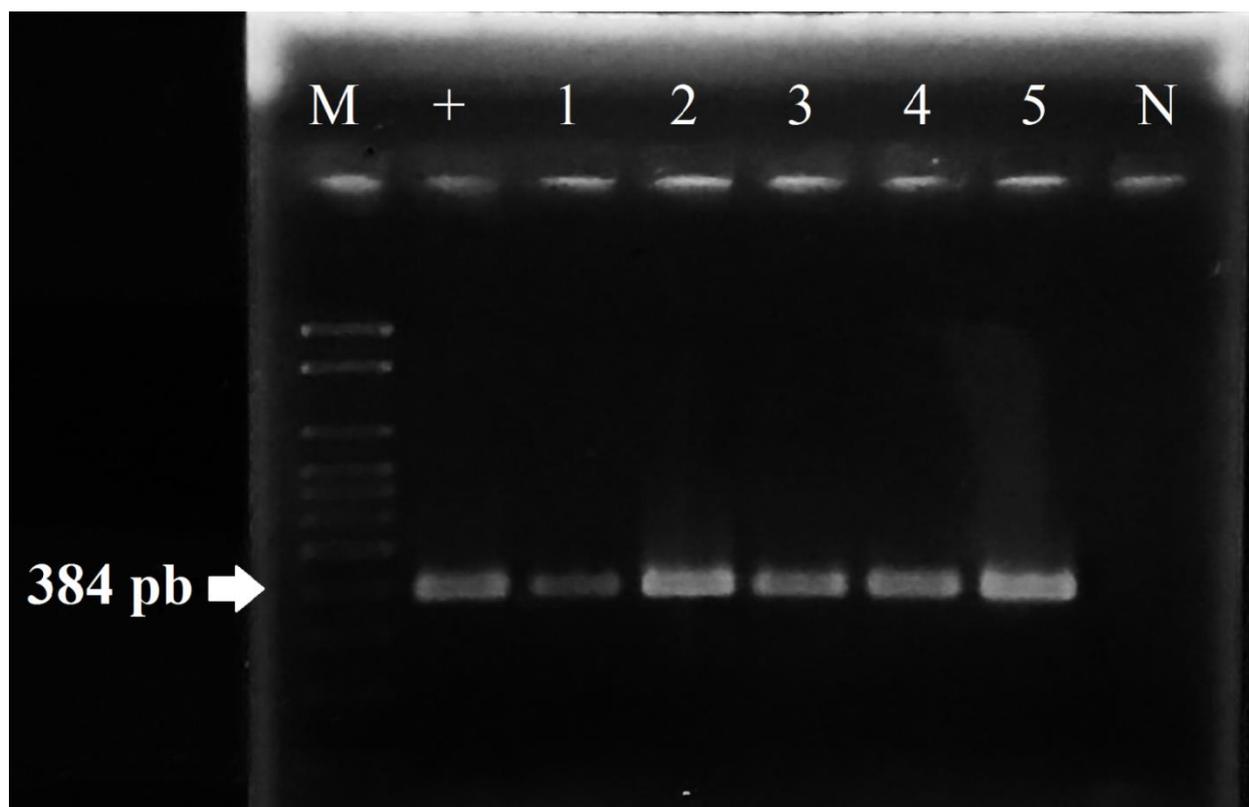


Fig. 1 - Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação do gene intimina (*eae*) de 384 pb. M (Marcador de peso molecular Norgen[®]); + (Controle positivo); 1 (Amostra Braz 4); 2 (Amostra Braz 5); 3 (Amostra 39); 4 (Amostra 75); 5 (Amostra 66); N (Controle negativo); pb (pares de bases).

Resultados semelhantes para amplificação do gene *stx*₁ foram encontrados em amostras de *E.coli* isoladas de bezerros por Salvadori *et al.* (2003), Nguyen *et al.* (2011) e Ferreira *et al.* (2014). Leomil *et al.* (2003) e Coura *et al.* (2015) também encontraram resultados semelhantes para a amplificação dos genes *stx*₁ e intimina (*eae*). Porém no presente estudo não foram amplificados em nenhuma amostra os genes K99 e LT-I diferentemente de Coura *et al.* (2015).

Em termos percentuais, os resultados encontrados neste estudo diferem dos encontrados por Wieler *et al.* (1996) que amplificaram para o gene *eae* em 70,1% das amostras e o gene *stx*₁ em 87,7% das amostras de *E.coli* isoladas. Também diferem dos resultados de Aidar-Ugrinovich *et al.* (2007), que em um total de 55 cepas, sendo 14 de bovinos saudáveis, identificaram 27 isolados (49% das amostras) que possuíam genes *stx*₁ e 14 (25% das amostras) que possuíam o gene *eae*. Em seu estudo, os autores supracitados observaram que em 31 bezerros diarreicos, foi identificada a presença do gene *stx*₁ em 52% das *E.coli* isoladas, fato este que também difere da

presente pesquisa no qual em bezerros diarreicos, apenas 4 amostras de *E.coli* amplificaram para o gene *stx*₁.

Também Pourtaghi *et al.* (2013), em pesquisa realizada em bezerros no Iran, encontraram em 22 cepas isoladas (68,8%) o gene K99 e em 10 cepas isoladas (31,2%) o gene *stx*₁. No presente trabalho foi encontrado o gene *eae* dado que difere do trabalho realizado por Pourtaghi *et al.* (2013) que não o encontrou.

Picco *et al.* (2015), na Argentina, encontraram em um total de 39 cepas, 5 (12,8%) com o gene *eae* e apenas 1 (2,6%) com o gene K99. O estudo de Picco *et al.* (2015), não encontrou o gene LT-1 o que também foi semelhante com o presente estudo, que não identificou o gene LT-I.

Segundo Rigobelo *et al.* (2006) o gene para enterotoxina LT é isolado mais frequentemente de amostras de suínos e humanos.

Em um estudo realizado por Güler *et al.* (2008), em um total de 120 bezerros, 75 estavam diarreicos ou septicêmicos e 45 eram clinicamente saudáveis. Em 16% das *E. coli* isoladas de bezerros diarreicos foram detectados os genes K99, F41 e STa pelo método de PCR multiplex, metodologia não utilizada neste estudo.

Também por PCR multiplex, Andrade *et al.* (2012) encontrou em 18 bezerros sem sinais clínicos de diarreia, 7 (38,9%) cepas com o gene *stx*₁, 3 (16,7%) com o gene F41 e em 138 bezerros com sinais clínicos, 32 (23,2%) amplificaram para o gene *stx*₁, 14 (10,1%) para ambos os genes *stx*₁ e *eae*, 4 (2,9%) para os genes K99 e *stx*₁, 2 (1,4%) para os genes K99 e *eae*.

E. coli diarreio gênicas são isoladas de fezes de suínos, bezerros, aves, cães, mesmo esses animais não aparentando sinais clínicos de diarreia, estes patógenos mesmo classificados como não patogênicos possuem uma ampla variação genética e podem se tornar patogênicos tendo em vista que podem trocar com muita facilidade e rapidez fatores de virulência. A capacidade de adaptação, a resistência a diferentes espécies animais e a barreiras como à própria acidez estomacal destes animais é uma característica importante associada à virulência (Blanchard, 2012).

Embora tenham sido observadas variações na descarboxilação dos aminoácidos lisina, arginina e ornitina, não foram encontradas diferenças significativas na caracterização bioquímica entre cepas de *E.coli* neste presente estudo em relação às tabelas de identificação contidas nos livros de identificação laboratorial, Oliveira (2000) Quinn *et al.* (2005) e Koneman *et al.* (2008).

CONCLUSÕES

Foram identificados genes codificadores para Shiga toxinas e adesinas, isoladas de fezes de bezerros com sinais clínicos e sem sinais clínicos. Este estudo foi importante para descrever os patotipos e fatores de virulência que circulam em bezerros na região do Distrito Federal.

REFERÊNCIAS

AIDAR-UGRINOVICH, L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 115, n. 3, p. 297-306, 2007. ISSN 0168-1605.

ANDRADE, G. I. et al. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 7, p. 1783-1790, 2012. ISSN 0049-4747.

BLANCHARD, P. C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 28, n. 3, p. 443-64, Nov 2012. ISSN 0749-0720.

BLANCO, M. et al. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **Vet Microbiol**, v. 54, n. 3-4, p. 309-19, Mar 1997. ISSN 0378-1135 (Print)

0378-1135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100331> >.

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical animal health and production**, v. 47, n. 1, p. 3-11, 2015. ISSN 0049-4747.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in calves: an update. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014. ISSN 0100-736X.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 822-80, Oct 2013. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811233/pdf/zcm822.pdf> >.

FERREIRA, M. R. A. et al. Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. **Tropical animal health and production**, v. 46, n. 4, p. 635-639, 2014. ISSN 0049-4747.

GÜLER, L.; GÜNDÜZ, K.; OK, Ü. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolated from calves in Turkey. **Zoonoses and public health**, v. 55, n. 5, p. 249-257, 2008. ISSN 1863-2378.

KONEMAN, E. W. et al. **Koneman Diagnostico microbiologico: texto e atlas colorido**: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008.

LEOMIL, L. et al. Frequency of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary microbiology**, v. 97, n. 1, p. 103-109, 2003. ISSN 0378-1135.

NGUYEN, T. D.; VO, T. T.; VU-KHAC, H. Virulence factors in Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Vietnam. **J Vet Sci**, v. 12, n. 2, p. 159-64, Jun 2011. ISSN 1229-845x.

OLIVEIRA, S. J. Microbiologia veterinária. **Guia bacteriológico prático**, v. 2, p. 237, 2000.

PICCO, N. Y. et al. Molecular screening of pathogenic Escherichia coli strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. **Revista argentina de microbiología**, v. 47, n. 2, p. 95-102, 2015. ISSN 0325-7541.

POURTAGHI, H.; DAHPAHLAVAN, V.; MOMTAZ, H. Virulence genes in Escherichia coli isolated from calves with diarrhoea in Iran. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 3, p. 513-515, 2013. ISSN 1618-5641.

QUINN, P. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005. ISBN 853630927X.

RIGOBELLO, E. et al. Virulence factors of Escherichia coli isolated from diarrheic calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 305-310, 2006. ISSN 0102-0935.

SALVADORI, M. R. et al. Virulence factors of Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 230-235, 2003. ISSN 1517-8382.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. Atheneu, 2004. ISBN 8573796812.

WIELER, L. et al. Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2980-2984, 1996. ISSN 0095-1137.