

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**ESTUDO LONGITUDINAL PROSPECTIVO DA
INCIDÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS EM BEZERRAS
EM UMA PROPRIEDADE LEITEIRA**

FERNANDA MORCATTI COURA

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2011**

Fernanda Morcatti Coura

ESTUDO LONGITUDINAL PROSPECTIVO DA INCIDÊNCIA DE
ENTEROPATÓGENOS EM BEZERRAS EM UMA PROPRIEDADE LEITEIRA

Dissertação apresentada a Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção de grau em Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2011

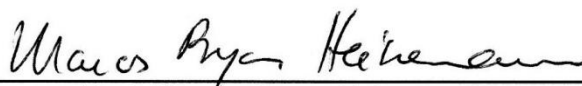
C858e Coura, Fernanda Morcatti, 1986-
Estudo Longitudinal prospectivo da incidência de enteropatógenos em bezerras em uma propriedade leiteira / Fernanda Morcatti Coura. – 2011.
49 p. : il.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

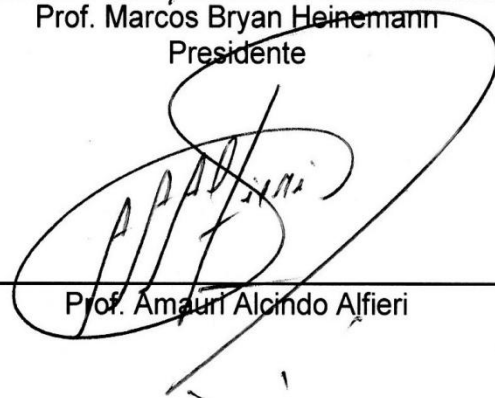
1. Bezerra – Doenças – Teses. 2. Diarréia em bezerras – Teses. 3. Rotavírus – Identificação – Teses. I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 089 693

Dissertação defendida e aprovada em 03 de agosto de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Marcos Bryan Heinemann
Presidente



Prof. Amauri Alcindo Alfieri



Prof. Elias Jorge Facury Filho

*Dedico esse trabalho
Aos meus pais, irmãos,
Namorado, mestres e
A todos os animais*

*“Comece fazendo o que é necessário,
Depois o que é possível, e de repente
Você estará fazendo o impossível”*

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre em minha vida, iluminando o meu caminho e me protegendo.

À minha mãe, Lucy, pela torcida e amor incondicional.

Ao meu pai, Fernando, pelo exemplo e compreensão.

Aos meus irmãos, Luciana e Rafael, pelo apoio e companheirismo.

Ao meu namorado, Peterson, pela presença constante e cumplicidade.

Ao meu orientador, Prof. Marcos Bryan Heinemann, pela oportunidade, paciência, sabedoria e amizade.

Aos professores Andrey, Amauri, Marcos Xavier, Lobão e Último, que permitiram a execução do experimento e acreditaram no meu potencial.

Às amigas Cristina, Perla, Camila e Damiana, companheiras e confidentes

Aos colegas de curso e amigos dos laboratórios, pelos momentos e conhecimentos compartilhados, amizade e torcida.

Aos funcionários do DMVP/EV/UFMG, pelos conselhos e apoio, em especial, à Grazi, que além participar do experimento, sempre esteve presente, com seu bom humor e palavras de incentivo, e ao André, que me ensinou muito sobre enterobactérias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e a Fapemig, pelo apoio recebido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS	7
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
1- INTRODUÇÃO.....	11
2- BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	11
2.1- Rotavírus bovino	11
2.2- Coronavírus bovino	14
2.3- <i>Salmonella</i> spp.	16
2.4- <i>Escherichia coli</i>	18
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1- Local e período	21
3.2- Manejo das bezerras na propriedade	22
3.3- Animais e coleta das amostras.....	23
3.4- Pesquisa dos enteropatógenos	23
3.5- Análise estatística	27
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5- CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
6- CONCLUSÕES.....	40
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Incidência de diarreia ao longo das nove semanas de vida em bezerras leiteiras (n=67) criadas em uma propriedade localizada em Martinho Campos – MG (2008) e sua associação com a idade pelo teste do χ^2	27
---	----

Gráfico 2: Incidência de rotavírus do grupo A ao longo das nove semanas de idade em bezerras leiteiras (n=67) com e sem diarreia criadas em uma propriedade localizada em Martinho Campos – MG (2008).....	28
Gráfico 3: Incidência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerras ao longo das nove semanas de idade e sua associação com a idade pelo teste do χ^2 . Martinho Campos – MG (2008).....	30
Gráfico 4: Incidência de coronavírus bovino ao longo das nove semanas de idade em bezerras leiteiras com e sem diarreia criadas em uma propriedade localizada em Martinho Campos – MG (2008).....	32
Gráfico 5: Incidência de coronavírus bovino em fezes diarréicas de bezerras ao longo das nove semanas de idade e sua associação com a idade pelo teste do χ^2 . Martinho Campos – MG (2008).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Dados meteorológicos médios durante o período experimental (junho a outubro de 2008).....	22
Tabela 2: Iniciadores usados na PCR multiplex para identificação dos genes de virulência de <i>E. coli</i> e tamanho do produto amplificado, em pares de bases, para cada gene.....	24
Tabela 3: Número de amostras fecais positivas para rotavírus e as idades média, mínima, máxima, mediana e intervalo de confiança, mensuradas em dias, em bezerras com idades entre 0 e 67 dias, com e sem diarreia. Martinho Campos – MG (2008).....	29
Tabela 4: Número de amostras fecais positivas para coronavírus e as idades média, mínima, máxima, mediana e intervalo de confiança, mensuradas em dias, em bezerras com idades entre 0 e 67 dias, com e sem diarreia. Martinho Campos – MG (2008).....	32
Tabela 5: Genes de virulência pesquisados em <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras fecais coletadas (n=850) de bezerras leiteiras (n=67) com 0 a 67 dias de idade, número de animais infectados com e sem diarreia, e as idades média, máxima, mínima, mediana e intervalo de confiança, mensuradas em dias. Martinho Campos – MG (2008).....	36
Tabela 6: Idade (semanas de idade) das bezerras leiteiras positivas para os genes de virulência pesquisados em <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras fecais normais e diarréicas e o número de bezerras positivas. Martinho Campos – MG (2008).....	38
Tabela 7: Enteropatógenos detectados em associação nas amostras fecais coletadas de bezerras leiteiras com e sem diarreia, número de amostras fecais positivas totais e diarréicas. Martinho Campos – MG (2008).....	39

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo descrever a incidência de rotavírus do grupo A (RV-A), coronavírus bovino (BCoV), *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreiogênica em um estudo observacional longitudinal prospectivo. Foram coletadas 850 amostras fecais provenientes de 67 bezerras leiteiras de uma propriedade localizada no município de Martinho Campos/MG. Os animais foram acompanhados do nascimento até no mínimo 60 dias de idade. Para a detecção de BCoV, utilizou-se uma semi nested-RT-PCR e, para detecção de RV-A, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Os fatores de virulência de *Escherichia coli* foram identificados por meio da técnica de PCR multiplex utilizando pares de primers destinados à detecção dos genes codificadores para *K99*, *F41*, intimina (*eae*), toxina Shiga 1 e 2 (*Stx1* e *Stx2*, respectivamente) e toxina termo-estável a (*STa*). A identificação de *Salmonella* spp. foi realizada por meio de testes bioquímicos e sorotipagem das amostras no IOC/FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ). A primeira e a segunda semanas de vida concentraram o maior número dos casos de diarreia, sendo a segunda o período de maior incidência. Após as duas primeiras semanas de vida, os casos de diarreia diminuíram progressivamente. Verificou-se diferença significativa pela análise do χ^2 entre a frequência de diarreia e a presença de rotavírus ($p < 0,0001$), indicando maior probabilidade de detectar o vírus nas fezes de animais com diarreia. O rotavírus bovino do grupo A foi identificado em 49 amostras fecais coletadas de 15 animais sem diarreia e 23 diarréicos. As três primeiras semanas concentraram o maior número de casos, sendo que há uma tendência de ocorrer mais na terceira semana de vida. O BCoV foi encontrado em 93 amostras de fezes provenientes de 46 animais. Observou-se maior concentração dos casos em animais com duas e três semanas de idade, com tendência a diminuir com o avanço da idade. Dos isolados de *Salmonella* spp, dezessete colônias foram sorotipadas pela FIOCRUZ, das quais duas eram *Salmonella* Enteritidis, 14 *Salmonella* Agona e uma *Salmonella enterica* subsp. Enterica (0:4,5, estrutura flagelar não detectável). Somente um animal positivo apresentou diarreia, aos sete dias de idade, pelo sorotipo Agona. A idade média de infecção dos animais sem diarreia foi de 25 dias (Mínimo 1 dia; Máximo 62 dias), mediana 26,5 dias. Em todas as fezes pesquisadas, pelo menos uma colônia *Escherichia coli* foi isolada e identificada por testes bioquímicos. Das 850 amostras fecais, sete foram positivas para intimina (*eae*), sete para *K99/STa*, sete para *Stx1*, 36 para *Stx1/Intimina*, duas para *Stx1/Stx2/Intimina*, 43 para *Stx2* e uma para *Stx2/Intimina*.

Palavras-chaves: diarreia, bezerros, enteropatógenos, rotavírus, coronavírus, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the frequency of group A rotavirus (RV-A), bovine coronavirus (BCoV), *Salmonella* spp. and diarrheagenic *Escherichia coli*. Eight hundred and fifty fecal samples were collected from 67 calves at a farm in the city of Martinho Campos/MG. The animals were followed from birth to at least 60 days old. For detection of BCoV, a semi-nested RT-PCR was used and for detection of RV-A the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique was performed. Virulence factors of *Escherichia coli* were identified by multiplex PCR using primer pairs designed to detect the genes for *K99*, *F41*, intimin (*eae*), Shiga toxin 1 and 2 (*Stx1* and *Stx2*, respectively) and heat-stable toxin a (*STa*). The identification of *Salmonella* spp. was performed by biochemical tests and serotyping of the strains in IOC / FIOCRUZ (Rio de Janeiro-RJ). The first and second weeks of life concentrated the greatest number of cases of diarrhea, being the latter the highest incidence. After the first two weeks of life, cases of diarrhea decreased progressively. There was a significant difference by analysis of χ^2 between the frequency of diarrhea and the presence of rotavirus ($p < 0.0001$), indicating a higher probability of detecting the virus in the feces of animals with diarrhea. The bovine group A rotavirus was identified in 49 fecal samples collected from 23 and 15 animals with and without diarrhea, respectively. The first three weeks concentrated the highest number of cases, with tendency to occur more in the third week of life. Bovine coronavirus was found in 93 stool samples from 46 animals. There was a greater concentration of cases in animals with two and three weeks old, with a tendency to decrease with age. Seventeen colonies of *Salmonella* spp. were serotyped by FIOCRUZ, two of which were *Salmonella* Enteritidis, 14 *Salmonella* Agona and one *Salmonella* enterica subsp. Enterica (0:4,5, flagellar structure not detectable). Only one positive animal had diarrhea with seven days of age and serotype Agona was isolated. The average age of infection without diarrhea was 25 days (minimum 1 day; maximum 62 days). At least one *E. coli* colony was isolated and identified by biochemical tests in all the stool samples. Of the 850 fecal samples, seven were positive for intimin (*eae*), seven for *K99/STa*, seven for *Stx1*, 36 for *Stx1/Intimin*, two for *Stx1/Stx2/Intimin*, 43 for *Stx2* and one for *Stx2/Intimin*.

Keywords: diarrhea, calves, enteropathogens, rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.

1- INTRODUÇÃO

A diarreia é uma das doenças mais frequentes de bezerros com até 30 dias de idade e é uma importante causa de perdas econômicas. Sua etiologia é complexa e envolve a interação de diversos fatores infecciosos, nutricionais, imunológicos, gerenciais e ambientais. Os principais sinais clínicos são a diarreia, desidratação progressiva, acidose metabólica, desequilíbrio de eletrólitos e balanço energético negativo com ou sem hipoglicemia, que se não tratados, levam a morte do animal. Os principais enteropatógenos envolvidos na síndrome diarreica são rotavírus, coronavírus, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Cryptosporidium* spp. Esses patógenos causam diarreia por três mecanismos principais: diarreia secretória, atrofia das vilosidades/má absorção/diarreia osmótica e diarreia inflamatória. Além disso, mais de um agente etiológico pode ser encontrado em casos de diarreia, com vários mecanismos envolvidos na patofisiologia.

A diarreia secretória é caracterizada por um aumento da secreção intestinal. Um exemplo é a diarreia causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica, produtora de uma enterotoxina que altera a concentração de sinalizadores intracelulares, alterando o transporte de íons e água, sem alteração da integridade da mucosa.

A diarreia inflamatória é típica de *Salmonella* spp., que invade a mucosa intestinal e causa inflamação, estimulando a secreção de eletrólitos e fluido, podendo haver atrofia de vilosidades. Os vírus e o *Cryptosporidium* spp., destroem as vilosidades intestinais, resultando em sua atrofia e má digestão/má absorção dos nutrientes e da água. A presença de nutrientes não absorvidos no

lúmen intestinal tem um efeito osmótico, retendo água no intestino.

Diversos fatores de risco estão associados à incidência de diarreia. A distribuição e ocorrência dos enteropatógenos nas fezes de bezerros saudáveis e diarreicos variam e certos fatores epidemiológicos podem influenciar a prevalência dos agentes causadores de diarreia.

A maioria dos dados a respeito dos agentes causadores de diarreia em bezerros no Brasil é sobre um ou outro agente, sem abordá-los em conjunto. Além disso, trabalhos longitudinais e em condições de campo são raros.

Devido à importância e a complexidade da etiologia da diarreia neonatal dos bovinos, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo longitudinal prospectivo para determinar a incidência de rotavírus do grupo A, coronavírus bovino, *Salmonella* spp. e patótipos de *Escherichia coli* e identificar associações entre a presença dos agentes etiológicos e da diarreia.

2- BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1- Rotavírus bovino

O gênero *Rotavirus* pertence à família *Reoviridae*. Os vírus desse gênero são icosaédricos, não envelopados e possuem um genoma viral formado por 11 segmentos de RNA fita dupla monocistrônicos, com exceção do gene 11, que codifica duas proteínas. Além das seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7), o genoma do rotavírus também codifica seis proteínas não estruturais (NS1-6). Os segmentos do genoma podem ser

diferenciados pelo tamanho por eletroforese em gel e estes eletroferotipos padrões são usados para caracterizar isolados (Saif, 2011b).

Os rotavírus podem ser classificados em sete sorogrupos (A-G) e em sorotipos, de acordo com as proteínas VP4 (tipo P) e VP7 (tipo G) (Estes e Kapikian, 2007). Rotavírus do grupo A é o grupo mais frequentemente associado com diarreia em bezerros (Tzipori, 1985; Holland, 1990; Radostits et al., 2007).

Os rotavírus e o coronavírus constituem a principal causa viral de diarreia em bezerros (Torres-Medina et al., 1985; Tzipori, 1985; Foster e Smith, 2009). A sua associação com a doença foi descrita pela primeira vez por Mebus e colaboradores em 1969 (Mebus et al., 1969). Diversos fatores influenciam a infecção pelo rotavírus e a sua gravidade clínica, tais como a virulência da estirpe viral, idade do animal, estado imunológico da mãe, absorção de imunoglobulinas colostrais, temperatura do ambiente, grau de exposição viral, desmame e presença de outros enteropatógenos (Radostits et al., 2007).

Os bezerros se infectam após a ingestão de vírus presente no ambiente contaminado por fezes (Torres-Medina et al., 1985; Foster e Smith, 2009). Tipicamente afetam animais até três semanas de idade, com pico de incidência aos seis dias, porém animais mais velhos também podem se infectar (Torres-Medina et al., 1985; Foster e Smith, 2009; Naylor, 2009). Bezerros assintomáticos podem excretar o vírus nas fezes (Tzipori, 1981, Radostits et al., 2007). Os principais sinais clínicos são depressão, anorexia e diarreia, que pode resultar em desidratação (Tzipori, 1981). Grande parte das infecções por rotavírus são brandas e auto-limitantes, embora a morbidade seja alta (Holland, 1990).

Os rotavírus infectam enterócitos maduros da superfície das vilosidades intestinais, iniciando na parte proximal do intestino delgado e progredindo até o seu final. Os enterócitos são destruídos e as vilosidades danificadas tornam-se atrofiadas e cobertas por células epiteliais imaturas que migram das criptas e que não estão preparadas para as funções de digestão e absorção, resultando em acúmulo de líquido no lúmen intestinal e causando má digestão e má absorção. A lactose se acumula no intestino grosso e é fermentada por bactérias colônicas, produzindo D-ácido lático e L-ácido lático, causando um efeito osmótico e contribuindo para a diarreia. O D-ácido lático é pouco metabolizado e resulta em acidemia. Mecanismos adicionais da diarreia por rotavírus têm sido propostos. Estes incluem efeitos induzidos pela enterotoxina viral NSP4 e estimulação de neurotransmissores, ambos relacionados à ativação das vias secretoras (Holland, 1990; Morris e Estes, 2001; Naylor, 2009; Saif, 2011b).

O tratamento da infecção por rotavírus baseia-se somente na reidratação dos animais acometidos, já que não existem medicamentos específicos contra esse agente. A vacinação da vaca preta e o fornecimento adequado de colostro são a melhor forma de prevenção, assim como higiene, ambiente de criação e densidade adequados (Foster e Smith, 2009).

Barbosa et al. (1998) estudaram a frequência de rotavírus do grupo A em 194 amostras de fezes de bezerros com idades entre 2 e 60 dias, sendo 103 diarréicas, provenientes de 33 propriedades da bacia leiteira de Pará de Minas (MG). Utilizando um teste de ELISA direto, encontraram 17% de amostras positivas para rotavírus, das quais 60,6% eram diarréicas. A maioria dos animais positivos (64%) estava na faixa etária entre 31 a 60 dias de idade. Maior

frequência de diarreia foi encontrada entre os bezerros infectados por rotavírus, sendo que a totalidade dos bezerros infectados até 28 dias de idade apresentavam diarreia. Em 3,6% das amostras foi encontrado rotavírus em associação com *Cryptosporidium* spp.

Foi realizado um estudo para determinar a ocorrência de infecção por rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros pertencentes a nove propriedades rurais, situadas em seis municípios da região nordeste do Estado de São Paulo. Foram analisadas 375 amostras de fezes de bezerros, na faixa etária 1 a 45 dias, sendo que 193 pertenciam a animais com diarreia e 182 foram obtidas de animais clinicamente saudáveis. As técnicas utilizadas para a detecção de rotavírus foram o ensaio imunoenzimático (*kit* EIARA) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Por meio do EIARA foram detectadas 42 de amostras positivas, 29 de animais com diarreia e 13 sem diarreia. Pela EPGA, foram detectadas 27 amostras positivas para rotavírus do grupo A, sendo 20 pertencentes a animais com diarreia, e sete de animais sem diarreia (Buzinaro et al., 2000).

Amostras fecais de 203 bezerros com diarreia e idade inferior a 30 dias, provenientes de 12 propriedades de diferentes regiões do estado de São Paulo, foram coletadas para a pesquisa de alguns enteropatógenos. Por meio de um teste de ELISA, rotavírus foi detectado em 25,1% das amostras e em associação com *Cryptosporidium* spp. em 17,7%. *Escherichia coli* enterotoxigênica (STa/K99 positivas) não foi detectada (Langoni et al., 2004).

A frequência de rotavírus bovino do grupo A em bezerros com idades entre 1 a 90 dias nos anos de 1998 a 2002 foi determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em 2177 amostras de fezes,

das quais 1.898 eram diarréicas e 279 eram de consistência normal, provenientes de rebanhos de corte e de leite, em sete estados e quatro regiões geográficas brasileiras (sul, sudeste, oeste, centro e norte). O rotavírus do grupo A foi detectado em 19,4% das amostras fecais coletadas de bezerros com diarreia e em apenas 2,2% das fezes com consistência normal. A maior frequência de rotavírus nas amostras diarréicas ocorreu em animais com até um mês de idade (26%), sendo pouco detectado em animais com mais de 30 dias (Alfieri et al., 2006).

Na Espanha, amostras fecais de 218 animais com diarreia até 30 dias de idade, provenientes de 65 propriedades leiteiras, foram examinadas para determinar a prevalência do rotavírus e sua associação com outros patógenos intestinais (coronavírus, *E. coli* K99, *Cryptosporidium* spp. e *Salmonella* spp.). A pesquisa do rotavírus foi feita através de EPGA e dos outros agentes através de *kit* Elisa comercial, com exceção da *Salmonella* spp., que foi isolada através de meios de enriquecimento seletivos. O rotavírus foi detectado em 54 amostras, estando associado ao coronavírus em 11 amostras (20,4%), ao *Cryptosporidium* spp. em 46 (85,2%), *E. coli* K99 em nove (16,7%) e *Salmonella* spp. em uma amostra (1,8%). A idade média de infecção por rotavírus foi de 12,9 dias (1 a 30 dias) (García et al., 2000).

Na Argentina, Garaicoechea et al. (2006) encontraram uma prevalência de 42,0% de rotavírose em bezerros com diarreia. No total, 1581 amostras de fezes foram coletadas, correspondente a 400 casos de diarreia, e o agente foi isolado em 62,5% do total de casos analisados nos 10 anos de pesquisa. Na Turquia, determinaram-se os enteropatógenos mais comuns em 82 bezerros entre dois e 30 dias de idade com diarreia e 18 normais. Através de ELISA,

determinou-se prevalência de rotavírus (18,2%), coronavírus (13,4%) e *E. coli* K99 (13,4%). Rotavírus e coronavírus foram identificados somente em amostras diarréicas. Em 3,6% das amostras, foi encontrado infecção concomitante com rotavírus e coronavírus (Ok et al., 2009).

Na Holanda, Bartels et al. (2010) pesquisaram cinco enteropatógenos (*Escherichia coli* K99, coronavírus, rotavírus, *Cryptosporidium parvum*, *Clostridium perfringens*) de 424 bezerros com até 22 dias de idade provenientes de 108 propriedades leiteiras. A prevalência de rotavírus foi 17,7%, a maioria de animais com diarreia e com 8-14 dias de idade.

Um estudo foi realizado na Austrália para a detecção e caracterização de rotavírus em bezerros. Setenta e duas amostras fecais de bezerros com diarreia e 28 sem diarreia foram coletadas. Utilizando um teste imunoenzimático (EIA), o rotavírus foi encontrado em 26 amostras, sendo 22 de animais diarréicos e quatro de assintomáticos (Swiatek et al., 2010).

2.2- Coronavírus bovino

A infecção por coronavírus é uma importante causa de diarreia neonatal (Tzipori, 1981; Torres-Medina et al., 1985; Naylor, 2009). Os coronavírus pertencem à ordem *Nidovirales*, à família *Coronaviridae* e ao gênero *Coronavirus*. São vírus envelopados com 80-220 nm, pleomórficos, na maioria das vezes esféricos, com o genoma constituído por uma molécula linear simples de RNA, sentido positivo e com 27,6 a 31 Kb de tamanho (Saif, 2011a).

O gênero *Coronavirus* é dividido em três grupos distintos, baseado em propriedades genéticas e sorológicas. O coronavírus

bovino (BCoV) pertence ao grupo 2 e está associado a três síndromes clínicas nos bovinos: a diarreia em bezerros, a diarreia de inverno em adultos e a infecção respiratória em animais de várias idades (Saif, 2011a). Coronavírus foi reportado como causa de diarreia em bezerros, pela primeira vez, nos Estados Unidos em 1973, por Mebus e colaboradores (Mebus et al., 1973).

A infecção por BCoV se inicia no intestino delgado proximal, podendo espalhar por todo o intestino delgado e grosso. As células infectadas morrem, desprendem-se e são substituídas por células imaturas. No intestino delgado, essas alterações resultam em encurtamento e fusão das vilosidades adjacentes, e no intestino grosso, levam a atrofia das criptas do cólon, causando diarreia má absorptiva e má digestiva. A capacidade de absorção do intestino é severamente diminuída pela perda da área absorptiva e pela presença de células imaturas. Essas células retêm parte de sua atividade secretora que leva a um aumento no volume de líquido no lúmen intestinal. Ao mesmo tempo, as células imaturas não são capazes de secretar enzimas digestivas, diminuindo a capacidade digestiva do intestino. Lactose não digerida acumula-se no lúmen intestinal, levando a um aumento na atividade microbiana e ao desequilíbrio osmótico que atrai mais água para o intestino, agravando a perda de água e eletrólitos. Em infecções graves, a diarreia pode levar a acidose, desidratação e hipoglicemia, e a morte pode ocorrer devido ao choque agudo e insuficiência cardíaca (Torres-Medina et al., 1985; Clark, 1993).

O BCoV pode ser detectado em animais saudáveis e com diarreia (Radostits et al., 2007; Boileau e Kapil, 2010). A diarreia causada por coronavírus é mais grave que a por rotavírus. Em geral, o coronavírus acomete bezerros com menos de três

semanas de idade, mas pode ocorrer em animais mais velhos (Torres-Medina et al., 1985; Radostits et al., 2007). A severidade da diarreia depende da idade do animal, da sua condição imunológica, da dose infectante e da virulência da estirpe (Torres-Medina et al., 1985; Clark, 1993; Radostits et al., 2007; Boileau e Kapil, 2010). Em casos de co-infecções com outros enteropatógenos, a diarreia pode ser agravada (Saif, 2011a).

Estudos sorológicos apontam uma prevalência de anticorpos séricos de até 100% de positividade para coronavírus em bovinos adultos de corte e leite (Barrington et al., 2002)

Como na diarreia por rotavírus, não existem métodos específicos de tratamento para diarreia causada por coronavírus e poucos estudos têm sido conduzidos para confirmar as medidas de controle específicas para esse agente em bezerros. Soluções eletrolíticas orais devem ser administradas para tratar a desidratação e acidose. Métodos que visam o controle das infecções por rotavírus, como habitação adequada e higiene, colostragem eficiente e a vacinação da vaca seca, também são as melhores medidas para o controle de coronavírus (Foster e Smith, 2009).

A frequência de infecção por BCoV varia entre as diferentes regiões geográficas, os tipos de criação (leite ou corte) e as técnicas de diagnóstico utilizadas. No Brasil, poucos estudos foram realizados para se detectar a ocorrência do coronavírus nas fezes de bezerros (Barry et al., 2009).

Jerez et al. (2002) estudaram a ocorrência de rotavírus e coronavírus em 72 amostras fecais de bezerros com diarreia, entre um e 37 dias de idade, provenientes de 16 propriedades de criação de gado leiteiro no estado de São Paulo, utilizando como

provas diagnósticas a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e hemaglutinação (HA) / inibição da hemaglutinação (HI), respectivamente para rotavírus e coronavírus. Das 72 amostras, 28 (39%) apresentaram-se positivas para coronavírus, em animais desde um dia de vida até 31 dias. Em uma propriedade foi detectada co-infecção de rotavírus e coronavírus em dois bezerros. Rotavírus do grupo A foi detectado em 14% das amostras, provenientes de animais entre sete e 30 dias de idade. Em 50% das amostras nenhum dos dois vírus estudados foram detectados.

Oliveira Filho et al. (2007) coletaram 100 amostras fecais diarréicas e 30 amostras não diarréicas (grupo controle), de bezerros Nelore com até nove semanas de idade com o objetivo de detectar os enteropatógenos *Salmonella* spp., *Escherichia coli* K99, rotavírus, coronavírus, *Cryptosporidium* spp. e ovos de helmintos. Enteropatógenos foram detectados em 79,0% das amostras diarréicas e em 70,0% das amostras não-diarréicas. *Salmonella* spp. e ovos de estrongilídeos não foram encontrados nos dois grupos avaliados. Rotavírus foi detectado em 11% dos animais com diarreia, não sendo identificado no grupo controle. No grupo de bezerros com diarreia, *E. coli* foi detectada em 69,0% das amostras, *Cryptosporidium* spp. em 30,0% e coronavírus em 16,0%. No grupo controle, *E. coli*, *Cryptosporidium* spp. e coronavírus foram detectados, respectivamente, em 66,7%, 10,0% e 3,3% das amostras. A fímbria K99 foi identificada exclusivamente nas linhagens de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia (5,8%), representando 4% do total de amostras estudadas. As associações de enteropatógenos detectadas foram entre rotavírus e coronavírus, rotavírus e *Cryptosporidium* spp. e coronavírus e *Cryptosporidium* spp.

Em uma pesquisa desenvolvida por Takiuchi et al. (2006), com o objetivo de desenvolver e avaliar um semi-nested PCR (SN-PCR) para amplificar um fragmento de 251 pb do gene N BCoV, amostras fecais de 50 bezerros diarreicos com até 30 dias de idade foram coletadas e a frequência do vírus foi de 24% (12/50).

Stipp et al. (2009) pesquisaram a ocorrência de infecção por BCoV em bezerros leiteiros e de corte em quatro estados brasileiros. Um total de 282 amostras de fezes de bezerros entre um e 60 dias de idade foram avaliados quanto à presença de BCoV por um semi-nested (SN) PCR. BCoV foi detectado em 15,6% (44/282) das amostras fecais examinadas, das quais 95,4% (42/44) eram de animais com diarreia e 4,6% (2/44) de assintomáticos. Em todas as faixas etárias pelo menos uma amostra foi positiva, porém a faixa etária 16-30 dias de idade foi a com maior frequência quando comparada às outras.

Gulliksen et al. (2009) estimaram a prevalência de alguns enteropatógenos na Noruega. Fezes de 191 bezerros com diarreia foram avaliados para a presença de rotavírus do grupo A, coronavírus bovino, *Cryptosporidium* e *E. coli* F5 por um teste de ELISA. Rotavírus foi detectado em 9,9% das amostras, *E. coli* F5 em 2,6% e BCoV não foi detectado em nenhuma amostra. Em uma pesquisa realizada na Holanda, a prevalência do coronavírus bovino foi de 3,1%. O agente foi encontrado em fezes de bezerros saudáveis e com diarreia e em todas as três faixas etárias estudadas (1-7, 8-14, 15-21), sendo que a faixa etária 8-14 compreendeu o maior número de animais positivos (Bartels et al. 2010). Em um estudo realizado por Mayameei et al. (2010) no Irã utilizando um ELISA para detecção de rotavírus e coronavírus bovinos em fezes de bezerros com e sem diarreia, a frequência da infecção por coronavírus foi

de 3,17% nos animais com diarreia e 2,96% nos assintomáticos. Não houve relação significativa entre infecção e doença e animais na segunda e terceira semanas de vida foram os mais infectados.

2.3- *Salmonella* spp.

As infecções por *Salmonella* spp. são uma importante causa de mortalidade e morbidade em bovinos (Wray e Davies, 2000). Existem mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* spp., e as manifestações clínicas incluem diarreia, desidratação, aborto, pneumonia, apatia, artrite séptica, meningite, gangrena das extremidades e morte súbita (Mohler e House, 2009).

Baseado na patogênese e biologia da infecção, os sorotipos de *Salmonella* spp. estão associados a três tipos de infecção. Um pequeno número de sorotipos é capaz de causar infecção sistêmica em diferentes espécies de animais. O segundo grupo de sorotipos está associado à infecção sistêmica envolvendo o trato reprodutivo dos animais quando estão prenhes, podendo também estar associados a enterites em animais jovens e a uma multiplicação sistêmica maior. A maior parte dos sorotipos não causa doença sistêmica, mas tem a capacidade de colonizar o intestino de diversos animais e causar enterite (Barrow et al., 2010).

Alguns sorotipos, como a S. Dublin, são hospedeiro adaptados, com tendência a causar infecção crônica em bovinos, porém a maioria dos sorotipos não é espécie-específica e pode infectar várias espécies de animais (Mohler et al., 2009).

A *Salmonella* spp. é um importante agente causador de diarreia em bezerros (Tzipori, 1985; Barrington et al. 2002). Vários

sorotipos podem infectar esses animais, porém os sorotipos Dublin e Typhimurium são os mais frequentemente isolados (Richardson, 1974; Lax, Barrow e Jones, 1995; Wray e Davies, 2000; Barrow et al., 2010). A diferença entre a doença causada pela *S. Dublin* e *S. Typhimurium* é a tendência da primeira acometer animais mais velhos e de persistir neles, criando um significativo número de animais portadores. Estes podem excretar as bactérias de forma constante ou intermitente nas fezes ou, ainda, se tornarem portadores latentes, onde a infecção persiste nos linfonodos ou tonsilas, sem que haja detecção em amostras fecais (Hunter et al., 1976; Wray e Davies, 2000). A distribuição desses sorotipos é diferente entre os países (Wray e Davies, 2000; Barrow et al., 2010).

A doença nos bezerros é mais comum depois da primeira semana de vida e os sinais clínicos são observados, com frequência, em animais com duas a seis semanas de idade. Os sinais incluem febre alta, apatia, perda de apetite e diarreia, que pode conter muco, fibrina e sangue (Wray e Davies, 2000; Barrow et al., 2010).

A infecção por *Salmonella* pode ocorrer via oral e por aerossol. A exposição pode ocorrer via colostro ou leite, superfície dos tetos e úbere contaminados, tratadores, equipamentos e ambiente (House e Smith, 1998). Após ingestão da bactéria, esta chega ao intestino e interage com a mucosa. A *Salmonella* spp. se liga ao enterócito e o invade, causando uma resposta inflamatória à infecção, com aumento da secreção intestinal, atrofia e necrose, principalmente, na parte final do intestino delgado e intestino grosso (Rings, 1985; Barrow et al., 2010). A *Salmonella* Typhimurium requer a participação do sistema de secreção tipo III codificado pela ilha de patogenicidade 1 (SPI1) para causar diarreia em bezerros. Esta região está

relacionada à invasão e translocação de proteínas efetoras nas células do hospedeiro (Zhang et al., 2002).

A severidade e duração dos sinais clínicos se relacionam com a higiene do local, manejo de criação, virulência da estirpe, dose infectante, eficiência da imunidade passiva, genética, doenças concomitantes, nutrição e presença de fatores estressantes (Wray e Davies, 2000; Mohler et al., 2009). A idade influencia muito a susceptibilidade do animal a infecção, normalmente animais mais jovens são mais susceptíveis (Barrow et al., 2010).

O diagnóstico da salmonelose é realizado por meio do isolamento do agente em fezes ou tecidos contaminados, utilizando diversos meios com enriquecimento seletivos (House e Smith, 1998). Existem outros métodos de diagnóstico, porém o problema não é detectar ou isolar a bactéria, mas associar a presença do agente com a doença, já que a *Salmonella* spp. pode ser encontrada nas fezes de animais saudáveis (House e Smith, 1998; Mohler et al., 2009).

Mendonça et al. (1996) pesquisaram *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Salmonella* spp. em 106 bezerros criados na região agreste do estado de Pernambuco. As amostras foram cultivadas em meio seletivo e submetidas à identificação bioquímica. Foi encontrada frequência de 4,7% de animais positivos para *Salmonella* sorovares Dublin, Muechen e Infantis.

Ambrosim et al. (2002) coletaram amostras fecais de 266 bezerros com e sem diarreia, idade até 90 dias, provenientes de 15 propriedades leiteiras da região nordeste do estado de São Paulo, com o objetivo de determinar a frequência de enteropatógenos, dentre eles *Salmonella* spp e *Escherichia coli* enterotoxigênica. *Salmonella* de sorotipos diferentes foi

encontrada em 2,63% das amostras. *Escherichia coli* enterotoxigênica (K99/STa positivas) foi isolada das fezes de animais doentes (23,3%) e saudáveis (15,4%). A fímbria F41 não foi detectada em nenhum isolado e dois isolados foram positivos para K99 somente.

Pereira et al. (2004) analisaram 204 amostras de fezes de bezerros com diarreia de raças leiteiras, com 20 a 90 dias, na região de Ribeirão Preto, SP, com o objetivo de estudar a frequência de *Salmonella* e outros enteropatógenos. As amostras foram semeadas em caldo selenito, incubadas e semeadas em ágar BEM (eosina-azul de metileno) e ágar MacConkey. As colônias suspeitas foram identificadas por meio de testes bioquímicos. Sete isolados de *Salmonella* sp. foram obtidos, sendo uma do sorotipo Dublin e seis do sorotipo Typhimurium. Todas as amostras de *Salmonella* spp. foram isoladas de animais com seis semanas de idade.

Langoni et al. (2004) analisaram 203 amostras fecais de bezerros com diarreia, idade inferior a 30 dias, de ambos os sexos e de diferentes propriedades do Estado de São Paulo. As amostras foram cultivadas em ágar acrescido de 10% de sangue bovino e em Ágar Levine. As placas foram incubadas por até 96 horas, em condições anaeróbicas, à temperatura de 37°C, seguido de provas bioquímicas. *Salmonella dublin* e *Salmonella typhimurium* foram isoladas em 5,4% e 6,1% das amostras examinadas, respectivamente.

Achá et al. (2004) investigaram a prevalência de *Salmonella* spp. e ETEC em Moçambique. Foram coletadas 330 amostras fecais de bezerros assintomáticos e 63 amostras de diarréicos. *Salmonella* spp. foi identificada em oito amostras, cinco normais e três diarréicas. Cinco sorotipos diferentes foram identificados. Nenhuma

amostra de ETEC foi encontrada, porém a fímbria K99 sozinha foi identificada em animais com e sem diarreia.

Em um estudo realizado no Egito, com o objetivo de detectar ETEC K99 e *Salmonella* spp., 220 amostras fecais foram coletadas de bezerros entre um e 30 dias de idade e com diarreia. *Salmonella* foi identificada em nove amostras, sete de animais com quatro semanas de idade e duas de animais com uma semana. ETEC K99 foi encontrada em 20 dos 193 isolados obtidos, todos de animais na primeira semana de vida (Younis et al., 2009).

2.4- *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, fermentativa, anaeróbia facultativa, que cresce bem em meios bacteriológicos simples, como o MacConkey. A maior parte das *E. coli* residentes no intestino são comensais, isto é, não são prejudiciais ao hospedeiro. Somente uma pequena parte é patogênica, e é classificada em patótipos baseando-se na produção de fatores de virulência e nos mecanismos pelos quais causam doença (Gyles e Fairbrother, 2010). A doença em bovinos jovens pode se apresentar como uma enfermidade intestinal (colibacilose entérica) com sinais de diarreia, desidratação, acidose e morte em poucas horas se não tratada, ou septicêmica, caracterizada como uma doença grave e com morte em poucas horas (Radostits et al., 2007).

Seis patótipos são capazes de causar diarreia em humanos e/ou animais: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli*

enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (Croxen e Finlay, 2010). Em bovinos, os principais patótipos associados a diarreia são ETEC, EPEC e STEC/EHEC (*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga/*Escherichia coli* enterohemorrágica).

ETEC é o patótipo mais comumente associado à diarreia em bezerros nos primeiros 3-4 dias de vida (Tzipori, 1985; Radostits et al., 2007; Foster e Smith, 2009). Porém, na presença de outros enteropatógenos, principalmente virais, animais mais velhos podem se infectar (Holland, 1990, Gyles e Fairbrother, 2010).

Após a ingestão, a ETEC se liga ao epitélio do intestino delgado utilizando suas fímbrias, permitindo sua multiplicação e colonização. As principais adesinas fimbriais de bezerros são a F5 e F41 e sabe-se que a primeira é expressa em ambientes com pH baixo, menos de 6,5, e é idade dependente, ou seja, a susceptibilidade diminui a partir das 12 horas de vida até duas semanas de idade. Uma vez estabelecida no intestino, a ETEC produz uma enterotoxina termo estável, a STa, que causa diarreia secretória, sem danos ao epitélio intestinal (Butler e Clark, 1994; Foster e Smith, 2009; Gyles e Fairbrother, 2010).

A doença é caracterizada por diarreia aquosa profusa. Na fase aguda da colibacilose, neonatos afetados tornam-se rapidamente desidratados. Como resultado, o animal afetado apresenta depressão do sistema nervoso central, fraqueza, temperatura normal ou mais alta e taquicardia ou bradicardia. Se o animal não é tratado, a morte ocorre por choque hipovolêmico e insuficiência cardíaca (Holland, 1990).

Vários fatores de risco influenciam a ocorrência da doença, como idade do

animal, condição imunológica, condições climáticas e higiene. Os animais infectados são os principais reservatórios de ETEC e suas fezes a principal fonte de contaminação do ambiente. A passagem da bactéria pelos animais proporciona efeito multiplicador, pois cada animal infectado excreta mais bactérias do que realmente ingeriu, principalmente os animais diarreicos. Os bezerros adquirem o microrganismo a partir de camas e baldes contaminados, bezerreiros sujos, diarreia dos outros animais, pastos de parição superpovoados, além de leite de vacas com mastite por coliformes e pele do períneo e úbere da mãe (Blood e Radostits, 1987; Radostits et al., 2007).

A *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) se refere a amostras de bactérias que produzem pelo menos uma das toxinas Shiga (Stx1, Stx2 e suas variantes) (Gyles, 2007). A Stx possui uma estrutura A1B5, onde a subunidade B é responsável pela ligação da toxina a célula alvo e a subunidade A pela quebra do RNA ribossomal, resultando em inibição da síntese protéica, o que é letal para a célula (Gyles, 2007; Gyles e Fairbrother, 2010). Algumas STEC além de produzirem Stx, possuem uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE), cujos genes codificam os elementos responsáveis pela lesão intestinal A/E (*attaching and effacing*), e por isso são denominadas *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (Kaper et al., 2004).

A lesão A/E é caracterizada por uma adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, resultando em alterações no citoesqueleto, como acumulação de actina polimerizada logo abaixo da ligação da bactéria à célula. As microvilosidades do intestino se degeneram e estruturas semelhantes a

pedestais são formadas nos locais onde há bactérias aderidas (Kaper et al., 2004).

Intimina, uma proteína da membrana externa codificada pelo gene *eae* presente no LEE, é a molécula de adesão responsável pela ligação íntima da bactéria a célula do hospedeiro e está presente em *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (Deb Roy e Maddox, 2001).

Em bovinos, a STEC ao ser ingerida chega até o intestino, principalmente o intestino grosso, se liga ao epitélio por meio de adesinas, o coloniza e produz toxinas Shiga. Em amostras LEE positivas, a lesão A/E é a principal característica da sua colonização e em amostras LEE negativas, a ligação com o epitélio ocorre de forma não íntima. A diarreia ocorre devido a perda das microvilosidades, ativação da atividade secretória das células epiteliais e afrouxamento das “tight junctions”. Bezerros infectados não apresentam sinais sistêmicos (Gyles e Fairbrother, 2010).

Amostras de EHEC e STEC estão associadas a diarreia de bezerros com um a oito semanas de idade (DedRoy e Maddox, 2001). Animais afetados apresentam lesões A/E no íleo terminal, cólon e reto, com edema e infiltrado neutrofílico na lâmina própria, e diarreia mucoide, às vezes hemorrágica (Deb Roy e Maddox, 2001; Gyles e Fairbrother, 2010). Uma alta porcentagem de animais infectados não apresenta sinais clínicos, e constituem importante reservatório de STEC (Gyles e Fairbrother, 2010).

A importância da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) para bezerros é questionável (Foster e Smith, 2009). A principal característica de EPEC é causar lesões A/E no intestino delgado e grosso, mas ao contrário de EHEC, não produz

toxinas Shiga (DebRoy e Maddox, 2001). Por isso, *E. coli* com capacidade de causar lesões A/E (EHEC e EPEC) são chamadas *Escherichia coli* “attaching and effacing” (AEEC). A diarreia resulta da destruição das microvilosidades, ativação de sistemas secretórios e afrouxamento das “tight junctions” (Gyles e Fairbrother, 2010).

China et al. (1998) estudaram a presença de *Escherichia coli* “attaching and effacing” em 695 bezerros, dos quais 295 morreram de diarreia e tinham idades entre duas a 10 semanas, 311 eram saudáveis e tinham entre quatro a seis semanas de idade, e 89 pertenciam a uma propriedade com problemas de diarreia e suas fezes foram coletadas duas vezes por semana do nascimento até 12 semanas de idade. Foram obtidos 970 isolados do conteúdo intestinal dos animais mortos, dos quais, 16 foram caracterizados como EPEC (*eae*⁺) e 16 como EHEC (*eae*⁺/*Stx*⁺). Um mil trezentos e trinta e dois isolados de *Escherichia coli* foram obtidos das fezes dos animais saudáveis, dos quais, 255 possuíam o gene *eae*, sendo 171 classificados como EPEC (*eae*⁺) e 84 como EHEC (*eae*⁺/*Stx*⁺). No mesmo trabalho, utilizando os 89 animais, AEEC (*Escherichia coli* “attaching and effacing”) (*eae*⁺) foi identificada em 66% dos animais com diarreia e em 25% dos animais sem diarreia. Os animais positivos tinham idades entre um e 12 semanas, porém 90% dos casos se concentraram em animais entre 2 e 8 semanas (média 5 semanas).

Holland et al. (1999) pesquisaram a presença de genes de virulência em *Escherichia coli* “attaching and effacing” (AEEC). Fezes de 114 bezerros com diarreia e 101 saudáveis foram coletadas e testadas por meio de uma PCR para a presença dos genes *eae* (intimina) e *Stx* (toxinas Shiga). Fezes de 63 animais foram positivas para o gene *eae*, 23 provenientes

de animais com diarreia e 40 de bezerros saudáveis, demonstrando que a infecção por *Escherichia coli* positiva para *eae* foi significativamente maior em animais saudáveis. Dentre as amostras positivas para *eae* dos animais diarréicos, 11 possuíam o gene *Stx*, e dentre os saudáveis, 20 possuíam o gene *Stx*. A média de idade de animais infectados saudáveis foi de 25,5 dias, e a de diarréicos, 24,3 dias.

Um estudo foi realizado no estado de São Paulo com o objetivo de determinar a prevalência *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em isolados de animais com e sem diarreia. Foram coletadas amostras fecais de 205 animais saudáveis e 139 diarréicos. Os genes *Stx* (*Stx1* e *Stx2*) e *eae* foram identificados por meio de uma PCR, e a expressão de gene foi testada utilizando um ensaio de citotoxicidade. *Escherichia coli* positiva para o gene *Stx* (toxina Shiga) foi encontrada em quarenta e quatro animais sendo 28 (20%) com diarreia e 16 (7,8%) saudáveis. Vinte e quatro isolados produziram a toxina Shiga, dos quais 12 foram positivos para o *Stx1*, oito para *Stx1* e *Stx2* e quatro para *Stx2*. Dez isolados foram positivos para o gene *eae* (Leomil et al., 2003).

Duzentas e cinco amostras de *Escherichia coli* isoladas de 139 bezerros com diarreia da região centro oeste do Brasil foram examinadas quanto a presença de fatores de virulência associados à colibacilose bovina. A toxina *Stx1* foi detectada em 20 amostras, a *Stx2* em 13 e a *STa* em oito. A adesina fimbrial *F5* foi identificada em 15 isolados, dos quais quatro eram ETEC (*F5/STa*). A fimbria *F41* não foi detectada e o gene *eae* foi identificado em sete amostras produtoras de toxina Shiga 1 (*Stx1*) (Salvadori et al., 2003).

Cento e setenta e três amostras de *Escherichia coli* obtidas de bezerros com diarreia provenientes do estado de São Paulo foram examinadas para a produção de fatores de virulência. Cinquenta e três isolados produziram *STa* pelo teste de Dean. Utilizando uma PCR, 4 amostras foram positivas para o gene *Stx2*, 4 para o gene *Stx1*, e uma para os dois. Três amostras possuíam os genes *Stx1* e *eae* (Rigobelo et al., 2006).

Aidar-Ugrinovich et al. (2007) estudaram STEC e EPEC isoladas de bezerros no estado de São Paulo. Os patótipos STEC e EPEC foram isolados em 12% e 2,6% dos casos com diarreia, respectivamente. Nos animais saudáveis, STEC e EPEC foram isoladas em 8,5% e 2,8% dos casos, respectivamente. Vinte seis por cento das STEC isoladas dos animais diarréicos e 25% das dos saudáveis, possuíam o gene *eae*.

Trinta e sete cepas de *Escherichia coli* foram isoladas de animais diarréicos e 18 de animais saudáveis. Por meio de um PCR multiplex, foram identificados os genes de virulência *K99* (18,9%), *F41* (18,9%), *STa* (18,9%), *Stx1* (13,5%), *Stx2* (5,4%) e intimina (8,1%) nas cepas dos animais com diarreia. Nos animais saudáveis, somente os fatores de virulência *K99* (16,6%) e intimina (55,5%) foram identificados (Ok et al., 2009).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Local e período

A coleta do material fecal foi realizada em uma propriedade particular, localizada no município de Martinho Campos, microregião

de Bom Despacho, no estado de Minas Gerais situado à 19° 19' de latitude S e 45° 14' de longitude W, a altitude média de 674 metros acima do nível do mar.

O período de coleta compreendeu os meses de junho a setembro de 2008. O clima se caracterizava por verão chuvoso e inverno seco. Os valores meteorológicos, na Tabela

1, foram obtidos dos dados coletados da CEMIG – Porto Pará, Martinho Campos.

Todos os animais nasceram na propriedade entre os meses de junho a agosto de 2008, em piquetes-maternidade há, aproximadamente, 600 metros das instalações do bezerreiro.

Tabela1: Dados meteorológicos médios durante o período experimental (junho a outubro de 2008).

Período mês/ano	Temp. média °C	Temp. max. média °C	Temp. mín. média °C	Precip.pluviométrica (mm/mês)
Junho/08	19,4	30,3	8,4	0
Julho/08	19,3	30,1	8,4	0
Agosto/08	22,7	32,0	13,4	12
Setembro/08	24	34,5	13,5	65

Fonte: Agritempo – Embrapa – Cemig – Porto Pará

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Gastrenterites Transmissíveis dos Animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2- Manejo das bezerras na propriedade

No piquete maternidade havia um funcionário encarregado de observá-lo duas vezes ao dia, às 7:00 e às 15:00. Após o nascimento, os animais eram contidos para a realização da cura de umbigo com tintura de iodo a 10%, e em seguida transportados em uma carroça para o bezerreiro, onde permaneciam até completarem 60 dias de idade.

Os neonatos eram criados no sistema de casinhas, presos por meio de uma coleira e corrente afixada ao chão. O piquete era recoberto com gramíneas do gênero

Cynodon spp e a área onde circulava a bezerra era recoberta com areia. Ao chegarem, os neonatos recebiam, via oral, dois litros de um “pool” de colostro das vacas que pariram naquele dia. Se o animal relutasse em ingerir o colostro, presumia-se que o mesmo havia mamado no piquete maternidade.

Os neonatos eram alimentados com quatro litros de leite, oriundo de vacas em tratamento com antibióticos (leite de descarte), desde o segundo até o sexagésimo dia de vida. O leite era oferecido aos animais uma vez por dia no período da manhã no balde, caso o animal demonstrasse dificuldade de ingerir o alimento, o leite era oferecido em mamadeira.

A partir do segundo dia de vida, as bezerras recebiam concentrado *ad libitum*. A água era fornecida nos mesmos baldes utilizados no fornecimento do leite e trocada uma vez por dia, pela manhã.

As bezerras até 60 dias de idade não recebiam vacinas. A administração de vermífugos era realizada a cada 21 dias e o controle de ectoparasitas era realizado de acordo com a avaliação do tratador. Quando os animais adoeciam, o fato era relatado ao gerente pelo funcionário responsável, que adotava os tratamentos prescritos pelo Médico Veterinário responsável pela sanidade do rebanho.

Após 60 dias, os animais eram transferidos das casinhas para os piquetes de transição. Todos os animais ao serem transferidos, recebiam uma nova aplicação de vermífugo, além de uma dose quimioprofilática com imidocarb, contra tristeza parasitária bovina.

O protocolo de tratamento das diarreias estabelecido na propriedade, para todas as bezerras, consistia de antibiótico à base de enrofloxacina, associado a um antiinflamatório à base de flunixin meglumine e um probiótico. Este protocolo era utilizado durante todo o episódio de diarreia.

3.3- Animais e coleta de amostras

Foram coletadas amostras fecais de bezerras leiteiras da raça Girolando, com pesos médios de $35,42 \pm 2,87$ (32 a 41 kg). Todos os animais nasceram na propriedade entre os meses de junho a agosto de 2008, em piquetes maternidade localizado a, aproximadamente, 600 m das instalações do bezerreiro.

A coleta das fezes foi realizada com auxílio de sacos plásticos limpos, diretamente da ampola retal de cada animal, e foram mantidas resfriadas (4°C) até o envio para o laboratório. As amostras fecais foram enviadas semanalmente em caixas de isopor com gelo, para o Laboratório de

Gastrenterites Transmissíveis dos Animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

Os animais foram acompanhados do nascimento até no mínimo 60 dias de idade. Foram coletadas fezes de 67 bezerras, totalizando 850 amostras, 312 diarréicas e 538 normais. A primeira amostra de cada bezerra foi coletada com 24-48 h de vida e subsequentemente em intervalos semanais, até pelo menos 60 dias de idade. Durante o experimento, todo animal que teve diarreia, teve amostras de fezes coletadas de todo o episódio de diarreia até o final deste. As fezes foram consideradas diarréicas quando no momento da coleta apresentavam-se pastosas a liquefeitas. E normais quando se apresentavam firmes e bem formadas.

Para o cálculo da incidência de diarreia ao longo das nove semanas de vida, considerou-se um novo caso o animal que ficou cinco ou mais dias seguidos sem apresentar fezes diarréicas.

Para o cálculo da incidência dos enteropatógenos ao longo das nove semanas de idade, foi considerado um caso a detecção do agente na amostra fecal e um novo caso a primeira detecção do agente em cada uma das nove semanas de vida estudadas.

3.4- Pesquisa dos enteropatógenos

A pesquisa das enterobactérias e do rotavírus bovino do grupo A foi realizada no Laboratório de Gastrenterites Transmissíveis dos Animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, e a pesquisa do coronavírus bovino, no Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina.

No laboratório, as fezes foram diluídas na proporção 1:4 em tampão de estabilização para rotavírus (Tris-HCL 50 mM, CaCl₂ 13 mM). Parte da suspensão fecal (3 mL) foi acondicionada em tubo tipo eppendorf[®] de 1,5 mL e armazenada a -20°C, para posterior exame virológico.

Para a pesquisa das enterobactérias, um mL da suspensão fecal foi transferido para meio não seletivo de pré-enriquecimento (água peptonada) e incubado a 37°C por 18-24 h. Com auxílio de alça flambada, as amostras foram repicadas em ágar MacConkey, para isolamento de *Escherichia coli*, e as placas incubadas na estufa à 37°C. Uma alíquota (um mL) do meio de pré-enriquecimento não seletivo foi transferida para o meio seletivo Tetrathionato de Sódio, sendo novamente incubado à 37°C em condições de aerobiose por mais 24 h. Em seguida foi semeado em placas de ágar XLT-4 e ágar Hektoen, específicos para *Salmonella* spp. (Waltman, 2000).

Foram selecionadas até três colônias isoladas de cada placa e que apresentavam aspecto morfológico sugestivo de *E. coli* ou *Salmonella* para identificação através de provas bioquímicas, utilizando o sistema

Lac-EMIC 9T, de acordo com Fontes (1979). Os isolados identificados foram armazenados em meio de manutenção, à temperatura ambiente.

As colônias classificadas como *Salmonella* spp. foram enviadas ao Laboratório de Referência em *Salmonella* no IOC/FIOCRUZ (Rio de Janeiro/RJ) para sorotipagem.

Os fatores de virulência de *Escherichia coli* foram identificados através da técnica de PCR multiplex utilizando pares de *primers* destinados a detecção dos genes codificadores para *K99*, *F41*, intimina (*eae*), toxina Shiga 1 e 2 (*Stx1* e *Stx2*, respectivamente) e toxina termo-estável a (*STa*) (Franck et al., 1998). Na tabela 2 estão apresentadas as sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados e os respectivos tamanhos de fragmento amplificados esperados. Como controles positivos foram utilizados duas amostras padrão de *E. coli* denominadas EDL33 (contendo os genes codificadores para *Stx1*, *Stx2* e Intimina) e B41 (contendo os genes codificadores para *K99*, *F41* e *STa*). Como controle negativo foi utilizada água ultrapura.

Tabela 2: Iniciadores usados na PCR multiplex para identificação dos genes de virulência de *E. coli* e tamanho do produto amplificado, em pares de bases, para cada gene.

Iniciador	Genes de Virulência	Sequência dos Iniciadores Posição 5'- 3'	Amplicon (pb)
1	Stx1 (F)	TTC GCT CTG CAA TAG GTA	555
	Stx1 (R)	TTC CCC AGT TCA ATG TAA GAT	
2	eae (F)	ATA TCC GTT TTA ATG GCT ATC T	425
	eae (R)	AAT CTT CTG CGT ACT GTG TTC A	
3	F41 (F)	GCA TCA GCG GCA GTA TCT	380
	F41 (R)	GTC CCT AGC TCA GTA TTA TCA CCT	
4	K99 (F)	TAT TAT CTT AGG TGG TAT GG	314
	K99 (R)	GGT ATC CTT TAG CAG CAG TAT TTC	

5	STa (F)	GCT AAT GTT GGC AAT TTT TAT TTC TGT A	190
	STa (R)	AGG ATT ACA ACA AAG TTC ACA GCA GTA A	
6	Stx2 (F)	GTG CCT GTT ACT GGG TTT TTC TTC	118
	Stx2 (R)	AGG GGT CGA TAT CTC TGT CC	

Os isolados de *Escherichia coli* foram classificados em patótipos de acordo com seus fatores de virulência. Isolados positivos para os genes de virulência *K99* e/ou *F41* e *STa* foram denominados de ETEC, para *Stx1* ou *Stx2* de STEC, para *eae* de EPEC, para *Stx1* e/ou *Stx2* e *eae* de EHEC.

Para obtenção do DNA, os isolados mantidos em meio de manutenção foram semeados em ágar MacConkey por 18-24 h a 37°C. Foram preparadas suspensões aquosas de cada colônia em microtubos de 1,5 mL contendo 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH. 8,0; EDTA 1 mM). Em seguida foi feita extração térmica do DNA por 10 min a 100°C. Os tubos foram transferidos para banho de gelo por 15 min e centrifugados a 3000 x g por 1 min para separação dos debris celulares. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, sendo estocado a -20°C ou mantido a 4°C para uso imediato na reação de PCR multiplex .

Para a realização do PCR multiplex, 3 µL de DNA total extraído foram adicionados ao *mix* de reação contendo: 0,5 µL de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 1x AmpliTaq Gold buffer, 2 U AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems), para uma reação final de 20 µL. A reação de amplificação consistiu de 1 passo de 10 min a 94°C seguido por 25 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 50°C e 1 min e 30 s a 70°C e 1 passo final de extensão de 10min a 70°C (Franck et al., 1998).

Dez microlitros do produto de reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio

a 0,1 µg/µL e observados sob luz ultravioleta.

O RNA total foi extraído das alíquotas reservadas para o exame virológico. Duzentos µL da suspensão fecal foram tratados com SDS numa concentração final de 1% (v/v) e mantidos a 56° C por 30 min. Em seguida, foi utilizado uma combinação dos métodos de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina, segundo Alfieri et al. (2006), para extração do RNA. Este foi eluído em 50 µL de água DEPC e usado na reação de PCR semi nested (SN-PCR). A pesquisa de coronavírus bovino foi realizada utilizando-se uma reação de transcrição reversa seguida por PCR semi-nested, segundo descrito por Barry et al. (2009) e Takiuchi et al. (2006).

Para a realização da transcrição reversa (RT), 9 µL do RNA extraído foi submetido a desnaturação a 97 °C durante 4 min seguidos de um banho de gelo por 5 min, adicionado ao mesmo 1 µL (20 pmol) do primer BCoV2 “antisense” (5’ TGTGGGTGCGAGTTCTGC-3’) e 10 µL do mix de transcrição reversa contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen), 0,1 mM de cada dNTP, 10 mM DTT, 100 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), e água ultra pura para volume final de 20 µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C por 30 min, 95°C por 5 min.

Para a realização da PCR, 8 µL do produto da RT foi adicionada ao mix de PCR contendo 1 x PCR buffer (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µL (20

pmol) dos primers BCoV1 “sense” (5'-CGATGAGGCTATTCCGAC-3') and BCoV2 “antisense” (5'-TGTGGGTGCGAGTTCTGC-3'), 2,5 U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), e água ultra pura para um volume final de 50 µL. A reação de amplificação consistiu de 1 passo de 4 min a 94°C seguido por 39 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C e 1 passo final de extensão de 7 min a 72°C. o tamanho do amplificado foi de 454 pb.

Por fim, procedeu-se a segunda amplificação, adicionando-se 3 µL do produto da primeira reação ao mix de semi nested PCR contendo 1 x PCR buffer (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µL (20 pmol) dos primers BCoV3 “sense” (5'-TTGCTAGTCTTGTCTGGC-3') e BCoV2 “antisense”, 2,5 U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura para um volume final de 50 µL. A reação consistiu de 1 passo de 4 min a 94°C seguido por 29 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C e 1 passo final de extensão de 7 min a 72°C. O tamanho do fragmento amplificado foi de 251 pb.

Como controle positivo, utilizou-se a amostra de referência Kakegawa. Como controle negativo, foi utilizada água tratada com 0,1% de dietilpirocabonato (água DEPC). Cinco microlitros da reação de semi-nested foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2 %, corado com brometo de etídio 0,1µg/mL.

O diagnóstico de rotavírus bovino foi realizado por meio da técnica padrão de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), seguindo-se recomendações de Herring et al. (1982), com algumas modificações. Para a obtenção do RNA viral, quinhentos microlitros da suspensão fecal foram descongelados e centrifugados a 3000 x g por 10 min. A fase aquosa foi

transferida para outro tubo e 100 µL de tampão de lise (SDS 10%, EDTA 110 mM pH 7,8) foram adicionados. A amostra foi incubada a 55°C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:48:2), o tubo vortexado e incubado a 37°C por 10 min. Após esse período, o tubo foi centrifugado por 10 min a 3000 x g e a fase aquosa transferida para um novo tubo.

Uma última extração foi feita com 500 µL de clorofórmio, para retirada de restos de fenol. Após vortexar a amostra, o tubo foi centrifugado a 3000 x g por 5 min. A fase superior foi recolhida e 100 µL de acetato de sódio 3 M foram adicionados, juntamente com 1 mL de etanol 100% resfriado. A precipitação do RNA foi obtida mantendo-se o tubo por uma noite a -20°C (Theil et al., 1981). Como controle positivo, foi utilizado a amostra NCDV.

O RNA precipitado foi centrifugado por 15 min a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado, após seco, foi diluído em 50 µL de tampão de amostra (3% de SDS, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, uréia 5 M, β-mercaptoetanol 5% e 0,01% de azul de bromofenol) e incubado por 15 min a 56°C (Pereira et al., 1983).

A separação eletroforética do RNA foi feita utilizando-se um sistema descontínuo de pH, com o gel de resolução a 7% de acrilamida e o gel concentrador de amostra a 3,75% de acrilamida, e a corrida da eletroforese em tampão Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 0,2M, pH 8,6). A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata de acordo com Herring et al. (1982).

3.5- Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas por meio das medidas de posição média, mediana, valor máximo e valor mínimo, e de dispersão, erro-padrão. A distribuição das frequências foi analisada por meio de tabelas de contingência a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher. Para análise dos resultados utilizou-se o *software* EPI-INFO (versão 6.0) (Dean et al., 1994).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 850 amostras fecais de 67 bezerras desde o nascimento até no mínimo 60 dias de idade. Oito bezerras vieram a óbito durante o experimento, possivelmente devido a complicações secundárias a diarreia, como desidratação e acidose. Do

total de amostras fecais coletadas, 312 eram diarreicas e 538 normais.

A frequência média diária da ocorrência de episódios de diarreia, quando analisada em todo o bezerreiro, foi de oito animais, variando de 6-14%. Durante o período experimental a incidência, nas bezerras acompanhadas no experimento, foi de 100%. A incidência de diarreia em cada semana de idade e sua relação estatística com a idade estão representadas no gráfico 1.

Os episódios de diarreia tiveram início entre o quinto e 13º dia de vida com maior ocorrência no período entre nono e o 11º dia de vida acometendo 58% das bezerras. O período médio da patência das diarreias foi de seis dias variando de dois a 14 dias de duração e a maioria parte dos animais apresentou um período de patência de quatro dias (36%).

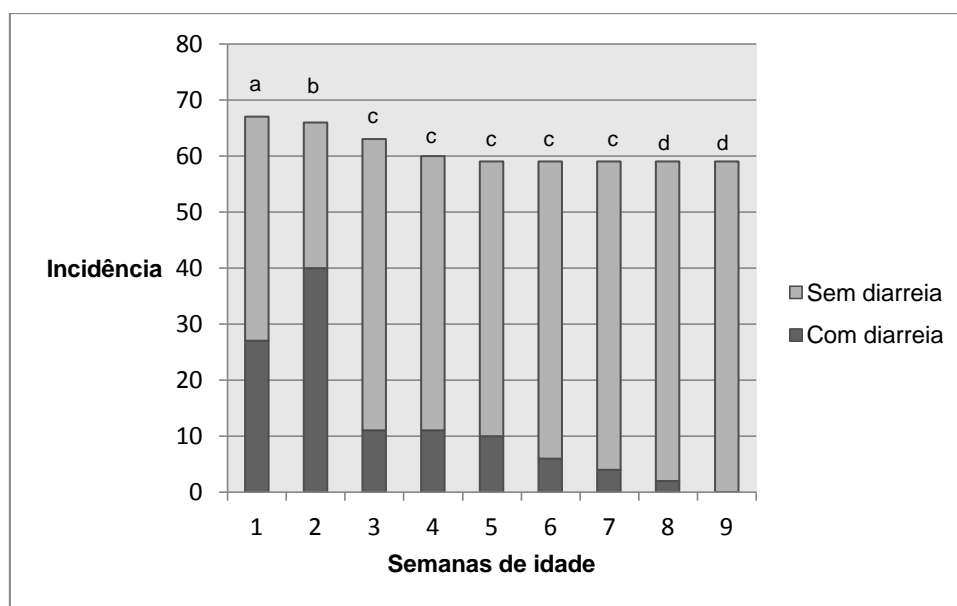


Gráfico 1: Incidência de diarreia ao longo das nove semanas de vida em bezerras leiteiras (n=67) criadas em uma propriedade localizada em Martinho Campos – MG (2008) e sua associação com a idade pelo teste do χ^2 .

a) Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa $p \leq 0,05$ pelo teste do Qui-quadrado.

Foi encontrada associação pelo teste do χ^2 entre a incidência de diarreia e a semana de vida dos animais (Gráfico 1). A primeira e a segunda semanas de vida concentraram o maior número dos casos de diarreia, sendo a segunda semana a época de maior ocorrência. Após as duas primeiras semanas de vida, os casos de diarreia diminuíram progressivamente, mantendo a incidência baixa da 3ª a 8ª semana de vida e cessando na 9ª semana.

A diarreia é uma doença frequente em bezerros com até 30 dias de idade (Radostits et al., 2007). A idade média de ocorrência encontrada por Reynolds et al. (1986) foi de 12 dias (intervalo de 0 a 36 dias). Trotz-Williams et al. (2007) e Bartels et al. (2010) encontraram uma prevalência maior de diarreia na segunda semana de vida dos bezerros. Esses resultados junto com os nossos demonstram que as duas primeiras semanas de vida do bezerro são a

época de maior ocorrência da diarreia e por isso, animais com essa idade merecem mais atenção e cuidados.

O rotavírus bovino do grupo A foi identificado em 49 (49/850 – 5,76%) amostras fecais, 34 diarréicas (34/312 – 10,89%) e 15 normais (15/538 – 2,78%). As amostras fecais positivas foram coletadas de 23 animais com diarreia e 15 sem. Porém, como alguns animais excretaram o vírus mais de uma vez, com ou sem sinal de diarreia, ao todo, das 67 bezerras, 33 (49,2%) foram positivas para rotavirose em algum momento do estudo. Um exemplo é a bezerra “Diana”, que teve fezes diarréicas positivas para rotavírus com 15, 16 e 17 dias de idade, e aos 67 dias de idade, teve fezes normais positivas para o vírus. A incidência de rotavírus, em animais com e sem diarreia, em cada uma das nove semanas de idade, está representada no gráfico 2.

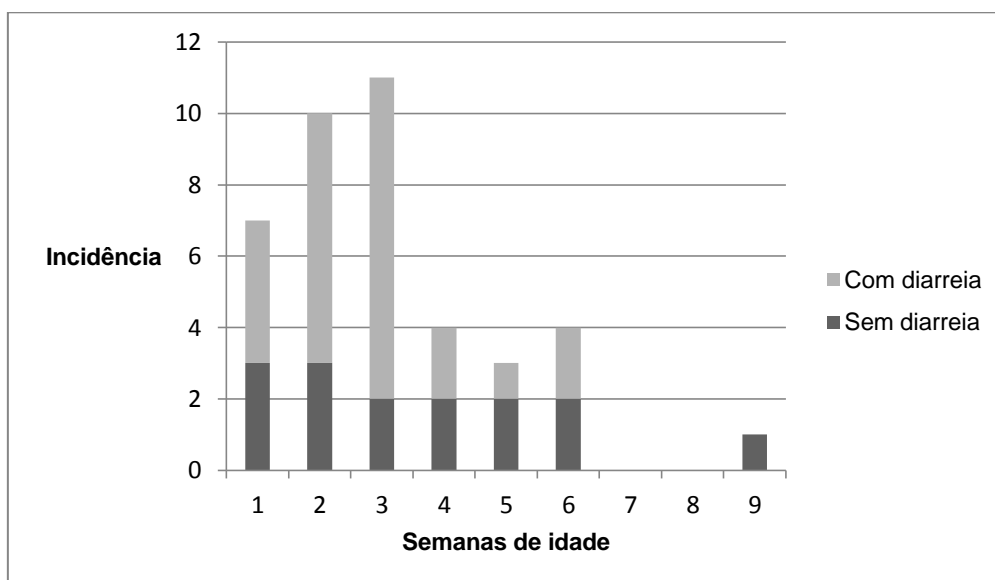


Gráfico 2: Incidência de rotavírus do grupo A ao longo das nove semanas de idade em bezerras leiteiras (n=67) com e sem diarreia criadas em uma propriedade localizada em Martinho Campos – MG (2008).

A idade média de infecção foi de 18,6 dias (IC 95%: 15,1-22,1; erro padrão: 1,7). McNulty e Logan (1983) e Reynolds et al. (1986) encontraram uma média de idade de infecção por rotavírus de 6,1 e 9,8 dias de idade, respectivamente. Lucchelli et al. (1992) detectaram rotavírus em animais com 1 a 30 dias (média 14 dias), sendo que fezes semi-líquidas a líquidas foram mais frequentes nos animais positivos com até 15 dias. Os resultados separados por animais com e sem diarreia estão apresentados na tabela 3. A incidência de rotavírus nos animais com diarreia e sua associação com a idade estão representados no gráfico 3.

Os animais positivos excretaram o vírus por no máximo três dias consecutivos e alguns

tiveram amostras fecais positivas mais de uma vez em semanas diferentes, com casos ou não de diarreia. Um exemplo é a bezerra Diana, da qual foi identificado rotavírus por três dias seguidos em fezes diarréicas e 1 mês e meio depois, excretou o vírus em uma amostra fecal normal. Em estudos experimentais, a duração da excreção de rotavírus em fezes durou de 4 a 10 dias (Saif et al., 1983; Hall et al., 1993; Parreño et al., 2004). Reynolds et al. (1985) trabalhando com bezerros naturalmente infectados, demonstrou que 83% dos animais excretaram rotavírus nas fezes em média por 3,6 dias e 50% dos bezerros infectados não apresentaram sinais clínicos durante o período experimental.

Tabela 3: Número de amostras fecais positivas para rotavírus e as idades média, mínima, máxima, mediana e intervalo de confiança, mensuradas em dias, em bezerras com idades entre 0 e 67 dias, com e sem diarreia. Martinho Campos – MG (2008).

Animais	N° de amostras	Idade média	Idade Mínima	Idade Máxima	Mediana	Intervalo de Confiança (95%)
Com diarreia (n=23)	34	16,8	1	38	16	13,8-19,8
Sem diarreia (n=15)	15	22,6	1	67	21	14,0-31,3

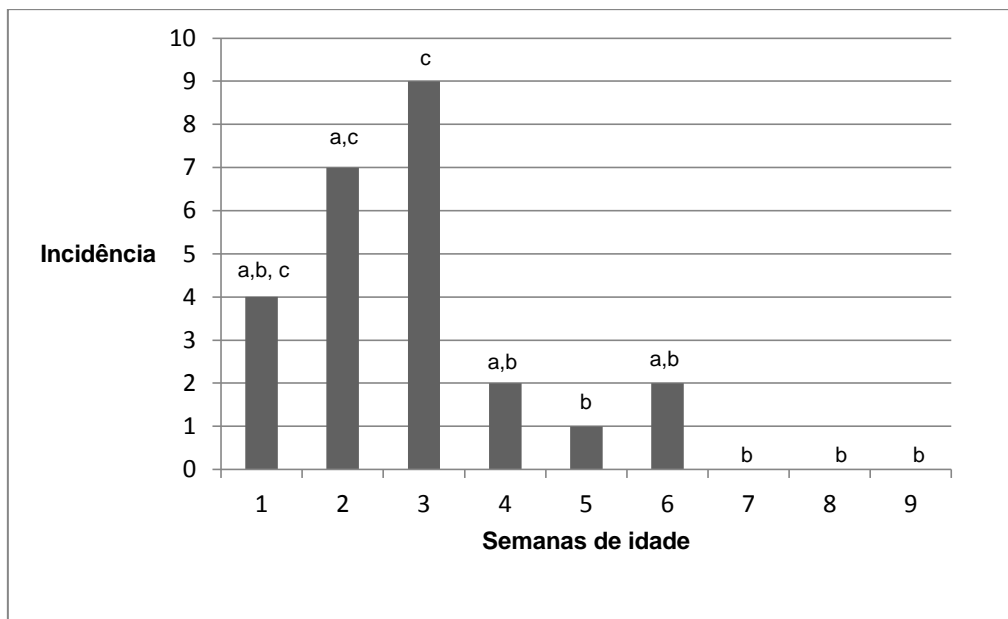


Gráfico 3: Incidência de rotavírus do grupo A em fezes diarreicas de bezerras ao longo das nove semanas de idade e sua associação com a idade pelo teste do χ^2 . Martinho Campos – MG (2008).

a) Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa $p \leq 0,05$ pelo teste do Qui-quadrado.

Verificou-se uma diferença significativa pela análise do χ^2 entre a frequência de diarreia e a presença de rotavírus ($p < 0,0001$), indicando uma maior probabilidade de detectar o vírus nas fezes de animais com diarreia. A eliminação fecal de rotavírus por animais diarreicos e assintomáticos já foi relatado por outros estudos e, assim como neste, foi encontrada uma associação entre diarreia e a presença de rotavírus (Snodgrass et al., 1986; Busato et al., 1998; Buzinaro et al., 2000; Alfieri et al., 2006; Bartels et al., 2010). Entretanto Buzinaro e Freitas (2002) e Mayameei et al. (2010) não encontraram associação, e Oliveira Filho et al. (2007) e Ok et al. (2009) não detectaram rotavírus nas fezes de animais sem diarreia.

De acordo com Lucchelli et al. (1992), o título do vírus, sua virulência, status da imunidade passiva e outras variáveis podem amenizar os sinais clínicos das infecções por rotavírus em condições de campo, e o vírus parece ter menos efeito na

consistência fecal em animais mais velhos. A eliminação assintomática de rotavírus nas fezes sugere a possibilidade de animais infectados tornarem-se portadores e, conseqüentemente, uma fonte de infecção para animais susceptíveis (Buzinaro e Freitas, 2002).

Foi encontrada relação entre o número de casos de rotavírus em animais diarreicos e a idade ($p = 0,001$). As três primeiras semanas concentram o maior número de casos, sendo que há tendência de ocorrerem mais casos na terceira semana de vida.

Garcia et al. (2000) detectaram rotavírus nas fezes de bezerros diarreicos com até 30 dias (média 12,9 dias), porém não houve relação com a idade. Mayameei et al. (2010) também não encontraram relação, mas a frequência de rotavirose foi maior em animais na terceira semana de idade, com tendência a diminuir a partir de um mês de idade. Alfieri et al. (2006) encontraram

relação entre rotavírus nas fezes diarréicas de bezerros nas segunda e terceira semana de vida e Bartels et al. (2010) em animais na primeira semana.

Mayameei et al. (2010) sugerem que a ocorrência de rotavirose é maior na terceira semana devido a presença de anticorpos colostrais e imunidade local, particularmente na primeira semana e um pouco na segunda, diminuindo a frequência de diarreia por rotavirose nas duas primeiras semanas. Após a diminuição da imunidade passiva e a ocorrência de infecções naturais pelo vírus nas terceira e quarta semanas de vida e subsequente ativação da imunidade local do hospedeiro, a frequência de rotavirose diminui em bezerros com mais de um mês.

A virulência da amostra e a idade do bezerro à infecção são dois elementos importantes na patogênese da rotavirose. Bezerros recém-nascidos possuem lenta reposição de enterócitos, células onde o vírus se replica, e esses animais são mais susceptíveis a doença por estirpes virais moderadamente virulentas. Em animais mais velhos, existe a competição entre taxa de replicação viral e a reposição dos enterócitos, sendo que somente amostras muito virulentas causam diarreia em bezerros com mais de seis semanas de

vida. Bezerros mais velhos se tornam resistentes a doença, mas não a infecção, e a excreção do vírus em sintomáticos e assintomáticos é semelhante, mas o primeiro excreta o vírus mais cedo (Dodet et al., 1997).

O coronavírus bovino foi encontrado em 93 amostras de fezes (93/850 – 10,9%), das quais 30 eram diarréicas (30/312 – 9,61%) e provenientes de 22 bezerras diarréicas, e 63 eram normais (63/538 – 11,71%) e foram coletadas de 39 bezerras não diarréicas. É importante ressaltar que algumas bezerras excretaram o vírus mais de uma vez, com ou sem sinal de diarreia, como é o caso da bezerra “Jamile”, que teve fezes diarréicas positivas para o vírus aos 34 dias de idade, e fezes normais positivas aos 4 e 60 dias de idade. Considerando somente a primeira vez que cada animal foi positivo para coronavírus, o vírus foi identificado nas fezes de 46 bezerras (46/67 – 68,6%), com idade média de 25,5 dias (IC 95%: 21,3-29,1; erro padrão: 1,9). Na tabela 4 estão apresentados os resultados separados por animais com e sem diarreia. No gráfico 4, está representada a incidência de coronavírus bovino nos animais com e sem diarreia, em cada uma das nove semanas de idade.

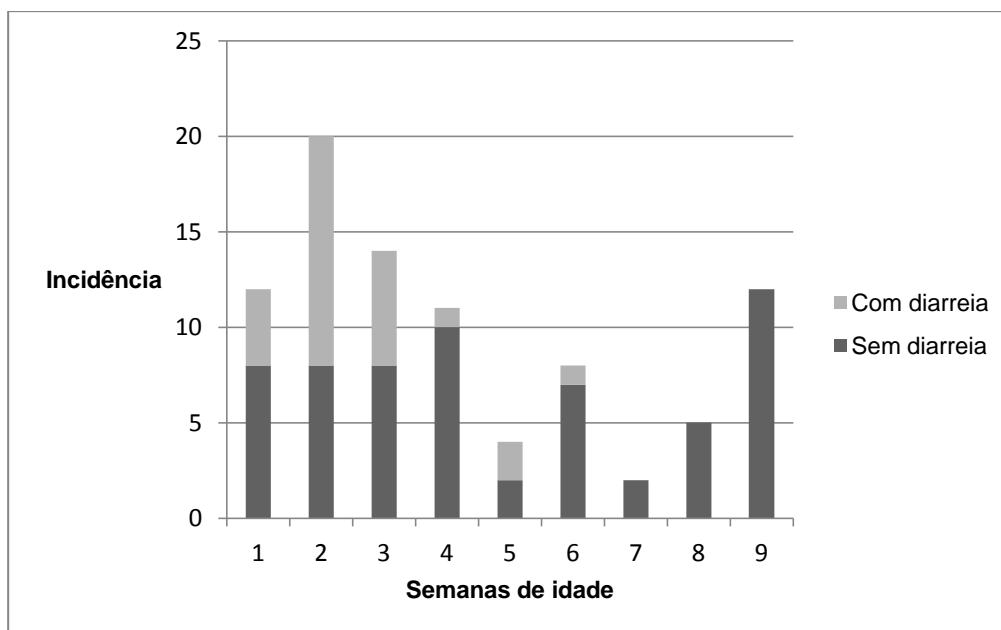


Gráfico 4: Incidência de coronavírus bovino ao longo das nove semanas de idade em bezerras leiteiras com e sem diarreia criadas em uma propriedade localizada em Martinho Campos – MG (2008).

Tabela 4: Número de amostras fecais positivas para coronavírus e as idades média, mínima, máxima, mediana e intervalo de confiança, mensuradas em dias, em bezerras com idades entre 0 e 67 dias, com e sem diarreia. Martinho Campos – MG (2008).

Animais	Nº de amostras	Idade média	Idade Mínima	Idade Máxima	Mediana	Intervalo de Confiança (95%)
Diarréicos (n=22)	30	13,8	1	39	11,5	10,7-16,9
Sem diarreia (n=39)	63	30,7	0	64	27	25,7-35,7

A idade média dos animais diarréicos positivos para BCoV foi de 13,8 dias (IC 95%: 10,7-16,9; erro padrão: 1,57), A diarreia induzida por coronavírus bovino (BCoV) ocorre comumente em bezerros com menos de três semanas de idade, após o declínio da imunidade passiva, mas a doença pode ocorrer em bezerros com até três meses de idade (Saif, 2011a). A

gravidade da enterite causada por esse vírus varia com a idade do animal, status imunológico, dose infectante e virulência da estirpe viral (Clark, 1993). Geralmente, a gravidade é maior e o período de incubação é menor em animais mais jovens, quando comparados com bezerros mais velhos, principalmente naqueles com falha de transmissão de imunidade passiva (Boileau

e Kapil, 2010). No gráfico 5, está representada a incidência de coronavírus nos animais com diarreia e sua associação com a idade.

A detecção de BCoV em animais mais velhos assintomáticos demonstra que esses animais podem se comportar como importantes fontes de infecção para animais mais jovens e mais susceptíveis. Além disso, deve-se ressaltar que o BCoV está envolvido em processos respiratórios, com infecção assintomática, podendo ser eliminado através das fezes (Saif et al., 1986)

No presente trabalho, as bezerras positivas excretaram o vírus uma vez ou várias vezes de maneira intermitente. Somente uma bezerra, Raquel, excretou o vírus por 4 dias consecutivos, mas no último veio a óbito.

A diarreia desenvolve cerca de 48 horas após infecção experimental, e o vírus pode ser detectado nas fezes por 1 a 3 dias consecutivos, seguido de uma excreção intermitente e em títulos baixos (Kapil et al., 1990; Clark, 1993). Segundo Kapil, Trent e Goyal (1990), a excreção viral parece ter um pico seguido de uma fase de excreção viral baixa, que pode não ser detectada dependendo do teste diagnóstico e pode coincidir com a fase sintomática.

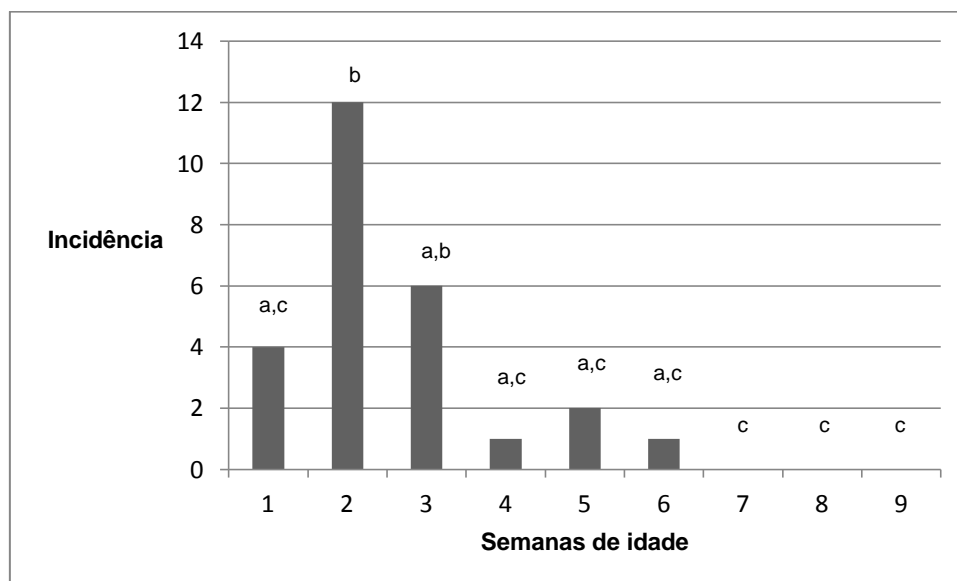


Gráfico 5: Incidência de coronavírus bovino em fezes diarréicas de bezerras ao longo das nove semanas de idade e sua associação com a idade pelo teste do χ^2 . Martinho Campos – MG (2008).

a) Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa $p \leq 0,05$ pelo teste do Qui-quadrado.

Apesar de não ter sido encontrada relação entre diarreia e presença de coronavírus nas fezes ($p=0,346$), a associação entre

animais diarréicos positivos para coronavírus e a idade dos animais mostrou relação estatística ($p<0,0001$). Observou-se

maior concentração dos casos em animais com duas e três semanas de idade, com tendência a diminuir com o avanço da idade.

Bartels et al. (2010) não encontraram relação entre a presença do vírus nas fezes e diarreia, e a prevalência dos casos de coronavirose foi maior nos animais na segunda semana de vida. Em um estudo realizado por Mayameei et al. (2010), também não foi encontrada essa relação, e as segunda e terceira semanas de vida concentraram o maior número de casos.

O fato de somente alguns bezerros desenvolverem diarreia demonstra que a diarreia neonatal resulta do efeito de vários fatores (virulência da estirpe viral, perfil imunológico da vaca e do bezerro, práticas de manejo, dose infectante, idade) e a presença do patógeno é somente um dos fatores necessários para o surgimento da doença (Bulgin et al., 1989, Oliveira Filho et al., 2007).

Reynolds et al. (1986), Pérez et al. (1998) e Stipp et al. (2009) encontraram associação estatística entre fezes diarréicas e presença de coronavírus. Neste último estudo, bezerros desde 1 até 60 dias de idade foram positivos para o vírus. No entanto, bezerros na faixa etária de 16 a 30 dias de idade tiveram maior frequência de infecção, e ao se comparar essa faixa etária com a de 31 a 45 dias de idade, houve diferença estatística. Segundo os autores, a associação entre a idade e a infecção por BCoV foi provavelmente devido à redução dos níveis de anticorpos adquiridos a partir do colostro. Ainda de acordo com esses autores, bezerros de até 60 dias de idade podem se infectar por BCoV e desenvolver sinais clínicos, mesmo com alguma imunidade passiva presente na primeira semana de vida ou resistência natural, que

adquire níveis significativos com 30 dias de idade.

Foram isoladas e identificadas por teste bioquímico 17 colônias de *Salmonella* sp., provenientes de 11 bezerras (11/67 – 16,4%), das quais duas eram *Salmonella* Enteritidis, 14 *Salmonella* Agona e uma *Salmonella enterica* subsp. Enterica (O:4,5, estrutura flagelar não detectável). Somente um animal positivo apresentou diarreia, aos sete dias de idade e pelo sorotipo Agona. A idade média de infecção dos animais sem diarreia foi de 25 dias (Mínimo 1 dia; Máximo 62 dias), mediana 26,5 dias e foram identificados sete animais com *Salmonella* Agona, dois com *Salmonella* Enteritidis, e um com *Salmonella enterica* subsp. Enterica (O:4,5) e *Salmonella* Agona concomitantemente.

Reynolds et al. (1986) encontraram bezerros infectados com idades entre 2 e 31 dias (média 17,2 dias), Mendonça et al. (1996) em bezerros com 1 a 30 dias de idade e Younis et al. (2009) em animais na primeira e quarta semana de vida, resultados que diferem um pouco dos encontrados nesse trabalho (1 a 62 dias de idade), já que não foram acompanhados bezerros até 60 dias de idade. Segundo Wray e Davies (2000) e Barrow et al., 2010), os sinais clínicos dos animais infectados são vistos por volta de duas a seis semanas de idade. Entretanto, animais de todas as idades podem se infectar e os sinais clínicos podem ser observados em bezerros entre 10 dias e três meses de idade (Rings, 1985).

A gravidade e duração dos sinais clínicos se relacionam com a higiene do local, ou seja, em propriedades com condições precárias 80% dos bezerros podem desenvolver sinais clínicos (Wray e Davies, 2000). É muito comum o animal estar infectado, mas não ter sinais clínicos, tornando-se um

importante reservatório do agente (Radostits et al., 2007).

Existem mais de 2500 sorotipos de *Salmonella*, e diferentes predileções de idade, manifestações clínicas e virulência existem entre os sorotipos e entre amostras de mesmo sorotipo (Mohler e House, 2009). Os sorotipos Dublin e Typhimurium são os mais importantes (Wray e Davies, 2000). No presente trabalho e em outros, foram detectados outros sorotipos, como Agona e Enteritidis, ressaltando a importância de se realizarem mais estudos sobre a patogenia de outros sorotipos de *Salmonella* spp. além de Dublin e Typhimurium, e sua relação com a diarreia em bezerras. (Richardson, 1975; Mendonça et al., 1996; Bischoff et al., 2004; Younis et al., 2009; Ahmed et al., 2009; Cummings et al., 2009a e b).

É importante ressaltar o potencial zoonótico dos sorotipos Agona e Enteritidis, os mais importantes causadores de infecções alimentares em humanos (Lax, Barrow e Jones, 1995). O sorotipo Agona é responsável por diversos surtos de infecção alimentar (Cooke et al., 2009). Tavechio et al. (1996) avaliaram a ocorrência de sorovares de *Salmonella* enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, no período de 1991 e 1995, obtidas de fontes humanas e não humanas. Dentre os sorovares de fontes humanas, o sorotipo Enteritidis ocupou o primeiro lugar e o Agona o quarto. Das fontes não humanas (ovos, alimento, amostras de meio ambiente), Enteritidis ficou em primeiro lugar e Agona em sexto. Na pesquisa realizada por Taunay et al. (1996) também nesse Instituto, só que utilizando amostras do período entre 1950 a 1990, mais de 100 sorotipos diferentes de *Salmonella* foram identificadas de fontes não humanas (água, alimento, meio ambiente, etc.), demonstrando a importância dessas bactérias em saúde pública.

A ocorrência de *Salmonella* em fezes de animais sem diarreia já foi relatada em outros trabalhos (Reynolds et al., 1986; Mendonça et al., 1996; Achá et al., 2004). As manifestações clínicas da salmonelose são variáveis, e refletem o balanço entre a imunidade e idade do animal, dose infectante e virulência da amostra bacteriana. A patogenicidade da maioria dos sorotipos permanece desconhecida, e, mesmo dentre os sorotipos mais comuns, existem muitas questões a serem respondidas sobre a interação entre o agente e o animal infectado (Mohler et al., 2009).

Todos os fatores citados nos parágrafos acima, somados ao fato de nenhuma infecção com outro enteropatógeno ter sido observada nos animais infectados por *Salmonella* spp., podem ter contribuído para baixa ocorrência de diarreia nos animais infectados.

Em todas as fezes pesquisadas, pelo menos uma colônia *Escherichia coli* foi isolada e identificada por testes bioquímicos, totalizando 1983 colônias, e uma PCR multiplex foi realizada para a sua caracterização. Das 850 amostras fecais, 7 foram positivas para intimina (*eae*), 7 para *K99/STa*, 7 para *Stx1*, 36 para *Stx1/Intimina*, 2 para *Stx1/Stx2/Intimina*, 43 para *Stx2* e 1 para *Stx2/Intimina*.

Colônias de *E. coli* positivas para os genes pesquisados foram isoladas das fezes de alguns animais mais de uma vez. Um exemplo é a bezerra “Karen”, que teve colônias de *E. coli* isoladas de suas fezes positivas para os genes *stx1/eae* aos 6, 26 e 62 dias de idade, sendo que as fezes coletadas nas primeira e última idades estavam normais, e a outra, diarréica. Os resultados separados por animais com diarreia e sem diarreia estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Genes de virulência pesquisados em *Escherichia coli* isoladas de amostras fecais coletadas (n=850) de bezerras leiteiras (n=67) com 0 a 67 dias de idade, número de animais infectados com e sem diarreia, e as idades média, máxima, mínima, mediana e intervalo de confiança, mensuradas em dias. Martinho Campos – MG (2008).

Genes	Característica das fezes	N° animais	Idade Média	Idade Mínima	Idade Máxima	Mediana	Intervalo de Confiança (95%)
<i>Intimina(eae)</i>	Diarréica	2	31	26	36	31	21,2-40,8
	Normal	5	26,8	5	64	19	6,3-47,3
<i>K99/STa</i>	Diarréica	4	14,2	1	30	13	5,0-23,37
	Normal	2	14,5	4	25	14,5	0-35,1
<i>Stx1</i>	Diarréica	4	14,75	14	17	14	13,3-16,2
	Normal	3	48,33	41	56	48	39,9-56,7
<i>Stx1/eae</i>	Diarréica	11	17,38	8	34	15	12,8-21,9
	Normal	20	26,69	1	62	26	19,8-33,5
<i>Stx1/Stx2/eae</i>	Diarréica	2	30	25	35	30	20,2-39,8
	Normal	0	0	0	0	0	0
<i>Stx2</i>	Diarréica	10	24,41	8	39	27,5	18,7-30,1
	Normal	24	39,7	9	63	39	35,0-44,3
<i>Stx2/eae</i>	Diarréica	0	0	0	0	0	0
	Normal	1	47	47	47	47	-

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) (*K99/STa*) comumente ocorre em animais com menos de três dias de idade, mas ocasionalmente pode ocorrer em animais mais velhos, principalmente se houver infecção viral concomitante. Estudos epidemiológicos com bezerros leiteiros e de corte indicam que mais de 80% dos casos de diarreia associada a ETEC ocorrem em animais com menos de 4 dias de idade (Radostits et al., 2007).

No presente trabalho, animais com mais de três dias de idade foram positivos para ETEC (*K99/STa*), assim como em outros trabalhos, nos quais bezerros com mais de uma semana de vida foram positivos para ETEC, em associação ou não com diarreia e a outros enteropatógenos (Mendonça et al., 1996; de La Fuente et al., 1999; Güler, Gündüz e Ok, 2008; Bartels et al., 2010).

Uma das possibilidades para a ocorrência de ETEC em animais diarréicos mais velhos é a infecção por outros vírus não pesquisados e que podem causar diarreia, como Breda Vírus, astrovírus, calicivírus. Além disso, a identificação dos genes de virulência *K99/STa* não significa que esses genes estejam sendo expressos e a causa da diarreia pode ser devida a outros fatores e agentes não avaliados.

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) causam lesões “*attaching and effacing*” mas não produzem toxinas, característica que as diferem de *Escherichia coli* produtoras de Shiga toxinas 1 e/ou 2 (STEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC). Diversos trabalhos foram realizados para identificar o papel dessas bactérias na patogênese da

diarreia em bezerros e, assim como no presente estudo, colônias de EPEC e STEC/EHEC foram encontradas em fezes de animais assintomáticos e com diarreia (Blanco et al., 1997; Holland et al., 1999; China et al., 1998; Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Wani et al., 2007; Herrera-Luna et al., 2009).

A presença de animais assintomáticos é frequente, e alguns autores acreditam que essas bactérias possam fazer parte da microbiota intestinal dos bezerros (Blanco et al., 1993; China et al., 1998). Porém, como a maioria dos trabalhos são seccionais, não se sabe a história dos animais saudáveis, se desenvolveram diarreia e se recuperaram ou se ainda vão desenvolver, mas como a maior parte dos animais positivos estudados nesses trabalhos estão diarréicos, conclui-se que esses patótipos estão envolvidos no desenvolvimento da diarreia (Blanco et al., 1997; China et al., 1998; Leomil et al., 2003).

Nos animais diarréicos, EPEC (*eae*) foi identificada em animais com 26 a 36 dias de idade, STEC (*Stx1* e/ou *Stx2*) em 8 a 39 dias e EHEC (*eae/Stx1* e/ou *Stx2*) em 8 a 35 dias. Houve associação entre os casos de diarreia por *Escherichia coli Stx1/eae* positiva e animais na segunda e quarta semanas de vida e *Escherichia coli Stx2* positiva e bezerros na quinta semana. O número de bezerras com fezes positivas para os genes de virulência de *E. coli* pesquisados, a característica das fezes e a idade das bezerras estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Idade (semanas de idade) das bezerras leiteiras positivas para os genes de virulência pesquisados em *Escherichia coli* isoladas de amostras fecais normais e diarréicas e o número de bezerras positivas. Martinho Campos – MG (2008).

Idade (semanas)	Característica das fezes	Número de animais						
		<i>eae</i>	<i>K99/STa</i>	<i>Stx1</i>	<i>Stx1/eae</i>	<i>Stx1/Stx2/eae</i>	<i>Stx2</i>	<i>Stx2/eae</i>
1	Diarréica	0	1	0	0	0	0	0
	Normal	1	1	0	4	0	0	0
2	Diarréica	0	2	3	6	0	1	0
	Normal	1	0	0	2	0	1	1
3	Diarréica	0	1	1	1	0	2	0
	Normal	1	0	0	3	0	1	1
4	Diarréica	1	0	0	4	1	2	0
	Normal	0	1	0	4	0	5	5
5	Diarréica	0	1	0	1	1	5	0
	Normal	1	0	0	3	0	5	5
6	Diarréica	1	0	0	0	0	1	0
	Normal	0	0	1	4	0	5	5
7	Diarréica	0	0	0	0	0	0	0
	Normal	0	0	1	1	0	7	7
8	Diarréica	0	0	0	0	0	0	0
	Normal	0	0	1	0	0	4	4
9	Diarréica	0	0	0	0	0	0	0
	Normal	1	0	0	2	0	3	3

Orden et al. (1998) encontraram um maior risco de infecção por STEC com o aumento da idade, principalmente em bezerros na quarta semana de vida. No estudo realizado por China et al. (1998), fezes de animais com 1 a 12 semanas de idade foram positivas para EPEC/EHEC, porém 90% dos casos se concentraram em animais entre 2 e 8 semanas de idade, principalmente com 5 semanas de idade.

No trabalho realizado por Holland et al. (1999), a idade média de infecção por *Escherichia coli* positivas para o gene *eae* (com ou sem *Stx*) em animais assintomáticos foi 25,5 dias de idade e em animais diarréicos 24,3 dias, porém animais com 8 a 83 dias foram positivos. Os resultados desses trabalhos somados aos encontrados neste, ressaltam a importância

de STEC/EHEC e EPEC em bezerros com mais de duas semanas de idade.

O gene de virulência *Stx2* foi mais frequente que *Stx1*, resultado semelhante ao encontrado por Blanco et al. (1997). Porém, de acordo com Mainil et al. (1993), bactérias produtoras de *Stx1* são mais comuns que *Stx2*.

Não foi encontrada relação estatística entre a presença dos genes de virulência estudados em *E. coli* e a diarreia. Deve-se considerar que outros genes de virulência de *E. coli* envolvidos na patogênese da diarreia causada por alguns patótipos não foram pesquisados nesse trabalho, e a classificação em sorotipos também não foi realizada, ambas importantes para uma melhor compreensão da patogênese da diarreia por patótipos de *E. coli*.

Considerando todos os enteropatógenos avaliados e cada patotipo de *E. coli* como um agente diferente, ao todo, das 850 amostras de fezes pesquisadas, 210 foram positivas para pelo menos um agente pesquisado, sendo 126 de animais sem diarreia e 84 de diarréicos.

Vinte e seis amostras tiveram dois agentes encontrados ao mesmo tempo, das quais 14 eram normais e 12 diarréicas. Os resultados

das infecções mistas estão demonstrados na tabela 7.

Estudos longitudinais sobre enteropatógenos são raros, dificultando a comparação dos dados epidemiológicos obtidos nesse trabalho. Além disso, para um melhor entendimento da etiologia da diarreia, outros enteropatógenos não incluídos nesse estudo devem ser considerados.

Tabela 7: Enteropatógenos detectados em associação nas amostras fecais coletadas de bezerras leiteiras com e sem diarreia, número de amostras fecais positivas totais e diarréicas. Martinho Campos – MG (2008).

Enteropatógenos	Nº de amostras	Nº de amostras
	fecais positivas	fecais diarréicas
Rotavírus + coronavírus	3	2
Rotavírus + <i>Stx2</i>	2	1
Rotavírus + <i>Stx1/eae</i>	4	2
Rotavírus + <i>Stx1/Stx2/eae</i>	1	1
<i>Stx1/eae</i> + coronavírus	6	2
<i>Stx2</i> + coronavírus	7	3
<i>eae</i> + coronavírus	1	0
<i>K99/STa</i> + coronavírus	2	1
Total	26	12

Infecção por mais de um enteropatógeno é comum (de La Fuente et al., 1998; de La Fuente et al., 1999; Garcia et., 2000; Oliveira Filho et al., 2007; Bejan et al., 2008; Ok et al., 2009). As associações encontradas nas amostras diarréicas foram rotavírus/*Stx1+eae* (2), rotavírus/coronavírus (2),

rotavírus/*Stx1+Stx2+eae* (1), *Stx1+eae/coronavírus* (2), *Stx2/coronavírus* (3), *K99+STa/coronavírus* (1).Esses achados ressaltam a importância da associação de enteropatógenos em fezes diarréicas e normais, mostrando a complexidade etiológica da diarreia em bezerros.

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho colaborou para a um melhor entendimento da etiologia da diarreia por rotavírus, coronavírus, *Salmonella* spp. e patótipos de *E. coli*, mas mantém abertas questões relativas às diferenças de patogenicidade dos agentes em animais normais e diarréicos. Os resultados ressaltam a importância de se continuar investigando o papel dos enteropatógenos no desencadeamento da diarreia em bezerros.

6- CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no estudo, podem ser feitas as seguintes conclusões:

- A incidência de diarreia em bezerros é maior nas duas primeiras semanas de vida.
 - A incidência de rotavírus bovino se concentra nas três primeiras semanas de vida dos bezerros, com tendência a ocorrer mais na terceira semana.
 - A incidência de coronavírus bovino é maior nas segunda e terceira semanas de vida dos bezerros.
 - Rotavírus e coronavírus foram identificados em amostras fecais normais e diarréicas e somente o primeiro apresentou associação com a doença.
 - Foram identificadas *Salmonella* Agona, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* enterica subsp. Enterica (O:4,5) e não foi encontrada relação entre a presença da bactéria e a diarreia.
 - Em todas as amostras fecais pesquisadas, pelo menos uma colônia *Escherichia coli* foi isolada e identificada por testes bioquímicos.
- Nos animais diarréicos, foram identificados os patótipos ETEC (*K99/STa.*), STEC (*Stx1, Stx2*), EPEC (*eae*), EHEC (*Stx1/eae, Stx1/Stx2/eae*). Nos animais sem diarreia os patótipos identificados foram ETEC (*K99/STa.*), STEC (*Stx1, Stx2*), EPEC (*eae*), EHEC (*Stx1/eae, Stx2/eae*). Porém, não foi encontrada relação estatística entre os patótipos de *E. coli* e diarreia.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHÁ, S.J.; KÜHN, I.; JONSSON, P.; MBAZIMA, G.; KATOULI, M.; MOLLBY, R. Studies on calf diarrhea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. *ACTA Veterinaria Scandinavica*, v.45, n.1, p.27-36, 2004.

AHMED, A.M.; YOUNIS, E.E. A.; ISHIDA, Y.; SHIMAMOT, T. Genetic basis of multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from diarrheic calves in Egypt. *Acta Tropica*, v.111, p.144–149, 2009.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; DE CASTRO, A.F.P. 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, p.297-306, 2007.

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*, v.38, p.521-526, 2006.

- AMBROSIM, J.A.; ALMEIDA, F.S.; RIGOBELLO, E.C.; CASTRO, A.F.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; QUINTANA, J. L.; AVILA, F. A. Epidemiological, antigenic and pathogenic profile of bovine diarrhea in a Brazilian Cattle Population. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, v.55, n.1, p.15-20, 2002.
- BARBOSA, E.F.; FIGUEIREDO, H.C.P.; GARCIA, A.M.; LOBATO, Z.I.P.; LAGE, A.P. Rotavírus do grupo A em bezerros lactentes no Estado de Minas Gerais. *Ciência Rural*, v.28, n.3, p.435-439, 1998.
- BARRINGTON, G.M.; GAY, J.M.; EVERMANN, J.F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice*, v.18, n. 1, p.7-34, 2002.
- BARROW, P.A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C.A.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. Cap.14, p.231-265.
- BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; STIPP, D.T.; ALFIERI, A.A. Bovine coronavirus detection in a collection of diarrheic stool samples positive for group a bovine rotavirus. *Brazilian Archives of Biology Technology*, v.52, p.45-49, 2009.
- BARTELS, C.J.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W.A.J.M.; LAM, T.J. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v.93, p.162–169, 2010.
- BEJAN, A.; PACURAR, S.; IOVU, A.; TITILINCU, A.; COZMA V. The frequency of the elimination of *Cryptosporidium* spp, F5 *E. coli*, Rotavirus and Coronavirus in calves in central and North West Romania. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Veterinary Medicine*, v.65, n.2, p.44-48, 2008.
- BISCHOFF, K.M.; EDRINGTON, T.S.; CALLAWAY, T.R.; GENOVESE, K.J.; NISBET, D.J. Characterization of antimicrobial resistant *Salmonella* Kinshasa from dairy calves in Texas. *Letters in Applied Microbiology*, v.38, p.140-145, 2004.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M.P.; MOURINO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUAREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology*, v.54, p.309– 319, 1997.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, p.1446–1451, 1993.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. *Clínica Veterinária*. 7. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1987, 1263p.
- BOILEAU, M.J.; KAPIL, S. Bovine coronavirus associated syndromes. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.26, n.1, p.123-146, 2010.
- BULGIN, M.S.; WARD, A.C.; BARRETT, D.P.; LANE, V.M. Detection of rotavirus and coronavirus shedding in two beef cow herds in Idaho. *Canadian Veterinary Journal*, v.30, p.235–239, 1989.
- BUSATO, A.; LENTZE, T.; HOFER, D.; BURNENS, A.; HENTRICH, B.; GAILLARD, C. A case control study of potential enteric pathogens for calves raised in cow-calf

- herds. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.45, p.519-528, 1998.
- BUTLER, D.G.; CLARKE, R.C. Diarrhea and dysentery in calves. In: GYLES, C. L. *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*. Walingford: CABI Publishing, 1994. Cap.4, p.91–116.
- BUZINARO, M.G.; FREITAS, P.P.S. Rotavírus do grupo A em rebanhos bovinos leiteiros da região nordeste de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.4, p.23-26, 2002.
- BUZINARO, M.G.; MUNFORD, V.; BRITO, V.M.E.D.; RÁCZ, M.L.; JEREZ, J.A. Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, p.555-561, 2000.
- CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. *Veterinary Microbiology*, v.63, p.249–259, 1998.
- CLARK, M. A. Bovine Coronavirus. *British Veterinary Journal*, v.149, n.1, p.51-70, 1993.
- COOKE, F.J.; GINWALLA, S.; HAMPTON, M.D.; WAIN, J.; ROSS-RUSSELL, R.; LEVER, A.; FARRINGTON, M. Report of Neonatal Meningitis Due to *Salmonella enterica* Serotype Agona and Review of Breast Milk-Associated Neonatal *Salmonella* Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, n.9, p.3045-3049, 2009.
- CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, p.26–38, 2010.
- CUMMINGS, K.J.; WARNICK, L.D.; ALEXANDER, K.A.; CRIPPS, C.J.; GRÖHN, Y.T.; MCDONOUGH, P.L.; NYDAM, D.V.; REED, K.E. The incidence of salmonellosis among dairy herds in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.3766–3774, 2009a.
- CUMMINGS, K.J.; WARNICK, L.D.; ALEXANDER, K.A.; CRIPPS, C.J.; GROHN, Y.T.; JAMES, K.L.; MCDONOUGH, P.L.; REED, K.E. The duration of fecal *Salmonella* shedding following clinical disease among dairy cattle in northeastern USA. *Preventive Veterinary Medicine*, v.92, p.134-139, 2009b.
- DE LA FUENTE, R.; GARCIA, A.; RUIZ SANTA QUITERIA, J.A.; LUZOÂN, M.; CID, D.; GARCIA, S.; ORDEN, J.A.; GOÂMEZ-BAUTISTA, M. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, v.36, p.145-152, 1998.
- DE LA FUENTE, R.; LUZÓN, M.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; GARCÍA, A.; CID, D.; ORDEN, J.A.; GARCÍA, S.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, v.80, p.179-185, 1999.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D.; BRENDEL, K.A. *Epi info. Version 6: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputers*. Atlanta, Georgia, USA: Center of Disease Control and Prevention, 1994. 589p.
- DEBROY, C.; MADDOX, C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Animal Health Research Review*, v.2 p.129–140, 2001.

- DODET, B.; HESELTINE, E.; MARY, C.; SALION, P. Rotaviruses in human and veterinary medicine. *Sante*, v.7, n.3, p.195–199, 1997.
- ESTES, M.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007. Cap.53, p.1918-1976.
- FONTES, C.F. *Proposição de dois novos meios de cultura e de um sistema simplificado para identificação de enterobactérias*. 1979. 78f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia). Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- FOSTER, D.M.; SMITH, G.W. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice*, v.25, n.1, p.13-36, 2009.
- FRANCK, S.M.; BOSWORTH, B.T.; MOON, H.W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.6, p.1795-1797, 1998.
- GARAICOECHEA, L.; BOK, K.; JONES, L.R.; COMBESSIES, G.; ODEÓN, A.; FERNANDEZ, F.; PARREÑO, V. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Veterinary Microbiology*, v.118, p.1-11, 2006.
- GARCÍA, A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; ORDEN, J.A.; CID, D.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; DE LA FUENTE, R. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.23, n.1, p.175-183, 2000.
- GÜLER, L.; GÜNDÜZ, K.; OK, Ü. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. *Zoonoses Public Health*, v.55, p.249-257, 2008.
- GULLIKSEN, S.M.; JOR, E.; LIE, K. I.; HAMNES, I.S.; LOKEN, T.; AKERSTEDT, J.; OSTERAS, O. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.5057–5066, 2009.
- GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, v.85, p.45–62, 2007.
- GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C.A.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. Cap.14, p.231-265.
- HALL, G.A.; BRIDGER, J.C.; PARSONS, K.R.; COOK, R. Variation in rotavirus virulence: a comparison of pathogenesis in calves between two rotaviruses of different virulence. *Veterinary Pathology*, v.30, p.223-233, 1993.
- HERRERA-LUNA, C.; KLEIN, D.; LAPAN, G.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; HASCHEK, B.; SOMMERFELD-STUR, I.; MOESTL, K.; BOUMGARTNER, W. Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Veterinari Medicina*, v.55, p.1–11, 2009.
- HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic-acid in silver stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

- HOLLAND, R.E.. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Review*, v.3, n.4, p.345-375, 1990.
- HOLLAND, R.E.; WILSON, R.A.; HOLLAND, M.S.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MULLANEY, T.P.; WHITE, D.G. Characterization of eae⁺ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. *Veterinary Microbiology*, v.66, p.251-263, 1999.
- HOUSE, J.K.; SMITH, B.P. Current strategies for managing *Salmonella* infections in cattle. *Veterinary Medicine*, v.93, p.756-764, 1998.
- HUNTER, A.G.; MATHIESON, A.O.; SCOTT, J.A. An outbreak of *S. typhimurium* in sheep and its consequences. *The Veterinary Record*, v.98, n.7, p.126-130, 1976.
- JEREZ, J.A.; BRANDÃO, P.E.; BUZINARO, M.G.; GREGORI, F.; ROSALES, C.A.R.; ITO, F.H.; SAKA, T. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarréia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.2, p.19-23, 2002.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, p.123-138, 2004.
- KAPIL, S, TRENT, A.M., GOYAL, S.M. Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. *Archives of Virology*, v.115, p.127-132, 1990.
- LANGONI, H.; LINHARES, A.C.; AVILA, F.A.; DA SILVA, A.V.; ELIAS, A.O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, p.313-319, 2004.
- LAX, A.J.; BARROW, P.A.; JONES, P.W. Current perspectives in Salmonellosis. *British Veterinary Journal*, v.151, n.4, p.351-377, 1995.
- LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B.E.; IRINO, K.; VETTORATO, M.P.; ONUMA, D.L.; DE CASTRO, A.F. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.97, p.103-109, 2003.
- LUCHELLI, A.; LANCE, S.E.; BARTLETT, P.B.; MILLER, G.Y.; SAIF, L.J. Prevalence of bovine group A bovine rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. *American Journal of Veterinary Research*, v.53, p.169-179, 1992.
- MAINIL, J.G.; JACQUEMIN, E.R.; KAECKENBEECK, A.E.; POHL, P.H. Association between the effacing (eae) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, p.1064-1068, 1993.
- MAYAMEEI, A.; MOHAMMADI, G.; YAVARI, S.; AFSHAR, E.; OMIDI, A. Evaluation of relationship between Rotavirus and Coronavirus infections with calf diarrhea by capture ELISA. *Comparative Clinical Pathology*, v.19, p.553-557, 2010.
- McNULTY, M.S.; LOGAN, E.F. Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. *The Veterinary Record*, v.13, p.33-35, 1983.
- MEBUS, C.A.; UNDERDAHL, N.R.; RHODES, M.B.; TWIEHAUS, M.J. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus

from field outbreak. *Nebraska Agricultural Experiment Station*, n.233, p.1-16, 1969.

MEBUS, C.A; STAIR, E.L.; RHODES, M.B; TWIEHAUS, M.J. Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation and characteristics of a corona-like agent. *American Journal of Veterinary Research*, v.34, p.173-178, 1973.

MENDONÇA, C.L.; LAZARO, N.S.; CASTRO, R.S; AFONSO, J.A.B.; HOFER, E. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. in calves in the southern Agreste region of the State of Pernambuco, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.16, n.4, p.127-131, 1996.

MOHLER, V.L.; HOUSE, J. Salmonellosis in ruminants. In: *Current veterinary therapy: Food animal practice*. 5. ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2009. Cap.25, p.106-111.

MOHLER, V.L.; IZZO, M.M.; HOUSE, J.K. *Salmonella* in calves. *Veterinary Clinic of North America Food Animal Practice*, v.25, p.37-54, 2009.

MORRIS, A.P.; ESTES, M.K. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VIII. Pathological consequences of rotavirus infection and its enterotoxin. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, v.281, p.303-310, 2001.

NAYLOR, J.M. Neonatal calf diarrhea. In: *Current veterinary therapy: Food animal practice*. 5. ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2009. Cap.21, p.70-77.

OK, M.; GÜLER, L.; TURGUT, K. ; OK, Ü. ; SEN, I. ; GÜNDOZ, I. K. ; BIRDANE, M. F. ; GÜZELBEKTES, H. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers

of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*, v.56, p.94-101, 2009.

OLIVEIRA FILHO, J.P.; SILVA, D.P.G.; PACHECO, M.D.; MASCARINI, L.M.; RIBEIRO, M.G.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; STIPP, D.T.; BARROS, B.J.P.; BORGES, A. S. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.10, p.419-424, 2007.

ORDEN, J.A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; CID, D.; GARCIA, S.; SANS, R.; DE LA FUENTE, R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1-30 days-old diarrhoeic dairy calves. *Veterinary Microbiology*, v.63, p.239-248, 1998.

PARREÑO, V.; BEJAR, C.; VAGNOZZI, A.; BARRANDEGUY, M.; COSTANTINI, V.; CRAIG, M.I.; YUAN, L.; HODGINS, D.; SAIF, L.; FERNANDEZ, F.. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.100, p.7-24, 2004.

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.; BARTH, O.M.; SUTMOLLER, F.; DE FARIAS, V.; VIDAL, M.N. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.78, n.4, p.483-490, 1983.

PEREIRA, R.N.; ÁVILA, F.A.; FERNANDES, S.A. Estudo do perfil epidemiológico da salmonelose em bezerros e da sensibilidade a antimicrobianos na região de Ribeirão

Preto-SP, Brasil. *Ars Veterinaria*, v.20, p.62-66, 2004.

PÉREZ, E.; KUMMELING, A.; JANSSEN, M.M.H.; JIMCNEZ, C.; ALVARADO, R.; CABALLERO, M.; DONADO, P.; DWINGER, R.H. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilaran, Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine*, v.33, p.195-205, 1998.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007, 2156p.

REYNOLDS, D.; HALL, G.; DEBNEY, T.; PARSONS, K. Pathology of natural rotavirus infection in clinically normal calves. *Research in Veterinary Science*, v.38, p.264-269, 1985.

REYNOLDS, D.J.; MORGAN, J.H.; CHANTER, N.; JONES, P.W.; BRIDGER, J.C.; DEBNEY, T.G.; BUNCH, K.J. Microbiology of calf diarrhea in southern Britain. *Veterinary Records*, v.119, n.2, p.34-39, 1986.

RICHARDSON, A. Outbreaks of bovine salmonellosis caused by serotypes other than *S. dublin* and *S. typhimurium*. *The Journal of Hygiene*, v.74, p.195-203, 1975.

RIGOBELLO, E.C.; GAMEZ, H.J.; MARIN, J.M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J.A.; ÁVILA, F.A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, p.305-310, 2006.

RINGS, D. M. Salmonellosis in calves. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, v.1, n.3, p.529-539, 1985.

SAIF, L.J. Coronaviridae. In: MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. *Fenner's veterinary virology*. 4. ed. London: Academic Press, 2011. Cap. 24, p. 393-413a.

SAIF, L. J. Reoviridae. In: MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. *Fenner's veterinary virology*. 4. ed. London: Academic Press, 2011. Cap. 24, p. 275-291b.

SAIF, L. J.; REDMAN, D.R.; SMITH, K.L.; THEIUL, K.W. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or non immunized cows. *Infection and Immunity*, v.41, p.1118-1131, 1983.

SAIF, L.J.; REDMAN, D.R.; THEIL, K.W. Experimental coronavirus infection in calves: viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *American Journal of Veterinary Research*, v.47, p.1426-1432, 1986.

SALVADORI, M.R.; VALADARES, G.F.; LEITE, D.S.; BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.230-235, 2003.

SNODGRASS, D.R.; TERZOLO, H.R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J.D.; SYNGE, B.A. Aetiology of diarrhea in young calves. *Veterinary Record*, v.119, p.31-34, 1986.

STIPP, D.T.; BARRY A.F.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. *Tropical Animal Health and Production*, v.41, n.7, p.1563-1567, 2009.

- SWIATEK, D.L.; PALOMBO, E.A.; LEE, A.; COVENTRY, M.J.; BRITZ, M L.; KIRKWOOD, C.D. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. *Veterinary Microbiology*, v.140, p.56-62, 2010
- TAKIUCHI, E.; STIPP, D.T.; ALFIERI A.F.; ALFIERI, A.A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *Journal of Virological Methods*, v.131, n.2, p.148-154, 2006.
- TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v.38, p.119-127, 1996
- TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of Salmonella serovars: increase of Salmonella Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v.38, p.315-332, 1996.
- THEIL, K.W.; MCCLOSKEY, C.M.; SAIF, L.J.; REDMAN, D.R.; BOHL, E.H.; HANCOCK, D.D.; KOHLER, E.M.; MOORHEAD, P.D. Rapid simple method of preparing rotaviral double-stranded ribonucleic-acid for analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.14, n.3, p.273-280, 1981.
- TORRES-MEDINA, A.; SCHLAFER, D.H.; MEBUS, C.A. Rotaviral and coronaviral diarrhea. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.1, n.3, p.471-493, 1985.
- TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, S.W.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.; NYDAM, D.V.; PEREGRINE, A.S. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, v.82, p.12-28, 2007.
- TZIPORI, S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. *The Veterinary Record*, v.108, p.510-514, 1981.
- TZIPORI, S. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, v.29, p.103-206, 1985.
- WALTMAN, W.D. Methods for the cultural isolation of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella in Domestic Animals*. 1. ed. London: CABI Publishing, 2000. Cap.21, p.355-372.
- WANI, S.A.; HUSSAIN, I.; NABI, A.; FAYAZ, I.; NISHIKAWA, Y. Variants of eae and Stx genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non- O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from calves. *Letters in Applied Microbiology*, v.45, p.610–615, 2007.
- WRAY, C.; DAVIES, R.H. *Salmonella* infections in cattle. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella in Domestic Animals*. 1. ed. London: CABI Publishing, 2000. Cap.10, p.169-190.
- YOUNIS, E.E.; AHMED, A.M.; EL-KHODERY, S.A.; OSMAN, S.A.; EL-NAKER, Y.F.I. Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt. *Research in Veterinary Science*, v.87, p.373–379, 2009.

ZHANG, S.; SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; STENDER, S.; HARDT, W.D.; BAUMLER, A.J.; ADAMS, L. G. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and Immunity*, v.70, p.3843-3855, 2002.