

Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico¹

José P. Oliveira Filho^{2*}, Daniel P.G. Silva³, Marcelo D. Pacheco⁴, Luciene M. Mascarini⁵, Marcio G. Ribeiro⁶, Amauri A. Alfieri⁷, Alice F. Alfieri⁷, Danilo T. Stipp⁷, Breno J.P. Barros⁸ e Alexandre S. Borges²

ABSTRACT. - Oliveira Filho J.P., Silva D.P.G., Pacheco M.D., Mascarini L.M., Marcio Garcia Ribeiro, Alfieri A.A., Alfieri A.F., Stipp D.T., Barros B.J.P. & Borges A.S. 2007. **[Diarrhea in Nelore calves: Clinical and etiologic study.]** Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(10):419-424. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu s/n, Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, SP 18618000, Brazil. E-mail: zep.filho@hotmail.com

Diarrhea is considered as one of the main causes of morbidity and mortality in neonates calves. Fecal samples from 100 diarrheic and 30 non-diarrheic (control group) Nelore calves less than 9 weeks old were collected for *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium* spp., and for helminth eggs investigation. Enteropathogens were detected in 79.0% diarrheic samples and 70.0% non-diarrheic samples. Among diarrheic calves, *Escherichia coli* (69.0%) was the most common agent found, following by *Cryptosporidium* spp. (30.0%), coronavirus (16.0%), and rotavirus (11.0%). In the control group, *E. coli*, *Cryptosporidium* spp. and coronavirus were detected in 66.7%, 10.0% and 3.3% of the samples, respectively. *Salmonella* spp. and strongylids were not found in any of the calves from either group. The K99 fimbrial only was detected in *E. coli* strains from diarrheic calves (5.8%). Enrofloxacin, norfloxacin, and gentamicin were the most effective among the antimicrobials tested. The weight of 210-day-old calves did not show statistic differences between diarrheic and non-diarrheic calves.

INDEX TERMS: Beef calves, Nelore, diarrhea, enteropathogens, etiology.

RESUMO. - A diarréia é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade de bezerros neonatos. Foram colhidas 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*, 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. No grupo de bezerros com diarréia, *E. coli* (69,0%) foi o agente mais freqüentemente isolado, seguido de *Cryptosporidium* spp. (30,0%), coronavírus (16,0%) e rotavírus (11,0%). No grupo controle, *E. coli*, *Cryptosporidium* spp. e coronavírus foram detectados, respectiva-

¹ Recebido em 21 de junho de 2007.

Aceito para publicação em 8 de agosto de 2007.

Parte da Dissertação do primeiro autor, apresentada no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu.

² Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Unesp-Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brasil. *Autor para correspondência: zep.filho@hotmail.com

³ Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Av. Paranjana 1700, Fortaleza, CE 60740903. E-mail: dpgsilva@hotmail.com

⁴ Médico Veterinário, Rua Adolfo Balarin 222, Botucatu, SP 18610230.

⁵ Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp-Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618000. E-mail: luciene@ibb.unesp.br

⁶ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, Unesp-Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618000. E-mail: mgribeiro@fmvz.unesp.br

⁷ Laboratório de Virologia Animal, Depto Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Campus Universitário, Londrina, PR 86051970. E-mail: alfieri@uel.br

⁸ Logos Beef, Praça Isabel Arruda 157, sala 103, Botucatu, SP 18602111. E-mail: bjpbarros@uol.com.br

mente, em 66,7%, 10,0% e 3,3% das amostras. *Salmonella* spp. e ovos de estrongilídeos não foram encontrados nos dois grupos avaliados. A fímbria K99 foi identificada exclusivamente nas linhagens de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia (5,8%). Entre os antimicrobianos avaliados “in vitro” a enrofloxacin, a norfloxacin e a gentamicina foram os mais efetivos. O peso dos bezerros aos 210 dias de idade não apresentou diferença significativa entre os animais com e sem diarreia.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bezerros de corte, Nelore, diarreia, enteropatógenos, etiologia.

INTRODUÇÃO

Os distúrbios entéricos representam grande fator de prejuízos econômicos para a pecuária bovina de corte brasileira, acarretando cerca de 2% de mortalidade em bezerros (Mota et al. 2000). A diarreia em bezerros da raça Nelore é considerada a principal causa de perdas econômicas em rebanhos de corte em vários Estados do Brasil (Barbosa et al. 1998, Benesi 1999, Mota et al. 2000).

A diarreia neonatal bovina é reconhecida como síndrome, visto que decorre da interação entre fatores como a imunidade, o ambiente, a nutrição e a infecção por diferentes microrganismos com potencial patogênico (Benesi 1999).

Enteropatógenos de origem bacteriana, parasitária e viral podem estar envolvidos, isolados ou em associação, na casuística de diarreia em bezerros, com destaque para *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., rotavírus, coronavírus e protozoários dos gêneros *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp. (Fagan et al. 1995, Alves 1997, Langoni et al. 2004), muitos dos quais com potencial zoonótico na ocorrência de distúrbios entéricos em seres humanos.

Apesar dos prejuízos desencadeados pela diarreia na pecuária bovina de corte, são escassos os estudos no Brasil enfocando a identificação em conjunto dos principais enteropatógenos em bezerros de corte, criados extensivamente (Salvadori et al. 2003). O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de *E. coli*, *Salmonella* spp., rotavírus, coronavírus, *Cryptosporidium* spp. e ovos de helmintos em fezes diarreicas e não diarreicas de bezerros da raça Nelore, criados em sistema extensivo; detectar o fator de colonização K99 (F5) em estirpes de *E. coli* e avaliar o perfil de sensibilidade frente às drogas antimicrobianas.

MATERIAL E MÉTODOS

Características gerais do local do experimento

O estudo foi conduzido em uma propriedade de criação extensiva de bovinos Nelore localizada no município de Comodoro na região oeste do Estado do Mato Grosso, Brasil, com 30.000 hectares de pasto, formado principalmente por *Brachiaria* sp., divididos em 5 retiros, onde eram criadas aproximadamente 10.000 vacas incluindo múltiparas e primíparas. A reprodução era realizada por inseminação artificial seguida do repasse com touros a campo. A estação de parição se estendeu entre os meses de outubro a janeiro, com cerca de 7.000 nascimentos de bezerros em piquetes maternidade, com taxa de lotação de uma unidade animal por hectare. Os animais tinham à disposição suplemento mineral e água proveniente de cacimbas, cochos e/ou riachos. Ao nascer os bezerros recebiam 200µg/

kg de peso vivo de anti-helmíntico a base de doramectina, via subcutânea, e aplicação tópica de solução de iodo para anti-sepsia umbilical.

Amostras de fezes

Foram colhidas aleatoriamente amostras fecais de 100 bezerros apresentando diarreia e de 30 animais sem sinais entéricos (Grupo Controle), com até nove semanas de idade, criados extensivamente. A colheita de fezes foi realizada nas primeiras 24 horas após o início da diarreia e antes da instituição de qualquer tipo de tratamento antimicrobiano, durante os dois primeiros meses da estação de parição. As fezes dos bezerros do grupo controle foram colhidas após a amostragem dos bezerros com diarreia. Este procedimento teve por objetivo assegurar que os bezerros do grupo controle não tivessem apresentado manifestação entérica prévia. Os bezerros de ambos os grupos foram observados desde o nascimento até o momento da colheita das amostras. Todas as amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal de cada um dos bezerros, utilizando luvas de látex estéreis. O material foi dividido em cinco alíquotas e armazenado em recipientes estéreis de boca larga.

As fezes foram analisadas quanto ao aspecto visual macroscópico, odor, presença de estrias de sangue e classificadas em diarreicas e não diarreicas. Todos os bezerros foram marcados e tatuados, além de pesados ao nascimento e aos 210 dias de vida. Os resultados foram anotados em fichas individuais.

As amostras fecais para a pesquisa de enterobactérias e *Cryptosporidium* spp. foram mantidas refrigeradas (4 a 8°C), enquanto que as amostras para detecção viral (rotavírus e coronavírus) foram congeladas (-20°C) até o momento do processamento. Com exceção do exame de Gordon & Whitlock (1939) modificado para contagem de ovos por grama de fezes, realizado imediatamente após a colheita, as demais alíquotas foram encaminhadas em até 24 horas aos locais de processamento.

Exames bacteriológicos

Para a detecção de enterobactérias as amostras fecais foram semeadas nos meios de ágar sangue ovino (5%) e ágar MacConkey, incubadas à 37°C, em condições de aerobiose, com leitura e identificação das colônias em 24, 48 e 72 h. Paralelamente, a mesma amostra foi semeada no meio seletivo de Tetracionato, incubadas à 37°C, em condições de aerobiose por 12 h para posterior repique em ágar *Salmonella* - *Shigella* (SS), nas mesmas condições descritas para a semeadura direta (Edwards & Ewing 1972). Os microrganismos foram identificados segundo suas características de cultivo, morfotintórias e bioquímicas (Krieg & Holt 1984).

A sensibilidade das bactérias isoladas frente às drogas antimicrobianas foi avaliada “in vitro” pelo teste de difusão com discos (Bauer et al. 1966), contendo os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10mg), ceftiofur (30mg), enrofloxacin (5mg), florfenicol (30mg), gentamicina (10mg), neomicina (30mg), norfloxacin (10mg), sulfametoxazol / trimetoprim (25mg) e tetraciclina (30mg).

A detecção de fímbrias de adesão K99 (F5) das linhagens de *E. coli* foi realizada pelo teste de aglutinação em látex utilizando o “Kit Fimbrex[®] K99⁹”, segundo Thorns et al. (1989).

Exames virológicos

A detecção do rotavírus e do coronavírus foi realizada por meio de técnicas moleculares. Para a extração do ácido nucléico, a partir da emulsão fecal, foi utilizada uma associação das técnicas do fenol-clorofórmio-alcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina

⁹ Kit Fimbrex[®] Veterinary Laboratories Agency, Department for Environment, Food & Rural Affairs, United Kingdom.

descrita por Alfieri et al. (2004). O rotavírus bovino foi detectado por eletroforese em gel de poli-acrilamida a 7,5% (PAGE) corado com nitrato de prata (Pereira et al. 1985). O coronavírus bovino foi detectado pela reação em cadeia da polimerase ("semi nested"-PCR) de acordo com Takiuchi et al. (2006).

Exames parasitológicos

Identificação do gênero *Cryptosporidium*. As amostras de fezes para a pesquisa do gênero *Cryptosporidium* foram conservadas, até o momento do processamento, em solução salina tamponada (PBS) pH 7, acrescida de formalina a 10%, na proporção de 1:3. A concentração de oocistos foi realizada pela técnica de sedimentação por centrifugação em gradiente de densidade (Waldman et al. 1986). As lâminas foram coradas pelo método Ziehl-Nielsen modificado, segundo Henriksen & Pohlenz (1981).

Análise quantitativa do número de ovos por grama de fezes.

O exame quantitativo para contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizado pelo método Gordon & Whitlock (1939) modificado, utilizando-se câmara de McMaster, imediatamente após a colheita das fezes.

Análise dos resultados

A associação entre a ocorrência dos diferentes enteropatógenos nos animais com e sem diarreia foi realizada pelo teste de comparação de duas proporções, considerando significativo os valores de $P < 0,05$. A comparação entre o peso dos bezerros a desmama e a presença dos diferentes enteropatógenos ao longo do estudo foi avaliada pelo teste *t*, com significância de 5% (Mead et al. 1993).

RESULTADOS

Ao longo das nove primeiras semanas de idade dos bezerros a maior ocorrência de diarreia foi observada entre a quinta e oitava semanas, com pico da casuística na sexta semana (Fig.1).

Foram detectados microrganismos em 79,0% (79/100) das amostras diarréicas, sendo que em 51,9% (41/79) foi identificada a participação de somente um agente e em 48,1% (38/79) de múltiplos agentes. No grupo controle, a taxa de detecção dos enteropatógenos nas amostras fecais foi de 70,0% (21/30), nos quais foi verificada infecção isolada em 85,7% (18/21) dos animais.

Os principais enteropatógenos identificados no decorrer do estudo nos bezerros com e sem diarreia estão resumidos na Fig.2, sendo observadas diferenças estatísticas ($P < 0,05$)

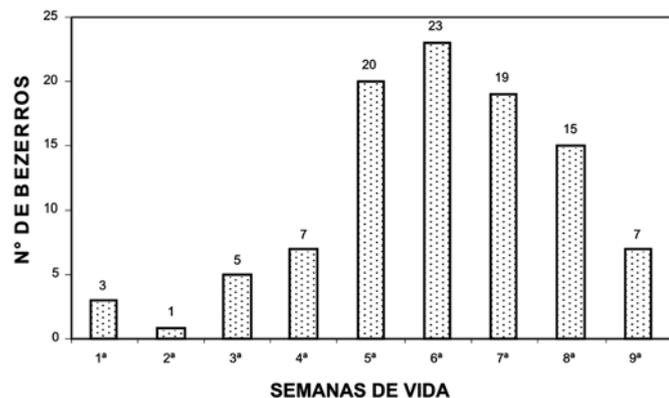


Fig.1. Distribuição dos casos de diarreia em 100 bezerros Nelore, ao longo de 9 semanas de vida. Município de Comodoro, Mato Grosso, 2006.

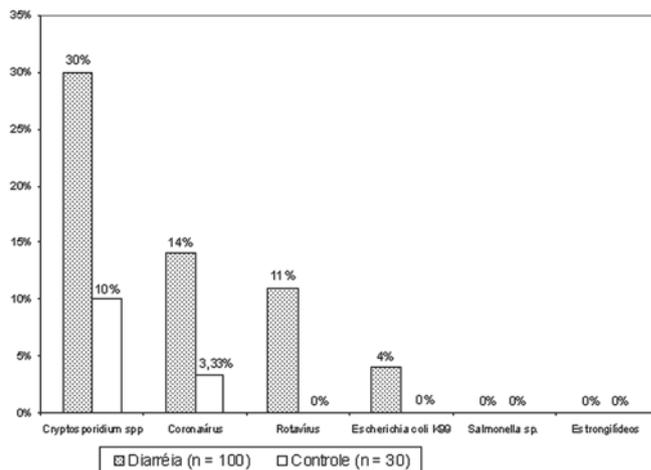


Fig.2. Freqüência de isolamento de enteropatógenos em amostras fecais de bezerros da raça Nelore, com até 9 semanas de idade, com e sem diarreia. Município de Comodoro, Mato Grosso, 2006.

entre os grupos para a ocorrência do *Cryptosporidium* spp., coronavírus, rotavírus e *Escherichia coli* K99.

Salmonella spp. e ovos de estrongilídeos não foram detectados nos animais dos grupos com diarreia e controle.

Rotavírus foi detectado em 11,0% dos animais com diarreia, não sendo identificado nos animais do grupo controle (Fig.2).

As associações mais prevalentes de enteropatógenos nos bezerros com diarreia foram: *Cryptosporidium* spp. e *E. coli* (20,0%); coronavírus e *E. coli* (5,0%); coronavírus, *Cryptosporidium* spp. e *E. coli* (5,0%). No grupo controle foram observadas associações entre *Cryptosporidium* spp. e *E. coli* (6,7%), e entre coronavírus e *E. coli* (3,3%) (Quadro 1).

O fator de colonização K99 (F5) foi detectado em 5,8% (4/69) das linhagens de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia, representando 4% (4/100) do total de amostras fecais diarréicas, não sendo detectado no grupo controle (Fig.2). Nos ani-

Quadro 1. Detecção de enteropatógenos, isolados ou em associação, em amostras fecais diarréicas e normais de bezerros de corte com até 60 dias de idade. Município de Comodoro, Mato Grosso, 2006

Enteropatógenos	Grupo com diarreia		Grupo Controle		p-Value
	No. ^a	(% ^b)	No.	(%)	
<i>Escherichia coli</i>	34a*	(34,0)	17b	(56,7)	0,026
Rotavírus	3	(3,0)	0	(0,0)	0,079
Coronavírus	1	(1,0)	0	(0,0)	0,315
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	(3,0)	1	(3,3)	0,928
<i>Salmonella</i> sp.	0	(0,0)	0	(0,0)	1,000
Estrongilídeos	0	(0,0)	0	(0,0)	1,000
<i>E. coli</i> + Rotavírus	3	(3,0)	0	(0,0)	0,079
<i>E. coli</i> + Coronavírus	5	(5,0)	1	(3,3)	0,627
<i>E. coli</i> + <i>Cryptosporidium</i> spp.	20a	(20,0)	2b	(6,7)	0,028
Rotavírus + Coronavírus	2	(2,0)	0	(0,0)	0,153
Rotavírus + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	(1,0)	0	(0,0)	0,315
<i>E. coli</i> + Rotavírus + Coronavírus	1	(1,0)	0	(0,0)	0,315
<i>E. coli</i> + Rotavírus + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	(1,0)	0	(0,0)	0,315
<i>E. coli</i> + Coronavírus + <i>Cryptosporidium</i> spp.	5a	(5,0)	0b	(0,0)	0,022

^a Número de amostras isoladas, ^b porcentagem. * Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 2. Perfil de sensibilidade a diferentes antimicrobianos pelo teste de difusão de disco em 69 estirpes de *E. coli*, isoladas das fezes de bezerros da raça Nelore com diarreia e de 20 linhagens de *E. coli* isoladas das fezes de bezerros sem sinais entéricos (controle). Município de Comodoro, Mato Grosso, 2006

Antimicrobianos	Grupo com diarreia			Grupo Controle		
	Sensíveis		Resistentes	Sensíveis		Resistentes
	No. ^a	(% ^b)		No. (%)	No. (%)	
Enrofloxacin	64 (92,8)	5 (7,2)	69	20 (100,0)	0 (00,0)	20
Norfloxacin	64 (92,8)	5 (7,2)	69	20 (100,0)	0 (00,0)	20
Gentamicina	63 (91,3)	6 (8,7)	69	20 (100,0)	0 (00,0)	20
Florfenicol	63 (91,3)	6 (8,7)	69	20 (100,0)	0 (00,0)	20
Sulfametoxazol/Trimetoprim	63 (91,3)	6 (8,7)	69	20 (100,0)	0 (00,0)	20
Ceftiofur	61 (88,4)	8 (11,6)	69	17 (85,0)	3 (15,0)	20
Neomicina	55 (79,7)	14 (20,3)	69	13 (65,0)	7 (35,0)	20
Tetraciclina	48 (69,6)	21 (30,4)	69	14 (70,0)	6 (30,0)	20
Ampicilina	47 (68,1)	22 (31,9)	69	13 (65,0)	7 (35,0)	20

^a Número de amostras isoladas, ^b porcentagem.

mais diarreicos portadores de *E. coli* K99⁺ não foram identificados nenhum outro enteropatógeno.

Enrofloxacin e norfloxacin (92,75%), seguidas da gentamicina, florfenicol e sulfametoxazol / trimetoprim (91,3%) foram os antimicrobianos com maior efetividade frente às linhagens de *E. coli* isoladas nos animais com diarreia, enquanto que as maiores taxas de resistência foram observadas para os antimicrobianos tetraciclina (30,4%) e ampicilina (31,9%). No grupo controle foi possível observar taxas de 100,0% de sensibilidade das linhagens de *E. coli* frente à enrofloxacin, norfloxacin, gentamicina, florfenicol e sulfametoxazol / trimetoprim. Neste grupo, as maiores taxas de resistência das linhagens de *E. coli* foram observadas com uso da neomicina (35,0%), tetraciclina (35,0%) e ampicilina (30,0%) (Quadro 2). As quatro linhagens de *E. coli* K99⁺ também apresentaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos testados.

Oocistos de *Eimeria* spp. e *Giardia* sp. não foram detectados na contagem de ovos por grama de fezes.

Até os 210 dias de idade não foi constatado nenhuma morte entre os animais dos dois grupos estudados. Nesta ocasião, a média dos pesos ao desmame dos bezerros do grupo controle e com diarreia foi, respectivamente, 165,5kg ($\pm 19,45$ kg) e 163,4kg ($\pm 22,54$ kg), não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos.

DISCUSSÃO

A maior ocorrência de diarreia nos bezerros estudados ocorreu entre a quinta e oitava semanas de idade. Estudos similares no Brasil, também têm observado altas taxas de ocorrência de diarreia em bezerros nas primeiras semanas de idade dos animais, variando nas frequências de acometimento de acordo com as diferentes regiões do país (Leite & Lima 1982). No presente estudo, a alta ocorrência dos casos de diarreia neste período provavelmente encontra reflexo na taxa de lotação, no livre acesso dos bezerros a reservatórios com água estagnada e contaminada com fezes (cacimbas), e no declínio da imunidade passiva (Mota et al. 2000).

Snodgrass et al. (1986) na Escócia e na Inglaterra, e McDonough et al. (1994) nos Estados Unidos da América (EUA), também identificaram enterobactérias, respectivamente, em 72,0% das amostras diarreicas de bezerros de corte e leite, e em 86,0% das amostras diarreicas de bezerros de leite. Essas taxas de detecção são muito próximas às obtidas no presente trabalho. Contudo, Fagan et al. (1995) na Irlanda e Langoni et al. (2004) no Brasil avaliando amostras fecais diarreicas de bezerros de rebanhos leiteiros obtiveram ocorrência superior à encontrada nos 130 animais avaliados.

Escherichia coli foi a enterobactéria mais frequentemente isolada nas fezes dos bezerros com e sem diarreia. Resultado similar foi descrito em outros estudos, ratificando a necessidade da presença de fatores de virulência nas linhagens para a ocorrência de diarreia (Mendonça et al. 1996, Alves 1997, Langoni et al. 2004).

A fimbria K99 (F5) é considerada o principal fator de colonização das linhagens de *E. coli* associadas à diarreia em bezerros. A detecção dessa fimbria em 5,8% (4/69) das linhagens de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros com diarreia, foi equivalente aos resultados obtidos por outros autores (Salvadori et al. 2003), que também identificaram, em bezerros de corte com diarreia, a fimbria K99 em 7,3% das linhagens de *E. coli*. Essa fimbria foi encontrada em 31,3% de linhagens de *E. coli* isoladas de bezerros de corte com diarreia (Avila et al. 2000) estudados no Brasil. No entanto, em estudos similares, no Canadá (Ganaba et al. 1995) e no Brasil (Langoni et al. 2004), que investigaram, respectivamente, bezerros de corte e bezerros de leite com diarreia, K99 não foi observada nas linhagens isoladas das fezes desses animais. A baixa ocorrência de K99 nas linhagens de *E. coli* isoladas dos animais com diarreia sugere o envolvimento de outros fatores de colonização como K88, 987P, F17 e F40, na gênese da colibacilose em bezerros neonatos no Brasil (Yano et al. 1988, Lage et al. 1993, Lazaro et al. 1994a,b, Avila et al. 1996, Ugrinovich et al. 2002, Leomil et al. 2003).

Os testes de sensibilidade microbiana "in vitro" das linhagens de *E. coli* isoladas nos dois grupos estudados constataram a maior efetividade da enrofloxacin, norfloxacin, gentamicina, florfenicol e da associação sulfametoxazol e trimetoprim. Esses resultados são equivalentes aos obtidos em estudos realizados nos EUA (Zeman et al. 1989) e no Brasil (Lazaro et al. 1994a,b), que revelaram elevada sensibilidade de linhagens de *E. coli* à gentamicina e a associação sulfametoxazol/trimetoprim. Mendonça et al. (1996) e Mota et al. (2000), também no Brasil, embora tenham encontrado alta efetividade da gentamicina, enrofloxacin e florfenicol, não obtiveram boa efetividade da associação sulfa/trimetoprim.

Altas taxas de resistência *in vitro* das linhagens de *E. coli* isoladas nos animais estudados foram observadas frente à neomicina, tetraciclina e ampicilina. Resultados similares foram encontrados em outros países (Zeman et al. 1989) e no Brasil (Lazaro et al. 1994b, Mendonça et al. 1996, Mota et al. 2000). O uso rotineiro de produtos à base de tetraciclina no tratamento de diversas enfermidades poderia justificar as altas taxas de resistência das linhagens de *E. coli* nos animais amostrados (Lazaro et al. 1994b, Mendonça et al. 1996, Mota

et al. 2000), decorrente do aumento da pressão seletiva para linhagens de *E. coli* resistentes a este antimicrobiano.

A ausência do isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* difere dos resultados descritos por outros autores (Snodgrass et al. 1986, Mendonça et al. 1996, Alves 1997, Langoni et al. 2004), que a partir do cultivo de fezes diarréicas de bezerros com até 6 semanas de vida obtiveram isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* em de 3,43%-33,69% da amostragem. Contudo, os resultados de outras pesquisas (Fagan et al. 1995 e Mota et al. 2000) mostram resultados semelhantes aos achados do presente estudo e também não isolaram este enteropatógeno em fezes diarréicas de bezerros com até oito semanas de idade. Apesar da não identificação dessa enterobactéria, o diagnóstico do gênero *Salmonella* sempre deve ser considerado no plano diagnóstico de bezerros apresentando distúrbios entéricos, em virtude da gravidade das manifestações entéricas, assim como do risco para evolução de processos septicêmicos, freqüentemente relacionados às infecções por este enteropatógeno.

No Brasil, vários estudos detectaram rotavírus em bezerros leiteiros com diarréia (Alves 1997, Barbosa et al. 1998, Jerez et al. 2002). Entretanto, são escassos os relatos nacionais da participação do agente na etiologia da diarréia em bezerros de corte. O isolamento de rotavírus de fezes diarréicas de bezerros de corte, criados em regime semi-extensivo foi feito pela primeira vez em surtos ao longo de três estações de parição seguidas, com freqüências de 41,7%-82,4% (Buzinaro et al. 2003) e logo a seguir esse vírus foi isolado de fezes de bezerros de corte criados extensivamente (Alfieri et al. 2004). No presente estudo foi observado somente 11,0% de amostras fecais diarréicas positivas para rotavírus e ausência de identificação do vírus nos animais do grupo controle. Apesar da menor ocorrência encontrada comparativamente a outros estudos, o rotavírus é apontado como um dos principais enteropatógenos na gênese de distúrbios entéricos em bezerros (Alfieri et al. 2004), merecendo ser aventado no diagnóstico diferencial de causas de diarréia em ruminantes domésticos.

O coronavírus bovino é apontado como importante causa de diarréia em bezerros (Snodgrass et al. 1986, Fagan et al. 1995, De La Fuente et al. 1999). No Brasil, estudos evidenciaram a participação desse vírus como agente etiológico de diarréias neonatais em bovinos de leite e de corte (Médici et al. 2001, Jerez et al. 2002). Takiuchi et al. (2006) detectaram, recentemente no Brasil, o coronavírus em 32% (8/25) das amostras de fezes provenientes de bezerros diarréicos de rebanhos de corte e de leite. No presente estudo, o coronavírus foi encontrado em 14,0% dos animais com diarréia, predominantemente associado com outros enteropatógenos, ratificando a importância da associação dos efeitos patogênicos de enteropatógenos na ocorrência de diarréia em bezerros.

Cryptosporidium spp. foram o segundo enteropatógeno mais freqüentemente encontrado nos bezerros diarréicos (Fig.2), confirmando os resultados de outros autores que apontam este protozoário como um dos mais preocupantes enteropatógenos de ruminantes domésticos (De La Fuente et al. 1999, Joachim et al. 2003). No Brasil, *Cryptosporidium* spp. também já foram identificados como causa de diarréia em bezerros provenientes de

rebanhos com aptidão leiteira (Ortolani 1988, Feitosa et al. 2004, Langoni et al. 2004). No presente estudo, a freqüência de ocorrência desse protozoário foi significativamente maior no grupo diarréico comparativamente ao grupo controle ($P=0,005$), em consonância com os achados descritos por outros autores (Kaminjolo et al. 1993). Contudo, não têm sido observadas diferenças significativas nas taxas de ocorrência desse parasita entre animais com e sem manifestações entéricas (Snodgrass et al. 1986, Garcia & Lima 1994). Estas divergências, descritas por diferentes autores, podem encontrar justificativa nas distintas práticas de manejo adotadas na criação dos animais, que envolvem desde aspectos de densidade populacional, estratificação dos animais por idade, condições de higiene e virulência dos microrganismos que podem influenciar na ocorrência do gênero *Cryptosporidium* em criações de bezerros de corte (Ortolani 1988).

Avaliando 203 amostras fecais de bezerros leiteiros com diarréia, no Brasil foi constatada a presença de ovos de estrogilídeos em 2,5% da amostragem (Langoni et al. 2004). Nos 130 animais estudados não foi evidenciada a presença de amostras fecais positivas para estrogilídeos, provavelmente em virtude da forma extensiva de criação e do uso sistemático de anti-helmínticos nos animais do rebanho.

E. coli, coronavírus e *Cryptosporidium* sp. foram identificados tanto nos animais com diarréia como no grupo controle, ratificando que a manifestação clínica da diarréia pelos diferentes enteropatógenos depende, dentre outros fatores, da virulência dos microrganismos, do perfil imunológico das vacas e dos bezerros e das práticas de manejo adotadas em propriedades de criação de bezerros.

A ausência de morte entre os bezerros com diarréia e a não observação de diferença significativa entre os pesos a desmama dos dois grupos, contrariaram vários autores que apontam à mortalidade e a queda no desenvolvimento ponderal como um dos principais fatores relacionados com a diarréia neonatal em bezerros de corte (Magalhães et al. 1991, Clement et al. 1993, Wittum et al. 1994, Mota et al. 2000).

Os resultados do presente estudo ressaltam para a associação de diferentes enteropatógenos nos animais com e sem diarréia, mostrando a importância da investigação dos distúrbios entéricos de bezerros de corte sob a forma de síndrome. O reconhecimento dos enteropatógenos norteia a adoção de medidas efetivas de prevenção e controle, além de alertar para os reflexos em saúde pública, em virtude do potencial zoonótico de vários destes patógenos entéricos.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Bolsa de Mestrado), ao Grupo Braido Agropecuária e ao Laboratório Pfizer Ltda, Setor Saúde Animal, pelo amplo apoio no desenvolvimento a campo e laboratorial deste projeto.

REFERÊNCIAS

- Alfieri A.F., Alfieri A.A., Barreiros M.A.B., Leite J.P.G. & Richtzenhain L.J. 2004. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil. *Vet. Microbiol.* 99:167-173.
- Alves A.J. 1997. Ocorrência de enteropatógenos em bezerros diarréicos em fazendas de exploração leiteira. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP.

- Avila F.A., Schocken-Iturrino R.P., Lallier R. & Quintana J.L. 1996. Production of a chromosomal dependent fimbrial antigen A14 from *Escherichia coli* strain isolated from diarrheic Zebu calf. *Ars Vet., Jaboticabal*, 12(1):50-56.
- Avila F.A., Paulillo A.C., Schocken-Iturrino R.P., Lucas F.A., Orgaz A. & Quintana J.L. 2000. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52(1):41-46.
- Barbosa E.F., Figueiredo H.C.P., Garcia A.M., Lobato Z.I.P. & Lage A.P. 1998. Rotavírus do grupo A em bezerras lactentes no estado de Minas Gerais. *Ciência Rural, Santa Maria*, 28(3):435-439.
- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- Benesi F.J. 1999. Síndrome diarreia dos bezerras. *Revta CRMV-ES, Vitória*, 2(3):10-13.
- Buzinaro M.G., Mistieri M.L.A., Carvalho A.A.B., Samara S.I., Regitano L.C.A. & Jerez J.A. 2003. Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarreicas de bezerras de corte em sistema semi-intensivo de produção. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55:266-270.
- Clement J.C. King M.E., Wittum T.E., Biwer R.D., Fleck M.J., Salman M.D. & Odde K.G. 1993. Factors associated with the incidence of calf scours in North Dakota beef herds. *Agri-Practice, Santa Barbara*, 14(9):13-17.
- De La Fuente R., Luzon M., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Garcia A., Cid D., Orden J.A., Garcia S., Sanz R. & Gomez-Bautista M. 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet. Parasitol.* 80:179-185.
- Edwards P.R. & Ewing W.H. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed. Burgess, Minnesota, p.7-47.
- Fagan J.G., Dwyer P.J. & Quinlan J.G. 1995 Factors that may affect the occurrence of enteropathogens in the feces of diarrheic calves in Ireland. *Irish Vet. J.* 48:17-21.
- Feitosa F.L.F., Shimamura G.M., Roberto T., Meireles M.V., Nunes C.M., Ciarlini P.C. & Borges A.S. 2004. Prevalência de criptosporidiose em bezerras na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, 34(1):189-193.
- Ganaba R., Bigras-Poulin M., Fairbrother J.M. & Bélanger D. 1995. Importance of *Escherichia coli* in young calves from Northwestern Quebec. *Can. J. Vet. Res.* 59:20-25.
- Garcia A.M. & Lima J.D. 1994. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. *Revta Bras. Parasitol.* 3:23-28.
- Gordon H.M. & Whitlock H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 12:50-52.
- Henriksen A. & Pohlsen J.F.L. 1981. Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-Nielsen technique. *Acta Vet. Scand.* 22:594-596.
- Jerez J.A., Brandão P.E., Buzinaro M.G., Gregori F., Rosales C.A.R., Ito F.H. & Sakai T. 2002. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerras neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Arqs Inst. Biol., São Paulo*, 69(2):19-23.
- Joachim A., Krull T., Schwarzkopf J. & Dausgies A. 2003. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Vet. Parasitol.* 112:277-288.
- Kaminjolo J.S., Adesiyun A.A., Loregnard R. & Kitson-Piggott W. 1993. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in livestock in Trinidad and Tobago. *Vet. Parasitol.* 45(3/4):209-213.
- Krieg N.R. & Holt J.G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editora Williams & Wilkins, London. 984p.
- Lage A.P., Carvalho A.C.T., Leite R.C., Yano T. & Serafim M.B. 1993. Toxigenic *Escherichia coli* in calves with diarrhea in Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 45:353-359.
- Langoni H., Linhares A.C., Avila F.A., Da Silva A.V. & Elias A.O. 2004. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. *Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41:313-319.
- Lazaro N.S., Rodrigues D.P., Mendonça C.L., Duque V.M., Passos R.F.B. & Hofer E. 1994a. *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de bezerras no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revta Bras. Med. Vet.* 16(2):55-61.
- Lazaro N.S., Hofer E., Rodrigues D.P., Mendonça C.L. & Gonçalves L.M.V. 1994b. Comportamento de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bovinos frente a antimicrobianos. *Revta Bras. Med. Vet.* 16(5):198-201.
- Leite R.C. & Lima J.D. 1982. Fatores que influenciam na criação de bezerras. *Arq. Escola Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(3):485-492.
- Leomil L., Ugrinovich L.A., Guth B.E.C., Irino K., Vettorato M.P., Onuma D.L. & Castro A.F.P. 2003. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Vet. Microbiol.* 97:103-109.
- Magalhães H., Freitas M.A. & Gonçalves W.M. 1991. Ocorrência, aspectos bacteriológicos e histopatológicos da colibacilose de bezerras. *Pesq. Agropec. Bras.* 29:555-564.
- Mcdonough S.P., Stull C.L. & Osburn B.I. 1994. Enteric pathogens in intensively reared veal calves. *Am. J. Vet. Res.* 55(11):1516-1520.
- Mead R., Curnow R.N. & Hasted A.M. 1993 *Statistical methods in agriculture and experimental biology*. Chapman Hall, London. 415p.
- Médici K.C., Stipp D.T., Oliveira D.B., Ferreira M.C., Bocadello R.Z., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2001. Detection of bovine coronavirus as etiological agent of neonatal diarrhea. *Virus Rev. Res., Porto Alegre*, 6:149-150.
- Mendonça C.L., Lazaro N.S., Castro R.S., Afonso J.A.B. & Hofer E. 1996. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. in calves in the southern Agreste region of the state of Pernambuco, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 16:127-131.
- Mota R.A., Silva K.P.C., Ribeiro T.C.F., Ramos G.A.B., Lima E.T., Silva L.B.G. & Zúñiga C.E.A. 2000. Eficácia do Nuflor no tratamento de diarreias em bezerras e leitões. *Hora Vet., Porto Alegre*, 118:21-24.
- Ortolani E.L. 1988. Padronização da técnica de Ziehl-Neelsen para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*: estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerras de rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP. 85p.
- Pereira H.G., Azeredo R.S., Leite J.P.G., Andrade Z.P. & Castro L. 1985. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. *J. Virol. Methods* 10:21-28.
- Salvadori M.R., Valadares G.F., Leite D.S., Blanco J. & Yano T. 2003. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 34:230-235.
- Snodgrass D.R., Terzolo H.R., Sherwood D., Campbell L., Menzies J.D. & Syngé B.A. 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.* 119:31-34.
- Takiuchi E., Stipp D.T., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2006. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and a internal control. *J. Virol. Methods* 131:148-154.
- Thorns C.J., Sojka M.G. & Roeder P.L. 1989. Detection of fimbrial adhesins of ETEC using monoclonal antibody-based latex reagents. *Vet. Rec.* 125:91-92.
- Ugrinovich L.A., Avila F.A., Oliveira M.N. & Castro A.F.P. 2002. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerras com diarreia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, 32(2):289-291.
- Waldman E., Tzipori S. & Forsyth J.R.C. 1986. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient. *J. Clin. Microbiol.* 23:199-200.
- Wittum T.E., Salman M.D., King M.E., Mortimer G., Odde K.G. & Morris D.L. 1994. Individual animal and maternal risk factors for morbidity and mortality of neonatal beef calves in Colorado, USA. *Prev. Vet. Med.* 19:1-13.
- Yano T., Garcia M., Leite D.S., De Camargo I.J.B. & Castro A.F.P. 1988. Fimbria-like adhesive factor (eaf 44) from verocytotoxigenic *Escherichia coli* of bovine origin. *Res. Vet. Sci.* 45:418-419.
- Zeman D.H., Thomson J.U. & Francis D.H. 1989. Diagnosis, treatment, and management of enteric colibacillosis. *Vet. Med., Ames*, 84(1):794-802.