FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO

DIAGNÓSTICO DAS DIARREIAS INFECCIOSAS EM BEZERROS NOS BIOMAS CERRADO E PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE

JULIANE FRANCIELLE TUTIJA

Campo Grande - MS
2024

JULIANE FRANCIELLE TUTIJA

DIAGNÓSTICO DAS DIARREIAS INFECCIOSAS EM BEZERROS NOS BIOMAS CERRADO E PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE

DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DIARRHEA IN CALVES IN THE CERRADO AND PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE BIOMES

JULIANE FRANCIELLE TUTIJA

Orientador: Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS

2024

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Genes de resistência em bactérias envolvidas na diarreia de bezerros - Relevância em saúde animal e humana", registrada com o nº 1.224/2022, sob a responsabilidade de Cássia Rejane Brito Leal - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 02/05/2022.

FINALIDADE	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2022 a 01/06/2024
Espécie/Linhagem/Raça	*Bos taurus e Bos indicus*
Nº de animais	250
Peso/Idade	indefinido / até 60 dias
Sexo	Fêmeas e machos
Origem	Fazendas de criação de bovinos de corte no Estado de MS

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da CEUA/UFMS

Campo Grande, 12 de julho de 2022.

Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria**, **Presidente de Comissão**, em 12/07/2022, às 11:43, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida, saúde e força para superar as dificuldades e conseguir alcançar meus sonhos.

A minha filha Helena Tutija de Lima, meu maior sonho alcançado e minha força e motivação diária. Eu te amo minha florzinha, obrigada por trazer ainda mais sentido para minha vida.

A minha mãe Valéria Regina Scantamburgo por batalhar mais do que qualquer outra pessoa para que esse sonho se realizasse. Muito obrigada a senhora é o exemplo que vou seguir pelo resto de minha vida.

A minha irmã Jacqueline Tutija e minha sobrinha Maria Eduarda Tutija que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e rezando por mim.

As minhas avós Dalva Calderon e Tercília Píres (*in memorian*) por me ensinarem a amar e respeitar os animais.

A minha tia Cristiane de Cássia Scantamburgo por me ajudar desde a terceira série a estudar sempre com muita disciplina e carinho.

A todos os meus familiares que me incentivaram no decorrer desta etapa.

Ao esposo Gustavo Lourenço de Lima pelo carinho, compreensão, dedicação, respeito e por me fazer tão feliz.

Aos meus amigos de faculdade que estiveram ao meu lado nos dias bons e ruins e que contribuíram muito para que esse trabalho acontecesse, Amanda Alice, Mariana Green, Guilherme Reckziegel, Zelina Freire, Rodrigo Leite, Dyego Borges, Érica Verneque, Jéssica Gomes e Vithoria Silva.

A todos os alunos de PIBIC que auxiliaram nesse projeto, em especial Milena e Maria Luiza.

Ao meu orientador Carlos Alberto do Nascimento Ramos pela oportunidade e por dedicar seu tempo me orientando sempre com tanto respeito e carinho. Tenho certeza que não poderia ter um orientador melhor, o senhor não imagina o tanto que foi importante, principalmente por não desistir de mim, quando eu mesma achei que não seria capaz de continuar no doutorado. O senhor é um exemplo de profissional que me espelho todos os dias.

A professora Cássia Leal pela orientação no mestrado e ajuda no doutorado, tenho muito carinho e admiração pela senhora, não só como profissional, mas também como pessoa. Obrigada por tudo que fez por mim.

Ao pessoal do laboratório de bacteriologia, biologia molecular e parasitologia da FAMEZ. Em especial a técnica Lúcia Restel, ao técnico Hebert Cleveland e Dyego Borges.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ-RJ e a prof. Dra. Juliana Felipetto Cargnelutti (UFSM) pelas doações de cepas de referência, que fizeram com que este trabalho fosse possível.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo auxílio no processamento das amostras.

A FAMEZ, minha segunda casa durante esses 8 anos de pós graduação (residência, mestrado e doutorado).

Aos membros da banca por participarem da defesa da minha tese de doutorado, Dr. Álvaro Ferreira Junior, Dra. Alexsandra Favacho, Dra. Cássia Leal, Dr. Antônio Francisco de Souza Filho e Dr. Ricardo Lemos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro durante todos os anos de pós graduação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com as divisões dos biomas sul-mato grossenses. Fonte: IBGE (2019). Elaboração: DETEC/Sistema Famasul 2020..... 14

Figura 2. Esquema de adesão ETEC, após fixação da bactéria na mucosa intestinal, liberação das enterotoxinas LT e ST (Bueno, 2010 adaptado)..... 17

Figura 3. Esquema de adesão EPEC, demonstrando adesão da bactéria e posteriormente condensação de actina e destruição das vilosidades (lesão A/E) (Bueno, 2010 adaptado)..... 18

Figura 4. Esquema adesão EHEC e STEC, apresentando destruição das vilosidades por EHEC, devido a lesão A/E, posteriormente entrada das Shiga toxinas devido aos dois patótipos (Bueno, 2010 adaptado..... 20

Figura 5. Mapa do estado de Mato Grosso do Sul demostrando os Biomas Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica, com localização das propriedades indicadas por pontos (•)..... 33

Figura 6. Ilustração dos passos para esporulação de *Eimeria* spp..... 39

Figura 7. Colônias de *Escherichia coli* em ágar MacConkey..... 41

Figura 8. Placa de petri contendo ágar Mueller Hinton para testes de sensibilidade a antimicrobianos com discos impregnados com antibióticos, contendo isolados de *Escherichia coli*. 43

Figura 9. Distribuição relativa de patótipos de *E. coli* detectados por PCR em amostras fecais de bezerros dos biomas Cerrado e Pantanal, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. 46

Figura 10. Distribuição das 18 propriedades amostradas no presente estudo (círculos). Marcadas com círculo em vermelho estão as propriedades com resultados positivos para *Eimeria* spp. Marcadas com círculos em azul estão as propriedades nas quais não se encontrou *Eimeria* spp. 51

Figura 11. Avaliação micrométrica de oocistos esporulados de *E. zuerni* (1), *E. auburnensis* (2), *E. pellita* (3) e *E. elipsoidalis* (4) em amostras fecais de bezerros em Mato Grosso do Sul, Brasil. Obj 40x..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e seus respectivos alvos e produtos de amplificação para identificação de *Escherichia coli* patogênicas..... 36

Tabela 2. Tabela 2 – Classificação dos patótipos de Escherichia coli de acordo com o gene de virulência..... 36

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT- PCR e seus respectivos alvos e produtos de amplificação..... 37

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana utilizando teste de difusão em disco para 451 isolados *de E. coli* dos biomas Cerrado e Pantanal, Brasil..... 43

Tabela 5. Frequência absoluta e relativa (%) dos patótipos de *Escherichia coli* classificados como MDR, XDR e PDR..... 46

Tabela 6. Resultados da classificação de *Eimeria* spp. em amostras de fezes de bezerros com e sem diarreia em Mato Grosso do Sul, Brasil..... 51

SUMÁRIO

RESUMO..... 10

Abstract..... 11

1. INTRODUÇÃO GERAL...... 12

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 13

2.1. Cerrado e Pantanal sul mato-grossense..... 13

2.2 Patógenos causadores de diarreia..... 15

2.2.1 Bactérias..... 15

2.2.1.1 *Escherichia coli*..... 15

2.2.1.2 *Salmonella* spp..... 21

2.2.2 Protozoários..... 22

2.2.2.1 *Cryptosporidium* spp..... 22

2.2.2.2 *Eimeria* spp..... 23

2.2.3 Vírus..... 23

2.2.3.1 Rotavírus bovino..... 23

2.2.3.2 Coronavírus bovino..... 24

2.2.3.3 Enterovírus..... 25

2.2.3.4 Norovírus..... 25

2.2.3.5 Nebovírus..... 26

2.2.3.6 Pestivírus..... 26

2.2.3.7 Kobuvírus..... 27

2.3 Diagnóstico 27

2.4 Resistência antimicrobiana..... 29

3. OBJETIVOS..... 31

3.1. Objetivo geral..... 31

3.2. Objetivos específicos..... 31

4. MATERIAL E MÉTODOS...... 32

4.1. Amostras..... 32

4.2 Análise bacteriológica 34

4.3 Análise de resistência antimicrobiana..... 34

4.4 Análise molecular..... 35

4.4.1 Análise molecular para detecção de *Eschrichia coli*..... 35

4.4.2 Análise molecular para detecção de *Cryptosporidium* spp..... 36

4.4.3 Análise molecular para detecção viral..... 37

4.4.4 Análise dos produtos amplificados..... 38

4.5 Análise parasitológica..... 38

4.6 Análise de dados..... 40

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40

5.1 Identificação bacteriológica..... 40

5.2 Avaliação de sensibilidade antimicrobiana..... 42

5.3 Análise molecular..... 46

5.3.1 Identificação molecular dos patótipos de *Escherichia coli*..... 45

5.3.2 Identificação molecular de *Cryptosporidium* sp..... 48

5.3.3 Identificação molecular viral..... 48

5.4 Associação entre patótipos e diarreia em bezerros..... 49

5.5 Identificação parasitológica..... 50

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... 54

7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO 55

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55

ANEXO 1..... 72

ANEXO 2..... 73

ANEXO 3..... 81

RESUMO

TUTIJA J. F. DIAGNÓSTICO DAS DIARREIAS EM BEZERROS NOS BIOMAS CERRADO E PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE. 2024. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

A diarreia em bezerros é uma das principais causas de perdas econômicas com alta morbimortalidade na indústria pecuária em todo o mundo. Enteropatógenos de origem bacteriana, parasitária e viral podem estar envolvidos, isolados ou em associação. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Rotavírus, Coronavírus, protozoários dos gêneros *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp., estão entre os principais agentes. Outros possíveis agentes causadores de diarreia são Nobovírus, Norovírus e Enterovírus. O Pantanal e o Cerrado de Mato Grosso do Sul estão entre as principais áreas de exploração agropecuária do Brasil. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de agentes bacterianos, virais e parasitários como causadores de diarreias em bezerros nestas regiões. Entre 2019 e 2023, foram coletadas 456 amostras fecais de bezerros nos biomas Pantanal e Cerrado do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Todas as amostras foram submetidas a análise microbiológica e teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA). Crescimento bacteriano foi observado em 451 das 456 amostras, e dessas *E. coli* foi identificada bioquimicamente. Todos os 451 isolados (100%) exibiram alguma resistência fenotípica a antimicrobianos, e 67,62% exibiram resistência a múltiplas drogas. A frequência de isolados multirresistentes no bioma Cerrado foi significativamente maior do que no bioma Pantanal (p = 0,0001). No Cerrado, o patótipo mais comum foi *E.* coli produtora de toxina Shiga (STEC) (28%), seguido por *E. coli* toxigênica (ETEC) (11%), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (8%) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (2%). Na maioria dos casos, foi mais comum a ocorrência concomitante de patótipos, sendo os mais frequentes ETEC + STEC (33%), ETEC + EHEC (15%) e ETEC + EPEC (3%). O patótipo STEC (30%) também foi encontrado com maior frequência no Pantanal, seguido por EHEC (12%), ETEC (9%) e EPEC (6%). O patótipo STEC apresentou frequência significativamente maior de multirresistência (p = 0,0486) em comparação aos demais patótipos identificados. Para *Cryptosporidium* sp. foram avaliadas por meio da técnica de PCR 310 amostras, sendo que apenas duas (0,64%) apresentaram resultados positivos. Já na análise por RT-PCR de 269 amostras avaliadas, todas foram negativas para Rotavírus, Coronavírus, Enterovírus, Nebovírus, Norovírus, Kobuvírus e Pestivírus. Na classificação e identificação de *Eimeria* sp., a espécie mais frequente foi *E. zuernii*, estando presente em todas as amostras (pools) com ou sem diarreia, seguida por *E. elipsoidalis* presente em três dos seis pools (50%) com uma carga parasitária dessa espécie que variou de 4 a 84% e *E. bovis* presente em três dos seis pools (50%) com a carga parasitária de 8 a 27%. Com os resultados obtidos no presente estudo identificou-se que os agentes infecciosos envolvidos na diarreia foram principalmente *E. coli* com patótipos patogênicos e multirresistentes e *Eimeria* spp. patogênicas.

Palavras-chave: bovinos, diagnóstico, diarreia, enteropatógenos, resistência.

Abstract

TUTIJA J. F. DIAGNOSIS OF DIARRHEA IN CALVES IN THE CERRADO AND PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE BIOMES. 2024. Tese de Doutorado- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

Diarrhea in calves is one of the main causes of economic losses with high morbidity and mortality in the livestock industry worldwide. Enteropathogens of bacterial, parasitic and viral origin may be involved, isolated or in association. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Rotavirus*, *Coronavirus*, protozoa of the genera *Eimeria* spp. and *Cryptosporidium* spp., are among the main agents. Other possible agents causing diarrhea are *Nobovirus*, *Norovirus* and *Enterovirus*. The Pantanal and the Cerrado of Mato Grosso do Sul are among the main areas of agricultural exploration in Brazil. Therefore, this work aimed to evaluate the potential of bacterial, viral and parasitic agents to cause diarrhea in calves in these regions. Between 2019 and 2023, 456 fecal samples were collected from calves in the Pantanal and Cerrado biomes in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. All samples were subjected to microbiological analysis and antimicrobial susceptibility testing (AST). Bacterial growth was observed in 451 of 456 samples, and these *E. coli* were identified biochemically. All 451 isolates (100%) exhibited some phenotypic resistance to antimicrobials, and 67.62% exhibited multidrug resistance. The frequency of multidrug-resistant isolates in the Cerrado biome was significantly higher than in the Pantanal biome ($p = 0.0001$). In the Cerrado, the most common pathotype was Shiga toxin-producing E. coli (STEC) (28%), followed by toxigenic *E. coli* (ETEC) (11%), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) (8%) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) (2%). In most cases, the concomitant occurrence of pathotypes was more common, the most common being ETEC + STEC (33%), ETEC + EHEC (15%) and ETEC + EPEC (3%). The STEC pattern (30%) was also found most frequently in the Pantanal, followed by EHEC (12%), ETEC (9%) and EPEC (6%). The STEC pathotype showed a significantly higher frequency of multidrug resistance ($p = 0.0486$) compared to other identified pathotypes. For *Cryptosporidium* sp. 310 samples were evaluated using the PCR technique, with only two (0.64%) obtaining positive results. In the RT-PCR analysis of 269 samples evaluated, all were negative for *Rotavirus, Coronavirus, Enterovirus, Nebovirus, Norovirus, Kobuvirus* and *Pestivirus*. In the classification and identification of *Eimeria* sp., the most frequent species was *E. zuernii*, being present in all samples (pools) with or without diarrhea, followed by *E. ellipsoidalis* present in three of the six pools (50%) with a load parasitic load of this species which ranged from 4 to 84% and *E. bovis* present in three of the six pools (50%) with a parasitic load of 8 to 27%. With the results obtained in the present study, it was identified that the infectious agents involved in diarrhea were mainly *E. coli* with pathogenic and multiresistant pathotypes and *Eimeria* spp. pathogenic.

Keywords: cattle, diagnosis, diarrhea, enteropathogens, resistance.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Com cerca de 202,78 milhões de cabeças em 2022, o rebanho bovino brasileiro mais do que dobrou em relação aos anos 1970. No país o consumo médio anual de carne bovina foi de 36,7 kg por habitante por ano em 2022. Um dos mais elevados do mundo segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC) (ABIEC, 2023).

Em 2022, houve um aumento de bovinos abatidos de 5,29% em comparação ao ano anterior, sendo abatidos 42,31 milhões de bovinos. Tendo como líder nesse setor o estado de Mato Grosso com abate acima de 4,6 milhões de cabeças, seguido por São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás. A predominância de estados da região Centro-Oeste, a coloca como principal região produtora do país, seguida pela região Sudeste e Norte (IBGE, 2022). Em relação aos municípios da região Centro-Oeste, Corumbá (MS) e Ribas do Rio Pardo (MS) tiveram as maiores participações (ABIEC, 2023).

Apesar do progresso na indústria pecuária, a diarreia neonatal ainda é um problema de saúde, causando elevada mortalidade e morbidade em bezerros jovens, levando a elevadas perdas econômicas (CONSTABLE et al., 2017). O impacto econômico decorre principalmente da mortalidade de bezerros, a qual pode ser atribuída à perda de água e eletrólitos nesses animais, resultando em desidratação, desequilíbrios eletrolíticos e acidose metabólica. Vários fatores de risco influenciam a ocorrência da doença, como idade do animal, condição imunológica, higiene, manejo e clima (TURINI et al., 2022).

A diarreia em bezerros é multifatorial, resultando de uma interação complexa entre o ambiente, fatores animais e agentes infecciosos, como Rotavírus, Coronavírus, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* sp., *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, entre outros agentes, os quais representam uma das causas mais comuns de mortalidade em bezerros. Vários dos agentes citados apresentam potencial zoonótico e podem estar associados a ocorrência de distúrbios entéricos em

humanos (COURA et al., 2015; MEGANCK et al., 2015). Os bezerros são geralmente afetados por episódios diarreicos entre 0 e 4 semanas de idade, com pico em 2 semanas (HOUSE et al., 2020).

Portanto, a gravidade e a ocorrência da doença são influenciadas por vários fatores que interagem dinamicamente ao longo do tempo, sendo necessário a diferenciação desses patógenos para estipular um tratamento e manejo do rebanho. Além disso, é necessário definir com melhor precisão a contribuição desses patógenos em diarreias em bovinos, tendo em vista que muitos deles são isolados em animais assintomáticos.

Estudar as causas da diarreia nas regiões de Cerrado e Pantanal é importante, pois mesmo dentro do mesmo estado que é o Mato Grosso do Sul, o clima, solo, vegetação são distintos, sendo o manejo diferente nos dois biomas. Além dos biomas serem próximos fisicamente, e hoje albergarem a maior parte do efetivo bovino do Brasil (mais de 50%). Dessa forma, estudos que nos possibilitem melhor entender a epidemiologia das diarreias nesses biomas podem trazer aumento de produtividade no Brasil.

Entender sobre a epidemiologia das diarreias em bovinos, pode contribuir para o estabelecimento de melhores estratégias de manejo dos rebanhos, e redução dos prejuízos associados, por redução da contaminação ambiental e os possíveis impactos sanitários às faunas silvestres das regiões, além das populações humanas, tendo em vista que vários dos agentes etiológicos envolvidos possuem potencial zoonótico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cerrado e Pantanal sul mato-grossense

O Mato Grosso do Sul possui uma área de 357 mil quilômetros quadrados, que representa 4,2% do território brasileiro. Praticamente um quarto do seu território, é constituído pelo Pantanal, com uma rica biodiversidade. E a maior parte é composta pelo Cerrado (MATO GROSSO DO SUL, 2002) (Figura 1).

Figura 1. Mapa com as divisões dos biomas sul-mato grossense. Fonte: IBGE (2019). Elaboração: DETEC/Sistema Famasul 2020.

O bioma Cerrado possui uma área de 205,9 milhões de hectares (IBGE, 2004) e ocupa a porção central do Brasil, englobando parte dos seguintes estados brasileiros: Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins, além do Distrito Federal.

Segundo Macedo (1997), o Cerrado é responsável por 50% da carne produzida no Brasil. Nesse bioma, encontra-se ainda o maior número de frigoríficos com inspeção federal e o maior número de indústrias frigoríficas aptas à exportação de carnes. Mato Grosso do Sul tem 61% de seu território compreendido pelo Bioma Cerrado, o qual se estende do Norte-Nordeste ao Sudoeste do estado.

O Pantanal é uma planície alagada (150.355 km2), localizada no centro da América do Sul (NUNES, 2011). Sua área é de 138.183 km², com 64,5% de seu

território no estado de Mato Grosso do Sul com 9.738.401 hectares (FAMASUL, 2021).

Teve o rebanho bovino expandido, entre 1985-2015, passando de 40 milhões de cabeças de gado para 75 milhões em 2015, sendo que municípios do Pantanal, como Corumbá e Cáceres, retiveram grandes rebanhos (IBGE, 2018). Metade do efetivo rebanho do Pantanal é explorado nas três fases (cria, recria e engorda), 26% é explorado com a finalidade apenas de cria e recria (SOUZA, 2010).

2.2 Patógenos causadores de diarreia

2.2.1 Bactérias

2.2.1.1. *Escherichia coli*

E. coli são bactérias Gram negativas, fermentativas, anaeróbias facultativas. Medem entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm, a maioria é móvel, devido a existência de flagelos peritríquios. A temperatura ótima de crescimento é por volta dos 37 ºC, sendo cultivadas facilmente em meios de cultura de rotina (QUINN et al., 2005). É a bactéria geneticamente mais versátil e fornece genes mediados por plasmídeos e fagos. *E. coli* produz septicemia e diarreia em uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo humanos e animais (HEMASHENPAGAM et al., 2009).

A via de transmissão da bactéria é fecal-oral por meio de água e alimentos contaminados. São comumente isoladas nas fezes, e na maioria das vezes são comensais, não causando doença em seus hospedeiros. Entretanto, alguns patótipos não patogênicos presentes no intestino, em animais debilitados, imunocomprometidos ou com a barreira gastrointestinal alterada, podem causar doença (NATARO; KAPER, 1998).

A maioria dos patótipos patogênicos *de E. coli* são encontrados nas primeiras semanas de vida e, portanto, os bezerros neonatos apresentam maior risco de infecção por *E. coli* (HOSSAIN et al., 2014). Isso pode ser atribuído pelo fato que os recém-nascidos são mais suscetíveis, eles possuem um sistema imunológico imaturo e muitas vezes ingerem colostro insuficiente ou absorveram imunoglobulinas colostrais insuficientes (CONSTABLE et al., 2017).

E. coli patogênicas são agrupadas de acordo com seus mecanismos de patogenicidade em patótipos, que estão frequentemente associados à doença e lesões em animais (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). Desta forma, para confirmação de diarreia por *E. coli* é necessária a identificação dos patótipos diarreiogênicos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

A identificação de *E. coli* diarreiogênica requer sua diferenciação das espécies não patogênicas da microbiota intestinal (ROBINS- BROWNE et al., 2004). A importância dessa identificação, se dá em virtude de tratar ou não os animais com *E. coli* e também está relacionada com a identificação de animais portadores, pois esses bezerros podem atuar como reservatório importante de *E. coli* patogênica humana (COBBOLD et al., 2007).

Tutija et al. (2022) avaliaram 176 isolados de *E. coli* de animais portadores de diarreia, do Mato Grosso do Sul. Foi verificado que havia predomínio do patótipo *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), posteriormente Tutija et al. (2024) avaliaram 456 isolados e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) foi o patótipo mais frequente identificado nos biomas analisados. Esses trabalhos demonstram a ocorrência de patótipos causadores de diarreia em bezerros e em humanos, sendo importante seu diagnóstico.

Já foram identificados cinco patótipos de *E. coli* associados à diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). Outros patótipos diarreiogênicos para seres humanos, como *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* de aderência difusa e *E. coli* enteroagregativa ainda não foram confirmados como causadores de diarreia em bezerros (ANDRADE et al. al. 2012). Todos esses patótipos podem ser identificados molecularmente por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (AWAD et al., 2020; TUTIJA et al., 2022).

E. coli enterotoxigênica (ETEC) são caracterizadas por colonizarem a superfície da mucosa do intestino delgado (Figura 2), principalmente o íleo, e por produzirem enterotoxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT) que alteram as funções dos enterócitos. A consequência é o aumento da secreção e a redução da

absorção de líquidos, sem induzirem alterações morfológicas significativas no intestino (COURA et al., 2017).

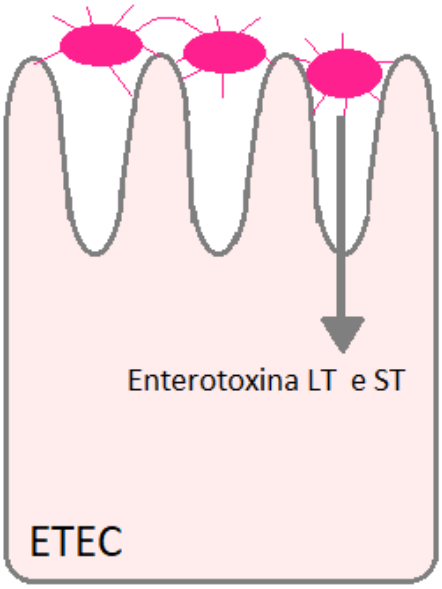

Figura 2. Esquema de adesão ETEC, após fixação da bactéria na mucosa intestinal, liberação das enterotoxinas LT e ST (Bueno, 2010 adaptado).

A enterotoxina termolábil (LT) é semelhante à toxina da cólera, sendo dividida em dois tipos: LT-I e LT-II. As amostras de ETEC de origem bovina não produzem LT-I (BLANCO *et al.,* 1998), existindo apenas a descrição de amostras produtoras de LT-II (SERIWATANA et al., 1988).

A enterotoxina termoestável (ST) é uma família de pequenas toxinas, as quais podem ser divididas em dois grupos: as solúveis (STa) e as insolúveis em metanol (STb), ambas codificadas por plasmídios (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). A enterotoxina STa é produzida por ETEC de animais (bovinos, ovinos, suínos e caninos) e seres humanos, já a STb foi encontrada apenas em ETEC isoladas de suínos (MAINIL, 2013).

A cepa *E. coli* ETEC é o patótipo mais comumente associado à enterite em bezerros na primeira semana de vida, principalmente entre três e quatro dias de vida (BLANCHARD, 2012; TUTIJA et al., 2022). Eles podem apresentar diarreia profusa pastosa a líquida, com odor fétido e coloração amarelada a branca. Nos casos agudos, a perda de água e eletrólitos é rápida, e os animais apresentam desidratação grave e acidose metabólica, podendo levá-los a óbito.

A cepa EPEC tem como principal característica causar uma lesão denominada de *attaching and effacing* (anexando e apagando) - A/E. A lesão A/E é caracterizada por uma adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, com destruição das microvilosidades, alterações no citoesqueleto, com formação de estruturas semelhantes a pedestais e acúmulo de actina polimerizada logo abaixo da ligação da bactéria à célula (Figura 3) (SYDOW, 2005). Os principais genes responsáveis pela lesão A/E estão inseridos numa ilha de patogenicidade denominada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), também presente no patótipo EHEC (HERNANDES et al., 2009).

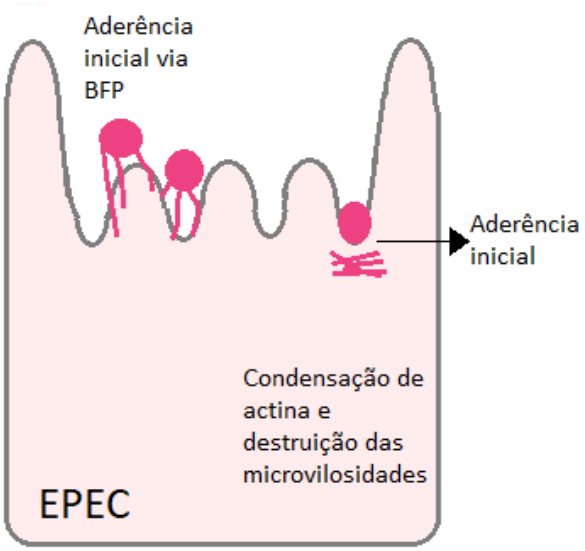

Figura 3. Esquema de adesão EPEC, demonstrando adesão da bactéria e posteriormente condensação de actina e destruição das vilosidades (lesão A/E) (Bueno, 2010 adaptado).

As cepas de *E. coli* capazes de causar esse tipo de lesão são também denominadas AEEC (*attaching and effacing Escherichia coli*). A adesina intimina, uma proteína de 94 kDa da membrana externa da bactéria, é codificada pelo gene *eae* localizado na LEE e é a molécula de adesão responsável pela ligação íntima da bactéria ao enterócito.

Além da ilha de patogenicidade LEE, a bactéria EPEC pode apresentar um plasmídeo chamado "*EPEC aderence factor*" (EAF), com genes envolvidos na expressão e montagem da fímbria denominada "*bundle-forming pillus*" (BFP), responsável pela aderência localizada da bactéria ao epitélio intestinal. Amostras de EPEC portadoras do plasmídeo EAF e da fímbria BFP são denominadas EPEC

típicas, e quando negativas EPEC atípicas (MAINIL; FAIRBROTHER, 2014). Elas não produzem nenhuma enterotoxina ou citotoxina (CROXEN; FINLAY, 2010).

Não há uma faixa etária com maior susceptibilidade, como ocorre com ETEC, sendo detectada a infecção por EPEC em bezerros com uma a 12 semanas de idade (FOSTER; SMITH, 2009). As fezes podem estar aquosas ou normais, amareladas ou sanguinolentas. A infecção por EPEC resulta em quadro mais crônico de diarreia, diferentemente da ocorrência aguda da colibacilose por ETEC. Descobriu-se que o gene da intimina (*eae*) observado na EPEC é mais patogênico em humanos do que em bezerros e está envolvido na transmissão zoonótica (THIRY et al. 2017).

A confirmação da presença de EPEC é feita a partir da cultura de fezes seguida por PCR para identificação dos genes de virulência característicos desse patótipo, principalmente o *eae* (BLANCHARD 2012).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) é responsável por sintomas clínicos graves em humanos , como colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (KAPER et al., 2004). A toxina Shiga (Stx 1 e 2) é o principal fator de virulência que contribui para a patogenicidade da EHEC. Incluído no grande grupo de *E. coli* produtoras de Stx (STEC), o EHEC geralmente também possui o gene *eae* que codifica a intimina, envolvido na formação de lesões de fixação e apagamento nas células intestinais, assim como EPEC (HASHISH et al., 2016). Portanto, os termos STEC são usados para isolados de bactérias que produzem somente Stx e EHEC para os que produzem Stx e *eae* (Figura 4) (MELTON-CELSA, 2014).

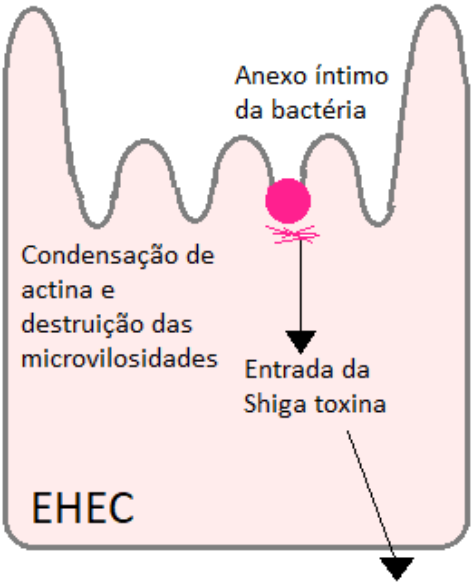

Figura 4. Esquema adesão EHEC e STEC, apresentando destruição das vilosidades por EHEC, devido a lesão A/E, posteriormente entrada das Shiga toxinas devido aos dois patótipos (Bueno, 2010 adaptado).

Grande parte dos bezerros infectados com estes patótipos não apresenta sinais clínicos, entretanto estes animais constituem importantes reservatórios de STEC/EHEC tanto para bovinos, quanto para os seres humanos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Isso ocorre porque ruminantes não possuem receptores para Stx no endotélio vascular, mas os mesmos estão presentes nos enterócitos das criptas, linfócitos intraepiteliais e macrófagos da mucosa intestinal (SAPOUNTZIS et al., 2020).

Infecções por STEC em humanos foram atribuídas ao consumo de carne bovina ou de produtos lácteos contaminados com fezes de bovinos (HUSSEIN; SAKUMA, 2005), sendo que, entre os mais de 200 sorotipos de *E. coli* que produzem Shiga toxina, o sorotipo O157:H7 destaca-se pelo alto potencial virulento, sendo o mais frequentemente associado a surtos de toxinfecção de origem alimentar no mundo (SCHEUTZ, 2013.).

Cepas de *E. coli* NTEC são caracterizadas pela produção de toxinas CNF (fator necrotizante citotóxico) (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1998) que impedem a divisão celular, sem afetar a replicação de ácidos nucléicos. Existem dois tipos de CNF (CNF1 e CNF2), esses já foram isoladas em casos de enterite em ruminantes, porcos, coelhos, cães e cavalos, e em infecções extra intestinais em

cães, gatos, humanos e porcos. Esse é o patótipo que apresenta a menor prevalência nos rebanhos (SHAHRANI, et al., 2014; TUTIJA et al., 2022).

CNF2 é isolado com mais frequência que o CNF1 (BIHANNIC et al., 2015). Em casos de septicemia, a bactéria pode adentrar a circulação sanguínea e acometer órgãos internos, principalmente os pulmões. À necropsia, Van Bost et al. (2003) observaram congestão da mucosa intestinal, espessamento da mucosa do intestino delgado e congestão pulmonar.

2.2.1.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* spp. pertence à família *Enterobacteriaceae* e é constituído por bactérias gram-negativas, com formato de bastonete e anaeróbicas facultativas. Duas espécies representam esse micro-organismo, *S. bongori* e *S. enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) (ENG et al., 2015). Além da espécie *S. enterica* ser dividida em subespécies, também pode ser dividida em sorotipos, sendo conhecidos mais de 2.500 sorotipos diferentes, todos potencialmente patogênicos para as diferentes espécies (GUIBOURDENCHE et al., 2010). As salmonelas são agentes causadores de doenças em humanos e animais (SMITH et al., 2002).

A *Salmonella* entérica sorotipo Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) e sorotipo Dublin (*Salmonella* Dublin) são os mais comuns isoladas de fezes de animais adultos e jovens (COURA et al., 2015). A via oral-fecal é o principal meio de transmissão (BLANCHARD, 2012). Os sinais clínicos de salmonelose mais comuns são, febre, diarreia, sinais respiratórios, artrite, morte súbita e, às vezes, necrose das pontas das orelhas e cauda, a depender se a doença é entérica ou septicêmica (HOLSCHBACH; PEEK, 2018). Bezerros entre 14 dias e três meses são mais suscetíveis a *Salmonella* Dublin (NIELSEN 2003).

No gado adulto, pode ocorrer diarreia, febre e aborto (ANDERSON; BLANCHARD, 1989). A bactéria pode atravessar a barreira placentária, sendo mais provável o aborto do que nascimento de bezerros infectados. A gravidade da apresentação clínica irá variar com a carga infecciosa (NIELSEN, 2013). Na necropsia são observados, edema e hemorragia de linfonodos mesentéricos,

esplenomegalia, hepatomegalia, presença de petéquias hemorrágicas no peritônio e inflamação da porção distal do íleo e do colón (CUNHA, 2010).

Surtos de salmonelose ocorrem com alta morbidade e mortalidade em animais jovens dependendo do manejo e idade destes animais. Surtos em três propriedades avaliadas por Guizelini et al., (2020) em Mato Grosso do Sul encontraram taxas de morbidade, mortalidade e letalidade de 10,55%, 2,79% e 26,4%, respectivamente. Além de terem observado nesse estudo animais portadores de *Salmonella* Dublin. Os portadores são uma das principais fontes de infecção, e seu reconhecimento e identificação, embora difíceis de executar, são essenciais para controlar a salmonelose em um rebanho.

2.2.2 Protozoários

2.2.2.1 *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. pertence à ordem Eucoccidiorida família Cryptosporidiidae e ao gênero *Cryptosporidium*. A criptosporidiose é uma das importantes doenças zoonóticas que causa diarreia potencialmente fatal em hospedeiros jovens, imunodeficientes e desnutridos. Foi relatado em animais e humanos em todo o mundo, em mais de 106 países e principalmente em países em desenvolvimento (ODENIRAN; ADEMOLA, 2019 ; HAGHI et al., 2020).

As principais espécies que afetam bovinos são: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. parvum*, sendo este último o mais comum (FAYER, 2007; SLAPETA, 2013).

C. parvum causa diarreia em bezerros neonatos, ocorrendo geralmente entre os 5 e os 15 dias de vida e podendo acontecer após um mês de idade, sendo sua transmissão oral-fecal (TIRANTI et al. 2011). Os oocistos mantêm-se viáveis durante vários meses, principalmente em ambientes frios e úmidos (FAYER, 1989).

A maioria dos relatos de doenças estão associados ao *C. parvum* e são caracterizados por um início agudo de diarreia aquosa profusa, frequentemente associada a perda de apetite, depressão e fraqueza (LI et al. 2019). A mortalidade por desidratação foi relatada em bezerros neonatos, mas é rara em rebanhos endêmicos com altas taxas de morbidade. Os oocistos são encontrados

principalmente no epitélio da parte inferior do intestino delgado, causando enterite , diminuição do comprimento, atrofia e fusão das vilosidades (TZIPORI et al., 1983).

2.2.2.2 *Eimeria* spp.

A eimeriose bovina é uma doença causada por protozoários do gênero *Eimeria* spp. que afeta principalmente bezerros com menos de um ano de idade, causando distúrbios gastrointestinais e, em alguns casos, a morte (SÁNCHEZ et al., 2013; BANGOURA; BARDSLEY, 2020). Pode envolver grandes perdas financeiras devido à diminuição do apetite, perda de peso, redução nas taxas de conversão alimentar, diarreia, anemia e aumento de suscetibilidade a outras doenças (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005).

Existem 14 espécies neste gênero, descritas com a capacidade de infectar bovinos em todo o mundo: *Eimeria alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. brasiliensis*, *E. bukidnonensis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. illinoisensis*, *E. pellita*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis*, *E. zuernii* (LEVINE; IVENS, 1967) e *E. ildefonsoi* (FLORIÃO et al., 2016). Geralmente, as espécies mais difundidas são *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. elipsoidalis* e *E. auburnensis* (DONG et al., 2012). Os animais podem apresentar coinfecções por duas ou mais espécies, mas nem sempre apresentam sinais clínicos (CARDIM et al., 2018).

2.2.3. Vírus

2.2.3.1 Rotavírus bovino

Rotavírus bovino (BRV) pertence ao gênero *Rotavirus*, família *Reoviridae,* são vírus RNA segmentados, não envelopados que têm três especificidades antigênicas importantes: grupo, subgrupo e sorotipo (SWIATEK et al., 2010). Os rotavírus do grupo A são os principais patógenos em bezerros, já o grupo B tem menor importância. Os rotavírus do grupo A consistem em 11 segmentos de RNA de fita dupla, codificando 6 proteínas virais estruturais (VP1 a VP4, VP6 e VP7) e 6 proteínas não estruturais (NSP 1 a NSP 6) (CRAWFORD et al., 2017). Os rotavírus do grupo A são geralmente incriminados em casos humanos e animais de gastroenterite e classificados nos tipos P (para sensíveis à protease) e G (para glicoproteína), respectivamente.

A infecção por BRV ocorre principalmente em bezerros entre 15 e 45 dias de idade. Os sintomas clínicos incluem depressão, perda de apetite, diarreia e desidratação. Normalmente as fezes são abundantes em amarelo pálido, sem sangue e muitas vezes contendo grandes quantidades de muco persistindo por 4 a 8 dias. Os vírus infectam os enterócitos absorventes maduros do intestino delgado, embora o mecanismo exato de entrada ainda seja desconhecido (SÁNCHEZ et al.,2004).

Não existem sinais patognomônicos de rotavirose em bezerros que permitam diferenciar de outros patógenos. O diagnóstico requer identificação de partículas de rotavírus em bezerros com infecção aguda. As fezes devem ser coletadas nas primeiras 24 horas da doença e começo da diarreia.

2.2.3.2 Coronavírus bovino

O coronavírus bovino (BCoV) pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus* grupo 2. O vírus tem um envelope de 120 a 160 nm de diâmetro e um nucleocapsideo helicoidal (BROWNLIE, 2017).

O genoma é uma molécula de RNA de sentido positivo de cadeia simples de 27 a 32 kb. BCoV é o segundo principal agente viral responsável por infecções entéricas em bovinos jovens em todo o mundo, podendo ainda comprometer animais adultos (LORENZETTI et al., 2013).

BCoV infecta os órgãos respiratórios e digestivos do gado e causa diarreia neonatal em bezerros, diarreia com sangue em bovinos adultos (disenteria de inverno) e sintomas respiratórios, incluindo febre do transporte em bovinos confinados (LATHROP et al., 2000). A implicação do BCoV na diarreia neonatal é conhecida por ser mais frequente em bezerros até 30 dias de idade (TAKIUCHI et al., 2006; STIPP et al., 2009).

Além de ser comumente encontrado em bezerros saudáveis e diarreicos, o que dificulta a avaliação de seu papel como patógeno primário. Os sinais clínicos começam aproximadamente 2 dias após a exposição e continuam por 3 a 6 dias. Normalmente, a infecção causa diarreia aquosa abundante e as fezes podem conter coágulos de sangue. Os bezerros ficam moderadamente deprimidos, apresentam desidratação, acidose metabólica e hipoglicemia.

2.2.3.3 Enterovírus

Enterovírus bovino (BEnV) pertence ao gênero *Enterovirus* da família *Picornaviridae*, um grupo de vírus de RNA não envelopado que inclui numerosos patógenos humanos e animais. O gênero enterovírus consiste em 12 espécies; 9 enterovírus (A a J) e 3 rinovírus. Os BEnVs são agora classificados em dois subgrupos, E (1 a 4) e F (1 a 6) (NG Q, et al., 2015).

Os sinais clínicos de infecção por enterovírus em bovinos variam de doenças respiratórias a intestinais, doenças reprodutivas e infertilidade (ZHU et al., 2014). A patogenicidade e virulência do BEV permanecem amplamente desconhecidas. Alguns estudos sugerem que é apenas de patogenicidade limitada, pois nenhum sinal clinicamente significativo de infecção por BEV foi replicado com sucesso em bezerros (ZHU, et al., 2014; LI, et al., 2012). Porém Chengyuan et al., (2021) demonstraram que a taxa de positividade do BEV em amostras diarreicas foi muito maior do que em amostras assintomáticas, sugerindo que o BEV é mais provável de causar doença intestinal bovina e, portanto, não pode ser ignorado no controle da diarreia bovina.

2.2.3.4 Norovírus

Norovírus são vírus de RNA não envelopados que são membros da família *Caliciviridae*. Com base nas relações filogenéticas inferidas das sequências de VP1, os norovírus foram divididos em 6 genogrupos (GI a GVI), porém os norovírus bovinos (BNoV) pertencem apenas o GIII (GREENING; WOL; 2010).

A prevalência de BNoV em bovinos não foi bem estabelecida. Os resultados de estudos limitados relataram intervalos de 1,6% e 72% em bezerros leiteiros canadenses e bezerros de vitela dos EUA, respectivamente (MATTISON, 2007), e até 10% em bezerros saudáveis na Europa (DI MARTINO, 2011).

A diarreia é a apresentação clínica mais importante em bovinos infectados com BoNoVs; com base em estudos experimentais, a anorexia transitória e uma síndrome de má absorção também foram associadas à infecção por BoNoV (WOODE; BRIDGER, 1978; JUNG et al, 2014). A diarreia pode durar de 3 a 4 dias, sendo mais grave em animais com 3 semanas de idade do que em bezerros neonatos (GÜNTHER; OTTO, 1987).

2.2.3.5 Nebovírus

Nebovírus é um membro não envelopado da família *Caliciviridae*. Com base na análise da sequência do genoma, quatro cepas foram descritas dentro do gênero *Nebovirus,* incluindo Bo/Newbury1/76/UK, Bo/Nebraska/80/US, Bo/DijonA216/06/FR e a cepa recentemente relatada do vírus Kirklareli (ALKAN et al., 2015).

A infecção experimental de bezerros gnotobióticos com nebovírus bovino (BNebV) causa lesões no jejuno semelhantes às descritas para BNoV, e essas lesões têm sido associadas à má absorção (HALL, 1984).

Na França, no Reino Unido e na Coreia, a prevalência do BNebV em bezerros com diarreia varia de 7% a 9% (DI MARTINO et al., 2011; JOR et al., 2010; KAPLON et al., 2011). Já no Brasil em um estudo realizado por Candido et al., (2016) nas áreas rurais dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Rio Grande do Sul, encontraram pela primeira vez o vírus, estando presente em 4,8% das amostras oriundas de animais com até 20 dias de idade, apresentando diarreia.

O mecanismo da diarreia devido ao BNebV permanece pouco compreendido, mas pode-se esperar diarreia de má absorção e hipersecretória (HALL, 1984). Os sinais clínicos descritos em bezerros gnotobióticos infectados com BNebV incluíram depressão, anorexia e diarreia. No entanto, mesmo com esses sinais clínicos em bezerros gnotobióticos, o papel do BNebV na diarreia no campo permanece incerto (GOMEZ; WEESE 2017).

2.2.3.6 Pestivírus

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus,* contém três espécies virais de importância para a indústria pecuária bovina: BVDV-1, BVDV-2 e HoBiPeV, nomeados oficialmente como *Pestivirus* A, B e H, respectivamente (SMITH et al, 2017). O BVDV está presente em todos os países onde existe algum nível de atividade pecuária e causa prejuízos econômicos diretos e indiretos para a criação de bovinos (RILEY et al, 2019).

No Brasil há registros de análises moleculares quanto ao perfil genotípico e antigênico em bovinos do Rio Grande do Sul, sendo encontrados BVDV-1 e BVDV-2 (BIANCHI et al., 2011). No Maranhão, níveis elevados de frequência do BVDV

foram detectados no rebanho bovino de aptidão leiteira, onde ao se avaliar animais em 23 municípios, 94,57% das propriedades apresentaram animais sorologicamente positivos ao vírus (CHAVES et al., 2012).

A patologia é de caráter enzoótico, e apresenta diversos sinais clínicos como lesões orais, descarga nasal, pneumonias, gastroenterite, lesões no sistema trato gastrointestinal, imunossupressão e teratogenicidade (RIDPATH et al., 1998). A presença de diarreia profusa e erosões da mucosa intestinal, com índice de mortalidade elevado contribuem para o grande impacto econômico, onde há gastos com medicamentos e mal desenvolvimento dos bezerros (BRUM et al., 2004).

2.2.3.7 Kobuvírus

O gênero *Kobuvírus* foi reclassificado e dividido em três espécies, *Aichivirus A* que tem como espécie hospedeira os seres humanos; o *Aichivirus B* responsável por infecção em bovinos; e a terceira espécie do gênero o *Aichivirus C*, infectando suínos (ICTV, 2013).

Em 2014, um estudo realizado no Brasil examinou 222 bovinos de corte e leite com diarreia de diferentes idades (182 ≤2 meses de idade, e 40 ≥1 ano de idade; 105 bovinos de corte e 117 bovinos leiteiros), utilizando a técnica de RT-PCR. Quarenta bovinos foram positivos para BKV e entre bezerros jovens foram 38 positivos (38/182, 20,9%), sendo 13 bezerros de corte (13/68) e 25 bezerros leiteiros (25/114) (RIBEIRO et al., 2014). Em outro estudo realizado no Brasil relatou-se 31 de 216 bovinos positivos para BKV (24 positivos entre 89 bovinos com diarreia, e 7 entre 127 bovinos clinicamente saudáveis). Todos os 31 bovinos positivos eram bezerros (31/149) com menos de 6 meses de idade (CANDIDO et. al., 2016).

O papel do *Kobuvírus* (BKV) na patogênese da diarreia em bezerros não é totalmente compreendido, ainda não está claro se o vírus desempenha um papel principal ou secundário nas diarreias associadas a outros vírus (RIGHI et al., 2023).

2.3 Diagnóstico

Devido à natureza multifatorial da diarreia, a cor, a consistência e a composição das fezes têm uma grande variação.

Sinais como depressão, desidratação e choque são mais comuns em bezerros jovens, com menos de cinco dias de idade e também naqueles com mais de duas semanas (RADOSTITS et al., 2007). Portanto existe uma grande dificuldade na realização do diagnóstico etiológico da diarreia, pois através dos sinais clínicos não é possível determinar o agente causador.

Diferentes métodos laboratoriais são utilizados para identificação de agentes possivelmente associados a diarreias. Esses métodos variam em função do tipo do agente, e possuem, cada um, suas vantagens e desvantagens.

Isolamento em cultivo celular pode ser utilizado para diagnóstico viral, no entanto requer instalações adequadas e mão de obra especializada, tornando o método oneroso e pouco difundido para uso rotineiro (FRESHNEY, 2005).

Também, técnicas de microscopia eletrônica podem ser utilizadas para diagnóstico viral, entretanto, tem a desvantagem de apresentar baixa sensibilidade quando comparada com outros métodos, como o ELISA e a RT-PCR (DOANE, 1994; BUESA et al., 1996). Além disso, poucos laboratórios são equipados para a realização dessa técnica, o que a torna pouco utilizada na rotina.

O diagnóstico de infecção por *Eimeria* spp. é realizado rotineiramente utilizando-se métodos parasitológicos simples e de baixo custo, como por exemplo as técnicas de flutuação (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005). Entretanto, a identificação das espécies é realizada observando-se características morfométricas específicas dos oocistos esporulados, como largura e comprimento, presença ou ausência de micrópila (BERTO et al., 2014).

Para *Cryptosporidium* sp. a técnica mais utilizada é a técnica de Ziehl-Neelsen modificado (HENRIKSEN; POHLENZ, 1981), porém, tais técnicas geralmente apresentam menores índices de sensibilidade e especificidade que as técnicas imunológicas (TEIXEIRA et al., 2011) e moleculares (HOMEM et al., 2012; THOMPSON; ASH, 2016).

Para diagnóstico bacteriano, o cultivo microbiológico de amostras fecais em meios de cultura específicos ainda é o método mais utilizado. No entanto, o isolamento de bactérias em amostras fecais não comprova, por sí só, a etiologia de diarreias. Pois, isolamentos em amostras oriundas de animais sadios também são frequentes.

As técnicas moleculares, baseadas na pesquisa e amplificação de fragmentos gênicos, têm sido bastante utilizadas para diagnóstico de diversos agentes infecciosos associados a diarreia (vírus, protozoários, bactérias).

Atualmente, os métodos baseados em transcriptase reversa (RT)-PCR e, a análise metagenômica são utilizados nas identificações de amostras clínicas (WORKMAN et al., 2017; HAO et al., 2020).

Para diagnóstico de *Escherichia coli* a técnica de PCR tem sido empregada na investigação de patótipos, sendo uma técnica rápida, específica e sensível (NATARO; KAPER 1998; GYLES; FAIRBROTHER 2010).

2.4 Resistência antimicrobiana

O uso de antibióticos é um fator importante na manutenção da saúde humana e animal em todo o mundo (OMS, 2014). Recentemente, o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos na maioria das espécies bacterianas tornou-se uma séria ameaça à saúde pública global (ACAR; MOULIN, 2013; MERLE et al., 2012). Estima-se que as mortes atribuíveis à resistência antimicrobiana podem aumentar de 700.000 para 10 milhões de vidas anualmente até 2050 (UDAONDO; HUERTAS, 2020).

Os principais patógenos associados aos óbitos em humanos por resistência bacteriana (RAM) são *Escherichia coli*, seguido *por Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*, responsáveis por 3,57 milhões de mortes associadas à RAM no mundo em 2022 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento de diarreia em bezerros doentes incluem ampicilina (10mg/Kg, IM, 12/12h), sulfonamida (25mg/Kg, IV ou IM, 1X/dia), e amoxicilina oral (10mg/Kg, 12/12h), podendo esta ser administrada sozinha ou combinada com clavulanato de potássio (12,5mg/Kg, 12/12h) (CONSTABLE, 2004). Antimicrobianos de segunda escolha são as cefalosporinas de terceira e quarta geração, como o ceftiofur e cefquinoma; e o de terceira escolha é a fluorquinolona (CONSTABLE, 2009).

O uso inadequado de antimicrobianos em animais e humanos, ambientes contaminados e políticas ineficazes de controle de infecções estão entre as causas

da disseminação local e global da resistência bacteriana (MARTI et al., 2014). Reservatórios de resistência surgiram devido ao uso irracional de antimicrobianos em humanos, animais, comunidades e ambientes associados, resultando na persistência de resíduos de medicamentos ou genes de resistência no ambiente. Vários reservatórios ambientais fazem parte da disseminação, incluindo solo, água, resíduos hospitalares, industriais, agrícolas e vários nichos ecológicos poluídos (MARTI et al., 2014 ; HUIJBERS et al., 2015).

Existem dois mecanismos de resistência bacteriana, mecanismo intrínseco e mecanismo adquirido de resistência. O mecanismo de resistência no qual as bactérias resistem à ação dos antimicrobianos por meio de características funcionais ou componente estrutural embutido é denominado resistência intrínseca. Já a resistência adquirida é quando uma cepa suscetível se tornou resistente, como consequência de uma alteração genética evolutiva (ASLAM et al., 2021).

Uma vez que bactérias resistentes podem ser transferidas de animais para humanos, avaliar essa resistência é ainda mais importante, pois a alta prevalência de multirresistência em amostras de origem animal pode representar um risco para o homem (GESSNER et al., 2017).

Informações limitadas estão disponíveis sobre RAM em rebanhos de bezerros. A prevalência de bactérias resistentes a antimicrobianos (BRA) é geralmente menor em fazendas de corte do que em fazendas leiteiras, provavelmente devido ao maior uso de antimicrobianos em gado leiteiro do que em gado de corte (HILLE et al., 2017).

A resistência a múltiplos fármacos é um problema emergente em todo o mundo, sendo considerado uma ameaça à saúde pública. Várias investigações recentes indicam o surgimento de patógenos bacterianos multirresistentes (MDR) de diferentes origens, ressaltando a importância do uso adequado de antimicrobianos (ALGAMMAL et al., 2022), o uso rotineiro de antimicrobianos testes de suscetibilidade para detectar o antibiótico de escolha e triagem de cepas MDR emergentes (ELBEHIRY et al., 2022).

Isolados são classificados como MDR quando resistentes a um ou mais antimicrobianos dentre três ou mais categorias testadas. Extensamente resistente a medicamentos (XDR), quando isolados não são suscetíveis a pelo menos um

agente em todas as categorias antimicrobianas, exceto duas ou menos. Pan-resistente a medicamentos (PDR) quando uma cepa é resistente a todos os agentes antimicrobianos de todos os grupos testados (MAGIORAKOS et al., 2012).

O tratamento de diarreia com antimicrobianos de escolha aleatória, nem sempre apresenta bons resultados, enquanto que o uso de um antimicrobiano específico pode reduzir a ocorrência de resistência dos microrganismos (CONSTABLE, 2009). Para tal, são realizados testes de sensibilidade a antimicrobianos com discos impregnados com antibióticos, para verificar a sensibilidade do isolado (BAUER et al., 1966).

É necessário também utilizar um protocolo de dose que atinja e mantenha concentração terapêutica eficaz no local da infecção, tratar por um período adequado, evitar resíduos e efeitos locais ou sistêmicos adversos e, minimizar o potencial para transferência de genes de resistência a antimicrobianos (CONSTABLE, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de agentes bacterianos, virais e parasitários como causadores de diarreias em bezerros do cerrado e pantanal sul-mato-grossense.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar aspectos epidemiológicos.
- Identificar por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) os isolados de *E. coli*, para determinar fatores de virulência que possam estar envolvidos no surgimento da diarreia.
- Isolar *Salmonella* spp. por análise bacteriológica e molecular.
- Identificar os agentes virais causadores de diarreia, sendo eles Rotavírus, Coronavírus, Enterovírus, Nebovírus, orovírus, Kobuvírus e Pestivírus.
- Realizar diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. por PCR em fezes.
- Detectar espécies de *Eimeria* spp. por meio de esporulação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras foram colhidas e analisadas com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UFMS, sob os registros nº 1.002/2018 e 1.134/2020.

Entre 2019 e 2023, foram coletadas 456 amostras fecais de bezerros de um a 90 dias de idade divididos em três categorias: um a 30 dias, 31 a 60 dias e 61 a 90 dias. As fezes foram analisadas com base em Walker et al. (1998) quanto ao aspecto visual macroscópico e à presença de estrias sanguíneas, sendo classificado como diarreicas ou não diarreicas.

Todas as amostras foram enviadas ou coletadas no período de julho a dezembro, pois são nesses meses em que se concentra os nascimentos dos bezerros, devido a estação de monta utilizada nas propriedades. Portanto as amostras foram provenientes da ocorrência de casos de diarreia nas propriedades. As amostras foram provenientes de 28 propriedades localizadas em 18 municípios do estado de Mato Grosso do Sul, sendo 383 amostras do bioma Cerrado e 73 amostras do bioma Pantanal (figura 5). De cada propriedade, foram colhidas amostras de animais com diarreia, e de animais sem diarreia. As amostras foram colhidas diretamente de ampola retal com o auxílio de sacos plásticos, e enviadas em até 48 horas após a coleta, em caixas isotérmicas sob refrigeração (4ºC).

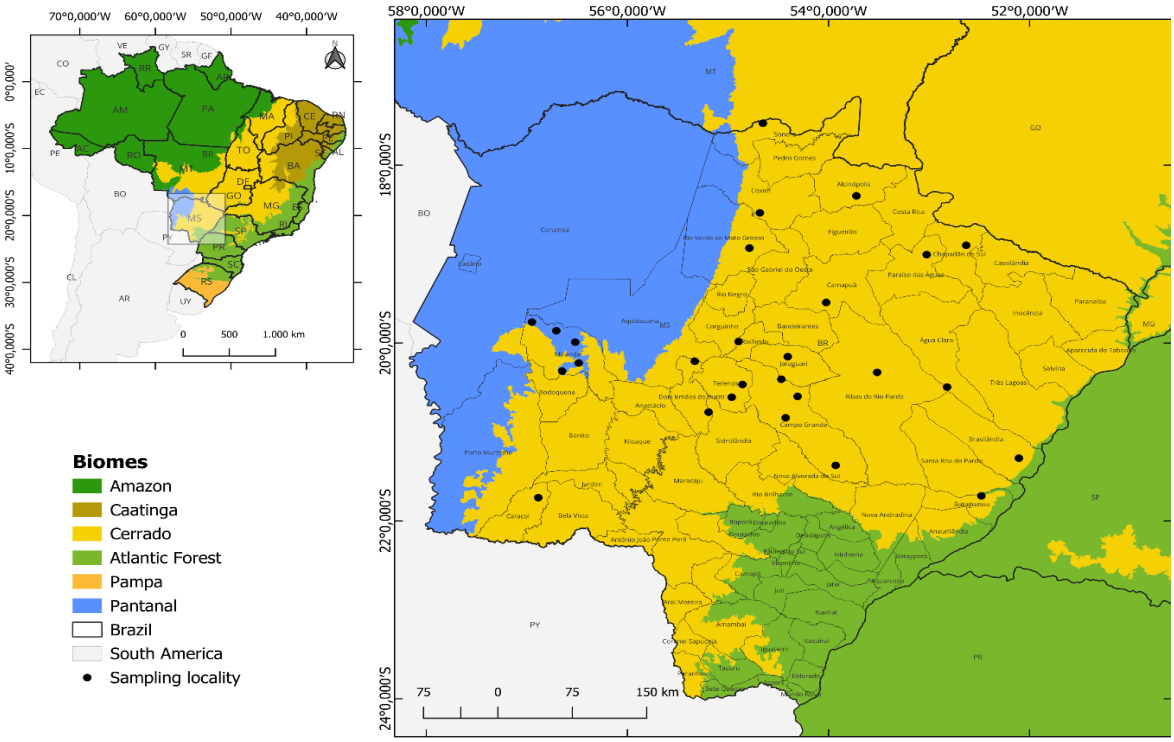

Figura 5. Mapa do estado de Mato Grosso do Sul demostrando os Biomas Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica, com localização das propriedades indicadas por pontos (•).

Nem todas as amostras passaram pelo mesmo processamento, sendo especificado abaixo a quantidade e processos realizados:

Dentre as amostras colhidas, todas (456) foram submetidas a análise microbiológica no Laboratório de Bacteriologia da FAMEZ/UFMS.

Para detecção viral, parte das amostras colhidas (269) e recepcionadas no Laboratório de Bacteriologia foram acondicionadas em microtubos de 2 ml contendo de RNA*later*™ (Invitrogen) e armazenadas a -80°C.

A RT- PCR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da UFMS e Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), após extração de RNA com TRIzol™ (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Do total de amostras, 310 foram separadas em outro microtubo, e submetidas a extração de DNA no laboratório de Biologia Molecular da FAMEZ/UFMS, para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. Parte dessas amostras também foi enviada ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FAMEZ/UFMS, em

até 48 horas pós coleta, para demais análises (contagem de ovos e oocistos por grama de fezes, além de esporulação de *Eimeria* spp.).

Juntamente com as amostras biológicas, foram coletados dados clínicos (sinais clínicos em geral de cada animal) e epidemiológicos (sexo, raça, idade, procedência, entre outros) por meio de formulários (Anexo 3).

4.2 Análise bacteriológica

As 456 amostras foram semeadas em placas contendo ágar MacConkey (HiMedia®, Mumbai, Índia), sendo incubadas a 37 ± 1º C por 18 a 24 h. Após o período de crescimento inicial as amostras provenientes do cultivo em MacConkey foram separadas de acordo com características das colônias e características morfotintoriais (coloração de Gram).

O processamento das amostras se deu segundo Quinn et al., (2005) para *Salmonella* sp. e segundo Miller and Wright (1982) para *Escherichia coli*. Uma bateria de provas bioquímicas específicas para enterobactérias foi realizada quando a suspeita era *E. coli* ou *Salmonella* spp. utilizando ágar TSI (Triplo Açúcar Ferro), SIM (Sulfureto, Indol, Motilidade), Citrato de Simmons, Fenilalanina, Lisina Ferro, Ureia e MRVP. Amostras que apresentaram características bioquímicas compatíveis com o gênero *Escherichia coli* ou *Salmonella* spp., foram submetidas a PCR.

4.3 Análise de resistência antimicrobiana

Amostras com características bioquímicas compatíveis com *Escherichia coli* foram submetidas ao teste de sensibilidade a antibióticos (TSA). A cepa *American Type Culture* (ATCC) 25922 foi utilizada como controle, conforme recomendado *pelo Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para testes de suscetibilidade antimicrobiana.

As análises foram realizadas utilizando o método padrão de difusão em disco e interpretadas de acordo com as diretrizes do CLSI (2021) e CLSI VET01S (2023). Para a determinação do antibiograma, as colônias foram semeadas com alça em tubo de solução salina até atingir turbidez compatível com grau 0,5 na escala MacFarland (1 x 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL) e depois

semeadas em placa com ágar Mueller-Hinton usando swab (em cinco direções), empregando os seguintes antibióticos: florfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), trimetoprim/sulfametoxazol (25 µg), penicilina (10 UI), norfloxacina (10 µg), cefalexina (30 µg), enrofloxacina (5 µg), cefalotina (30 µg), amoxicilina (10 µg) e amoxicilina (20 µg) + ácido clavulânico (10 µg) . A placa de antibiograma foi levada à estufa a 37ºC e após 18 a 24 horas realizada a leitura. Os diâmetros da zona de inibição foram interpretados com base nas diretrizes do CLSI.

Os antimicrobianos foram selecionados pela frequência de uso nas propriedades. Os isolados foram classificados como MDR quando resistentes a um ou mais antimicrobianos dentre três ou mais categorias testadas. Extensamente resistente a medicamentos (XDR) foi registrado quando um isolado não era suscetível a pelo menos um agente em todas as categorias antimicrobianas, exceto duas ou menos. Pan-resistente a medicamentos (PDR) foi registrado quando uma cepa era resistente a todos os agentes antimicrobianos de todos os grupos testados (MAGIORAKOS et al., 2012).

4.4 Análise molecular

4.4.1 Análise molecular para detecção de *Escherichia coli*

Para análise molecular, DNA de 451 isolados bacterianos foram obtidos após semeadura em caldo de infusão e cérebro e coração (BHI), incubação por 24 horas e sedimentação por centrifugação a 10.000xg por 5 minutos, posteriormente a extração se deu conforme Araújo et al. (2009) com fenol e clorofórmio.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25uL, de acordo com Costa et al., (2010), os oligonucleotídeos estão disponíveis na tabela 1.

Tabela 1 **-** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e seus respectivos alvos e produtos de amplificação para identificação de *Escherichia coli* patogênicas

Gene	**Iniciador**	**Sequência (5' – 3')**	**pb**	**Anelamento**
Toxina termoestável (est)	ST-1	CTGTATTGTCTTTTTCACCT	182	56ºC
	ST-2	GCACCCGGTACAAGCAGGAT		
Toxina temolábil (elt)	LT-1	AGATATAATGATGGATATGTATC	300	52ºC
	LT-2	TAACCCTCGAAATAAATCTC		
Intimina (eae)	EAE-1	AAACAGGTGAAACTGTTGCC	454	50ºC
	EAE-2	CTCTGCAGATTAACCTCTGC		
Toxina Shiga 1 (stx1)	STX-1ª	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	56ºC
	STX-1B	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
Toxina Shiga 2 (stx2)	STX-2ª	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	56ºC
	STX-2B	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
Necrosantes citotóxicos (Cnf)	Cnf 1	GAACTTATTAAGGATAGT CATTATTTATAACGCTG	543	56ºC
	Cnf 2	AAT CTA ATT AAA GAG AAC CATTATTTATAAGCGTG	543	56ºC

Os isolados de *E. coli* foram classificados em patótipos conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação dos patótipos de *Escherichia coli* de acordo com o gene de virulência (Costa et al., 2010).

Categorias patogênicas	**Genes de virulência característicos**
EPEC	*eae* (intimina) com ausência de *stx*
ETEC	elt (*ltII*) e/ou est *sta* (enteroxinas)
EHEC	*stx*1 ou *stx*2 e *eae* (intimina)
STEC	*stx*1 e/ou *stx*2

4.4.2 Análise molecular para detecção de *Cryptosporidium* spp.

Foi realizada extração de DNA de 310 amostras fecais, utilizando protocolo adaptado de Araújo et al. (2009), o qual já foi previamente utilizado para extração de DNA de amostras fecais por Souza et al. (2018).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25uL. Primeiramente foi verificada viabilidade do DNA extraído por meio de amplificação de uma sequência do gene constitutivo, segundo Matsunaga et al. (1999) com primer R (5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3') e primer F (5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA- 3').

Depois as amostras foram enfim submetidas a PCR para pesquisa de *Cryptosporidium*, segundo Hadfield et al., (2011) com primer CRU18S-R 5'-GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGG-3' e primer CRU18S-F 5'-CTGCTTTAAGCACTCTAATTTTCTCAAAG-3'.

4.4.3 Análise molecular para detecção viral

Para extração de RNA, diretamente das amostras fecais, foi utilizado TRIzol™ (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Após extração as amostras foram congeladas a -80ºC ou diretamente submetidas a transcrição reversa.

As 269 reações de RT- PCR também foram realizadas em um volume final de 25 uL, seguindo protocolos definidos para cada agente conforme referências apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT- PCR e seus respectivos alvos e produtos de amplificação.

Vírus	**Iniciador**	**Sequência (5' – 3')**	**pb**	**Anelamento**	**Referência**
Coronavirus	Bcov-1	CGATGAGGCTATTCCGAC	454	55ºC	Takiuchi et al., (2006)
	Bcov-2	TGTGGGTGCGAGTTCTGC			
	Bcov- 3	TTGCTAGTCTTGTTCTGGC	251		
Rotavírus	VP7-1	GCCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1062	48ºC	Isegawa et al., (1993)
	VP7-2	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG			
	VP4-1	TTCATTATTGGGACGATTCACA	863		
	VP4-2	CAACCGCAGCTGATATATCATC			
Enterovírus	BEV-1	AGGATGATGATTGGCAGATTTTGT	336	60ºC	Zhu et al., (2014)
	BEV- 2	CATGTGGAAGTGTCTTTTGAGGAA			
Norovírus	Nebo2	CGCTCCATGTTYGCBTGG	282	58ºC	Turan et al., (2018)
	Nebo1	ATCAGCACATGRGGRAACTG			

Nebovírus	IIIBovNo-1	TYTAYGACGGGCGCTWTTATGG	516	58ºC	Turan et al., (2018)
	IIIBovNo-2	AGACAGTGCCGAAAAGGGTGTA			
Pestivirus	BVDV- 1	ATG CCCTAGTAGGACTAGCA	288	60ºC	Vilček et al., (1994)
	BVDV-2	AGAGGCTAGCCATGCCCTTAGT			
Kobuvírus	UNIV-kobu-F	TGGAYTACAAGTGTTTTGATGC	216	49ºC	Reuter et al., (2009)
	UNIV-kobu-R	ATGTTGTTRATGATGGTGTTGA			

4.4.4 Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 1% ou 2%, a depender do tamanho dos fragmentos amplificados, em TAE 1X. As eletroforeses foram realizadas por aproximadamente 60 minutos a 60 V em cuba horizontal, e a imagem registrada através de sistema de fotodocumentação.

4.5 Análise parasitológica

As 310 amostras de fezes foram submetidas a contagem de ovos por grama de fezes (OPG), utilizando a técnica de McMaster modificada (GORDON; WHITLOCK, 1939), com sensibilidade de 1:25.

Amostras positivas para *Eimeria* sp. na técnica de OPG foram separadas em *pools* por propriedade em diarreicas e não diarreicas e submetidas a esporulação (CRUVINEL et al. 2018) (Figura 6).

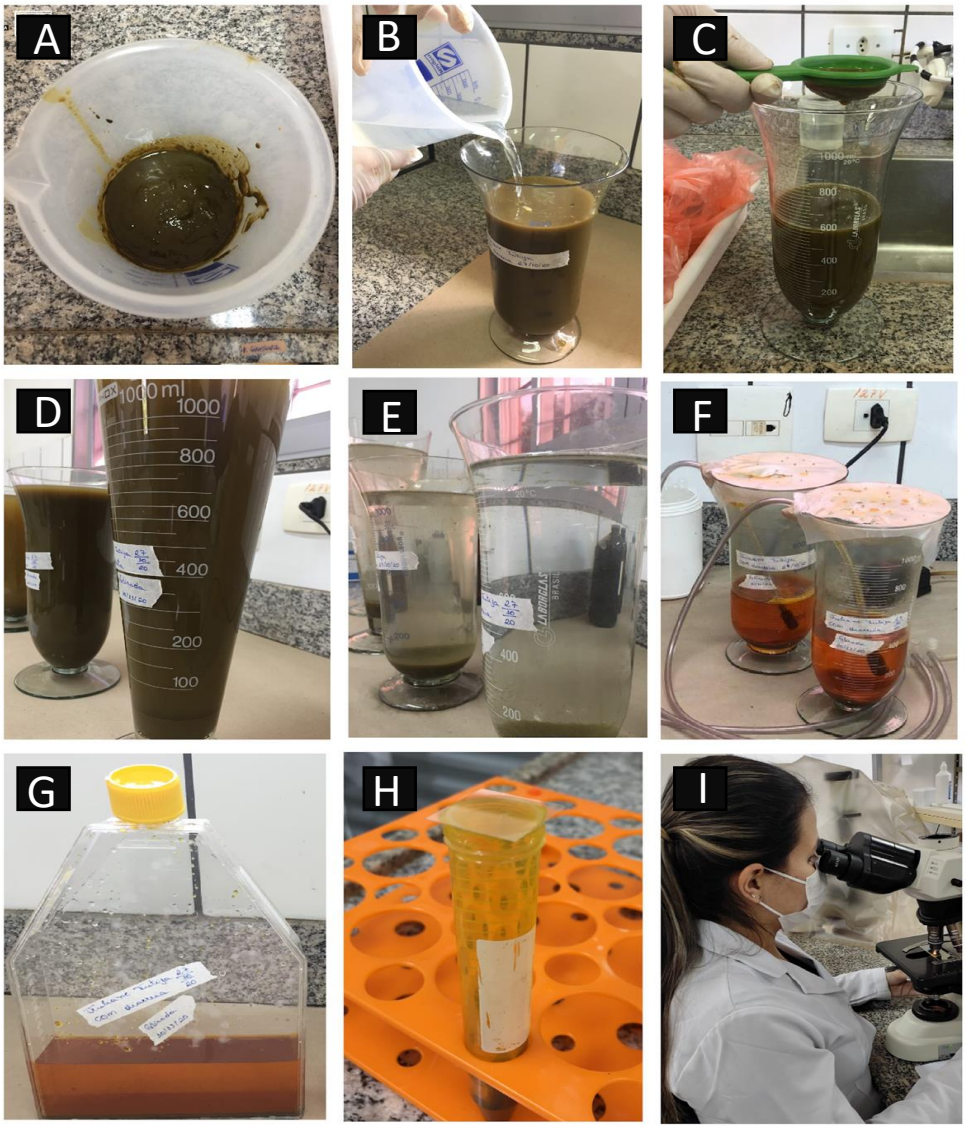

Figura 6- Ilustração dos passos para esporulação de *Eimeria* spp.

Aproximadamente 100 oocistos por *pool* (de cada categoria animal) foram identificados em microscópio óptico. A diferenciação entre as espécies foi feita de acordo com as características fenotípicas dos oocistos, como cor, presença ou ausência de micrópila e comprimento e largura (DAUGSCHIES; NAJDROWSKI, 2005; TAYLOR et al. 2010).

Detecção de ovos de helmintos foi realizada também por meio da técnica de McMaster modificada (GORDON; WHITLOCK, 1939). No entanto, o foco no presente estudo foram as diarreias bacterianas, virais e causadas por protozoários.

4.6 Análise de dados

A análise das frequências de patógeno entre as amostras com e sem diarreia, em cada um dos parâmetros avaliados (idade, sexo, raça, região, etc), foram realizadas por meio de estatística descritiva. As associações foram avaliadas com o auxílio dos testes Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher, com nível de significância de 5% tanto para *E. coli*, quanto para *Eimeria* spp. Também foi avaliado pelo teste Qui-quadrado as associações entre patótipos de *E. coli* e resistência a antimicrobianos.

Estatísticas descritivas foram realizadas para determinar frequências de patógenos em amostras com e sem diarreia para cada variável de interesse das amostras de *E. coli* (idade, sexo, raça, região, etc.).

A análise das frequências de espécies de *Eimeria* spp. foi realizada por meio de estatística descritiva.

Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism®, versão 5.01.

O programa para elaboração dos mapas foi o QGis. versão 3.34.0. Os shapefiles foram obtidos no site do IBGE (https://www.ibge.gov.br/geociencias/downloads-geociencias.html).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 456 amostras de fezes, dessas 136 estavam não diarreicas (29,82%) e 320 apresentavam aspecto pastoso a líquido com ou sem a presença de sangue (70,17%), sendo classificadas como diarreicas. Quanto a localização, 383 (83,99%) pertenciam ao bioma Cerrado e 73 (16,00%) ao bioma Pantanal.

5.1 Identificação bacteriológica

O *E. coli* ocorreu em 451 das 456 amostras coletadas: 383 (83,99%) do bioma Cerrado e 73 (16,00%) do bioma Pantanal. No Cerrado, 246 (65,07%) animais tinham ≤ 30 dias de idade, 129 (34,12%) tinham 31 a 60 dias de idade e apenas três (0,79) tinham 61 a 90 dias de idade. No Pantanal, 20 (27,39%) animais tinham ≤ 30 dias de idade e 53 (72,60%) tinham 31-60 dias de idade. Não foram

coletadas amostras de fezes de animais de 61 a 90 dias de idade no bioma Pantanal. Houve isolamento de *E. coli* em 100% das amostras do Pantanal, enquanto no Cerrado 83% das amostras, esse resultado pode ser atribuído ao manejo dos animais do Cerrado, pois alguns animais estariam em tratamento com antimicrobianos, fazendo com que não houvesse crescimento bacteriano.

Em relação as 4 amostras em que não houve crescimento bacteriano, acredita-se que possa ser em decorrência de tratamentos com antibioticoterapia nos animais antes do envio das amostras para cultivo, resultando em amostras negativas.

O processamento das amostras foi baseado em Procop et al. (2018). As colônias isoladas (451) foram identificadas como *E. coli* (figura 7), pois todas apresentavam as seguintes características morfotintoriais e bioquímicas: bacilos Gram-negativos, produtores de catalase, negativos para citocromo oxidase, fermentadores de glicose e lactose, ausência de sulfeto de hidrogênio (H2S), presença de gás, motilidade positiva, produção de indol, presença de lisina descarboxilase, teste de vermelho de metila positivo, ausência de acetoína, ausência de urease e negativo para citrato de Simmons.

Figura 7. Colônias de *Escherichia coli* em ágar MacConkey.

Existem *E. coli* patogênicas que são agrupadas de acordo com seus mecanismos de patogenicidade, em patótipos que estão frequentemente associados à doença e lesões em animais (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

Desta forma, para confirmação de diarreia por *E. coli* é necessária a identificação de amostras de *E. coli* diarreiogênicas, não sendo possível distingui-las somente com o cultivo microbiológico (NATARO; KAPER, 1998; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Em relação a *Salmonella* spp., nenhuma das 456 amostras de fezes semeadas foram positivas. A ausência de isolados positivos para *Salmonella* spp. pode ter ocorrido por dois possíveis fatores: surtos e método de cultivo.

Quando há grandes casos de identificação da bactéria nas amostras de fezes, estas geralmente ocorrem em surtos (GUIZELINI et al., 2020). Em propriedades em que não se foi isolado anteriormente *Salmonella*, são difíceis as identificações dos agentes, como é o caso de Vasconcelos et al., (2021) que encontraram 2,71% de *Salmonella* spp. em 111 amostras e Bilbao et al., (2018) detectaram em 726 bezerros a prevalência de 5,5% de *Salmonella* sp. em estabelecimentos localizados numa importante região produtora de leite da Argentina.

Outro fato é que as amostras não foram cultivadas em meios específicos como: caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis e Tetrationato, ágar Verde Brilhante, ágar *Salmonella Shigella*, e ágar Hektoen Enteric (BRASIL, 2011; CASAUX et al., 2019). O enriquecimento seletivo favorece o aumento contínuo de *Salmonella* spp. nos caldos, impedindo a proliferação da microbiota acompanhante. Também são utilizados nessa etapa diferentes agentes inibitórios adicionados aos meios, o que aumenta ainda mais sua seletividade, sendo os corantes, como o verde brilhante e o verde malaquita, os mais usados (BRASIL, 2011).

5.2 Avaliação de sensibilidade antimicrobiana

Após a realização dos antibiogramas, todos os 451 isolados de *E. coli* (100%) apresentaram alguma resistência fenotípica aos antimicrobianos (figura 8). 68 isolados (15,07%) foram resistentes a um grupo de antimicrobianos, 78 (17,29%) foram resistentes a dois grupos e 305 (67,62%) foram resistentes a três ou mais grupos, caracterizando estes últimos isolados como MDR (MAGIORAKOS et. al., 2012). Como controle foi utilizada a cepa American Type Culture (ATCC) 25922,

que é reconhecida como cepa controle pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para testes de suscetibilidade antimicrobiana.

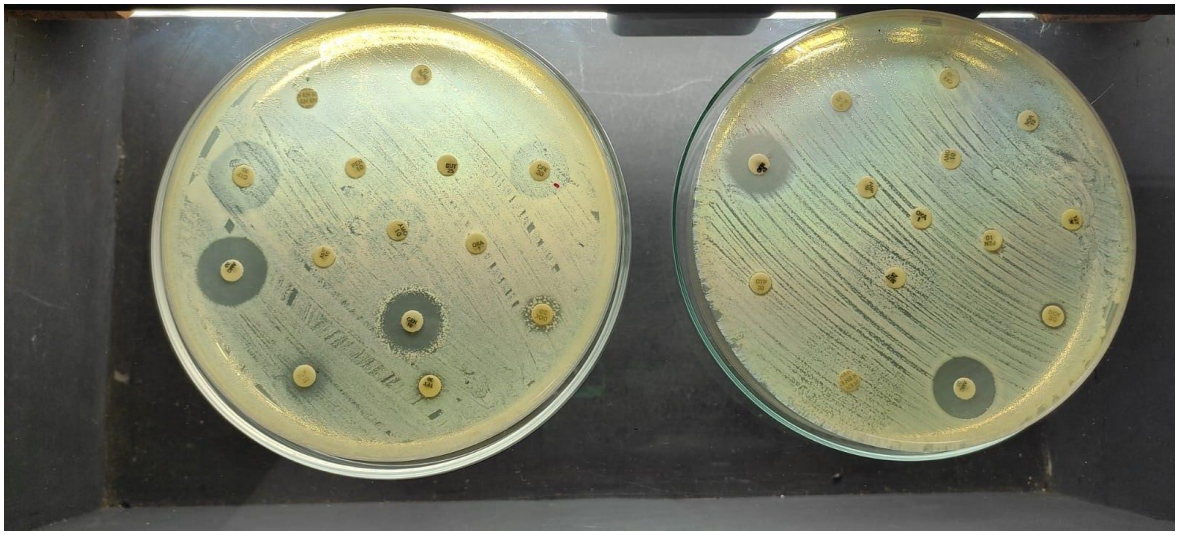

Figura 8. Placa de petri contendo ágar Mueller Hinton para testes de sensibilidade a antimicrobianos com discos impregnados com antibióticos, contendo isolados de *Escherichia coli*.

Um total de 281 isolados (74,33%) do bioma Cerrado eram MDR e 97 (25,66%) não eram MDR, enquanto 24 (32,00%) no bioma Pantanal eram MDR e 49 (67,12%) não eram MDR. A frequência de isolados MDR no Cerrado foi significativamente maior que no Pantanal (p = 0,0001). O perfil de suscetibilidade dos 451 isolados de *E. coli* provenientes de fezes de bezerros do Cerrado e Pantanal é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana utilizando teste de difusão em disco para 451 isolados *de E. coli* dos biomas Cerrado e Pantanal, Brasil.

Antimicrobiano	**Cerrado n = 378**		**Pantanal n = 73**	
	Susceptível (%)	Resistente (%)	Susceptível (%)	Resistante (%)
AMO	120 (31.74%)	258 (68.25%)*	49 (67.12%)	23 (32.87%)
AMC	306 (80.95%)	72 (19.04%)*	70 (95.89%)	3 (4.10%)
OXA	0 (0%)	378 (100%)*	(0%)	73 (100%)
PEN	0 (0%)	378 (100%)*	(0%)	73 (100%
CFE	225 (59.52%)	153 (40.47%)*	53 (72.60%)*	20 (27.39%)

GEN	342 (90.47%)	36 (9.52%)*	73 (98.63%)	0 (1.36%)
TET	58 (15.34%)	320 (84.65%)*	48 (65.75%)	25 (34.24%)
SUL	148 (39.15%)	230 (60.84%)*	48 (70.08%)	25 (21.91%)
EM	249 (65.87%)	129 (34.12%)*	72 (98.63%)	1 (1.36%)
NOR	282 (74.60%)	96 (25.13%)*	72 (98.63%)	1 (1.36%)
FLF	325 (85.97%)	53 (14.02%)	72 (98.63%)	1 (1.36%)

AMO: amoxicillina, AMC: amoxicillina + ácido clavulanico, OXA: oxacillina, PEN: penicillina G, CPE: cefalexina, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, SUL: sulfazotrim, EN: enrofloxacina, NOR: norfloxacina, FLF: florfenicol. * Diferença estatisticamente significativa pelo teste Qui-quadrado (P<0,05).

Na comparação dos grupos MDR e não MDR, não foram encontradas diferenças significativas em relação à raça, sexo ou idade em nenhum dos biomas.

No presente estudo, foi encontrada alta frequência de isolados de *E. coli* multirresistentes no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Embora altas frequências também tenham sido relatadas em estudos anteriores, é importante compreender a intensidade da ocorrência de multirresistência bacteriana, especialmente quando associada à criação comercial de animais e fontes de alimento para uma parcela significativa da população mundial. A resistência antimicrobiana é uma das maiores ameaças à saúde pública (O'NEILL, 2016). O uso indiscriminado de antimicrobianos é considerado um fator importante na indução de resistência antimicrobiana e consequente comprometimento da saúde humana

A crescente proximidade entre animais domesticados e humanos permitiu a troca de patógenos entre diferentes espécies, bem como a transferência de genes de resistência entre espécies, causando problemas de saúde e taxas de mortalidade mais elevadas para uma ampla gama de animais, incluindo humanos (ZHU et al., 2018; KIPKORIR et al., 2020). Isso pode explicar o maior percentual de isolados MDR no bioma Cerrado em comparação ao bioma Pantanal. As densidades populacionais humanas e bovinas são maiores no Cerrado, favorecendo a troca de patógenos e genes de resistência (LAMMERS et al., 2016; MUNNS et al., 2016). Levantamentos indicam que a densidade populacional

humana no Cerrado é de 46 milhões de habitantes em dois milhões de km² (aproximadamente 23 habitantes por km^2) (RIBEIRO et al., 2008). Em contrapartida, 308 mil habitantes vivem em uma área de 0,097 milhão de km² no Pantanal (aproximadamente três moradores por km^2) (FAMASUL, 2021). Além disso, estudos têm associado a qualidade da água à densidade populacional em diferentes regiões do mundo, sendo as impurezas encontradas com maior frequência em fontes das regiões mais populosas (UNICEF, 2019). Outro aspecto a considerar é o fato de o manejo animal ocorrer de forma mais planejada no Pantanal em comparação ao Cerrado, pois diversas regiões são de difícil acesso, levando à redução no uso de antimicrobianos.

Tetraciclina, ampicilina e sulfonamida estão entre os antimicrobianos mais utilizados na produção animal no Brasil e estão relacionados ao surgimento de *E. coli* resistente em diversos países (CHANTZIARAS et al., 2014). Nas propriedades rurais pesquisadas, os principais antimicrobianos utilizados foram sulfonamida e tetraciclina, explicando o alto índice de resistência bacteriana, principalmente no Cerrado. As maiores taxas de resistência foram encontradas para penicilina (100%), oxacilina (100%) e tetraciclina (79,79%). A resistência à penicilina é muito comum, devido principalmente à inativação enzimática pela produção de β-lactamases. *E. coli* apresentam resistência intrínseca a esse antibiótico, tornando seu uso inadequado, porém a inclusão da PEN foi feita pelos relatos frequentes de uso nas propriedades.

Os isolados foram mais sensíveis ao florfenicol (85,97% no Cerrado e 98,63% no Pantanal) e à gentamicina (90,47% no Cerrado e 98,63% no Pantanal). A sensibilidade dos isolados à gentamicina foi comparável à relatada por Ababu et al. (2020) e Fesseha et al. (2022).

5.3 Análise molecular

5.3.1 Identificação molecular dos patótipos de *Escherichia coli*

No Cerrado, o STEC foi o patótipo mais comum (28%), seguido pelo ETEC (11%), EHEC (8%) e EPEC (2%). Na maioria dos casos, foi mais comum a ocorrência concomitante de patótipos, sendo os mais frequentes ETEC + STEC (33%), ETEC + EHEC (15%) e ETEC + EPEC (3%). No Pantanal, o patótipo STEC

também foi o mais frequente (30%), seguido por EHEC (12%), ETEC (9%) e EPEC (6%). Quanto à ocorrência concomitante de patótipos, os mais frequentes foram ETEC + EHEC (25%), ETEC + STEC (13%) e ETEC + EPEC (5%). A análise estatística revelou diferença significativa entre biomas apenas para a combinação ETEC + STEC (p = 0,0009) (Figura 9), com maior frequência encontrada no cerrado.

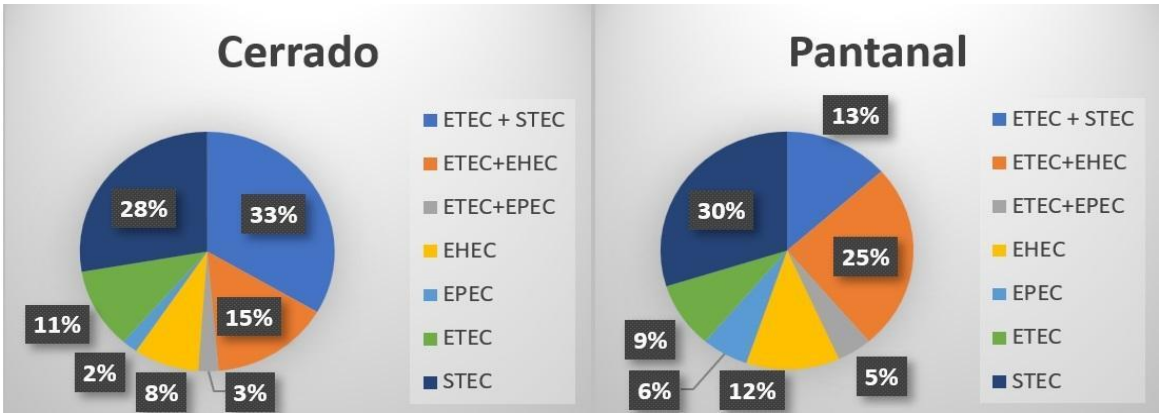

Figura. 9. Distribuição relativa de patótipos de *E. coli* detectados por PCR em amostras fecais de bezerros dos biomas Cerrado e Pantanal, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

Em uma avaliação geral dos patótipos com e sem MDR, foi encontrada diferença significativa apenas para STEC (p = 0,0486), que teve uma frequência significativamente maior de isolados MDR.

Após a identificação dos patótipos, os isolados foram classificados como MDR, XDR ou PDR, conforme estabelecido por Magiorakos et al. (2012) (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência absoluta e relativa (%) dos patótipos de *Escherichia coli* classificados como MDR, XDR e PDR.

	Tipos de resistência		
***Escherichia coli* patotipos**	**MDR**	**XDR**	**PDR**
ETEC	21 (10.09%)	13 (14.13%)	1 (20%)
EHEC	17 (8.17%)	7 (7.6%)	0 (0%)
EPEC	7 (3.36%)	0 (0%)	0 (0%)
STEC	53 (25.48%)	16 (17.39%)	1 (20%)

ETEC+EHEC	27 (12.98%)	17 (18.47%)	1 (20%)
ETEC+EPEC	7 (3.36%)	0 (0%)	0 (0%)
ETEC+STEC	57 (27.4%)	33 (35.86%)	1 (20%)
Não identificado	19 (9.13%)	6 (6.52%)	1 (20%)
Total	208 (100%)	92 (100%)	5 (100%)

MDR: multirresistente; XDR: extensivamente resistente a medicamentos; PDR: pan-resistente a medicamentos

Os ruminantes são os principais reservatórios de STEC. Alguns animais podem eliminar grandes quantidades, resultando em contaminação ambiental (FERENS et al., 2011). Grandes surtos em humanos têm sido associados à ingestão de alimentos contaminados por STEC (NGUYEN et al., 2015). Este foi o patótipo mais frequente no presente estudo (30% no Pantanal e 28% no Cerrado), gerando preocupações com a saúde da população e ressaltando a importância da realização do correto diagnóstico e identificação dos patótipos.

A ETEC é outro patótipo importante em termos de saúde pública. Segundo relatórios da Organização Mundial da Saúde, a ETEC causa mais de 157.000 mortes humanas por diarreia anualmente (COURA et al., 2015). Também causa doenças diarreicas agudas em bovinos, aves e leitões (AKTAS; OZUBEK, 2018). No presente estudo, a ocorrência concomitante de ETEC e STEC foi significativamente mais frequente no bioma Cerrado (p= 0,0009), onde as densidades populacionais humanas e bovinas são maiores. A ETEC também foi o patótipo com o segundo maior percentual de resistência.

A análise dos patótipos MDR revelou maior percentual de resistência em STEC e ETEC + STEC para todos os tipos de resistência (MDR, XDR e PDR). Os bovinos são portadores assintomáticos de STEC e responsáveis pela disseminação deste patótipo, pois a principal via de transmissão de STEC para humanos é através do consumo de alimentos contaminados de origem animal (GONZALEZ et al., 2016). Em humanos, esse patotipo pode causar diarreia e colite hemorrágica e ocasionalmente levar à síndrome hemolítico-urêmica (MELTON-CELSA et al., 2012).

Um estudo realizado por Elmonir et al. (2021) no Egito mostraram que 51,4% dos isolados de STEC tinham o fenótipo MDR, entre os quais 44,44% vieram de bovinos com diarreia. No presente estudo, os patótipos STEC MDR (25,48%), XDR

(17,39%) e PDR (20%) vieram de animais com e sem diarreia. As regiões do Cerrado e do Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul são grandes exportadoras de carne bovina do Brasil e a potencial transmissão zoonótica desses isolados para humanos constitui uma ameaça emergente à saúde pública.

Os antimicrobianos são ferramentas importantes para a manutenção da saúde humana e animal em todo o mundo (OMS, 2014), mas não devem ser utilizados de forma descontrolada, especialmente para o tratamento de animais que abrigam cepas patogênicas que são frequentemente zoonóticas. No presente estudo, os animais do bioma Pantanal apresentaram menor frequência de cepas MDR do que os do bioma Cerrado. Embora possíveis fatores tenham sido discutidos, é necessário obter uma compreensão mais precisa das razões desta diferença e dos possíveis impactos do aumento do tráfego na região resultante de uma maior integração rodoviária, com a potencial propagação de estirpes multirresistentes que afetam animais e saúde humana.

5.3.2 Identificação molecular de *Cryptosporidium* sp.

Em relação ao coccídeo *Cryptosporidium* sp., apenas duas das 310 amostras (0,64%) apresentaram resultados positivo. Baixas taxas de infecção em bovinos foram relatadas no Irã com 4,7% (FIROOZI et al., 2019), na China com 5,09% (ZHANG et al., 2015) e na Etiópia com 13% (HAILU et al., 2020). Além disso, um menor número de bezerros amostrados em cada rebanho pode reduzir significativamente a probabilidade de encontrar bezerros positivos, especialmente em rebanhos com prevalência muito baixa (LOMBARDELLI et al., 2019). Como foi examinada apenas uma amostra fecal de cada bezerro, o verdadeiro valor da prevalência pode ter sido subestimado no presente estudo.

5.3.3 Identificação molecular viral

Já na análise por RT-PCR, das 269 amostras, todas apresentaram resultados negativos para Rotavírus, Coronavírus, Nebovírus, Norovírus, Pestivírus, Kobuvírus. O presente estudo não identificou nenhum dos 6 vírus pesquisados. Uma das hipóteses para esses resultados, são os baixos percentuais de positivos no Brasil. Em um estudo realizado por Cruviel et al., (2020) em 29

municípios de vários estados do Brasil, das 361 amostras fecais examinadas por RT-PCR, 26 (7,2%) foram positivas para Coronavírus e 23 (6,37%) positivas para Rotavírus. O acondicionamento das amostras também pode ser um fator a ser levado em consideração, pois elas eram coletadas nas propriedades e apenas no laboratório era adicionadas ao RNA latter ou congeladas a -80ºC, isso pode ter causado a degradação do RNA. Porém, se esses vírus fossem realmente importantes como causadores de diarreia no estado, mesmo que em baixas quantidades os mesmos seriam identificados.

Outro fato a ser considerado é devido a excreção intermitente, bezerros positivos eliminam BCoV nas fezes uma vez ou intermitentemente. Em animais inoculados oralmente, o BCoV foi detectado nas fezes por um a três dias consecutivos e intermitentemente (CHO et al. 2001), já em um estudo realizado por Coura et al., (2015), ao analisarem 850 amostras de fezes, 93 (10,9%) foram positivas para BCoV, essas amostras foram coletadas por vários dias do mesmo animal. O BCoV foi detectado em 22 bezerros diarreicos, e a eliminação ocorreu no primeiro (n = 16), segundo (n = 5) e terceiro (n = 1) dias do episódio diarreico. Como tanto o rotavírus, quanto o coronavírus são excretados mais de uma vez e bezerros jovens são mais suscetíveis, é importante considerar essas informações, pois as amostras do presente estudo foram coletadas uma única vez de cada animal, sendo possível que naquele momento os animais não estivessem excretando o vírus.

5.4 Associação entre patótipos e diarreia em bezerros

Considerando toda a amostragem, sem distinção entre região (Pantanal ou Cerrado), o *odds ratio*, ou seja, a chance de um animal com diarreia apresentar resultado positivo para um patótitpo em específico foi o que segue abaixo:

ETEC – 1,82 mais chance de um animal com diarreia ter ETEC do um animal sem diarreia;

STEC – 1,06 mais chance de um animal com diarreia ter STEC do um animal sem diarreia.

Já para os demais patótipos o Odds foi inferior a 1, significando que não há relação entre a positividade para esses patótipos e o efeito diarreia.

Agora quando analisamos mais detalhadamente apenas os resultados para o patótipo ETEC, uma vez que foi o único a apresentar alguma relação entre presença e efeito diarreia, observamos que com relação a raça, nelore tem 1.39 vezes mais chance de um animal com diarreia ser positivo para ETEC, enquanto que nos cruzados essa chance sobre para 2.2 vezes.

Já com relação a idade, os animais com idade até 30 dias possuem 1.5 vezes mais chance de apresentar resultado positivo para ETEC e apresentar diarreia, em relação aos negativos. Enquanto que os animais com mais de 30 dias têm 2.42 vezes mais chance.

Então, percebemos que aqui na região o patótipo ETEC está mais associado a ocorrência de diarreia em bovinos, os cruzados são mais sensíveis, e os animais com mais de 30 dias de idade também. Mas, a presença do patótipo isoladamente não parece ser o fator principal para a ocorrência de diarreia, apenas com fator de contribuição.

5.5 Identificação parasitológica

Dentre as 310 amostras obtidas, 120 eram de animais não diarreicos (38,70%), e 190 de animais com fezes desde pastosas a líquidas com ou sem a presença de sangue (61,29%), essas amostras foram provenientes de 18 propriedades de gado de corte, distribuídas entre diferentes regiões de Mato Grosso do Sul.

Das 18 propriedades amostradas, apenas em quatro observou-se OOPG positivo para *Eimeria* spp., os valores variaram de 25 à 32900. As quatro propriedades geraram seis pools, isso porque em duas delas, apenas animais com diarreia apresentaram resultados positivos, gerando apenas um pool. As propriedades com resultados positivos para *Eimeria* spp. estão destacadas no mapa da figura 10.

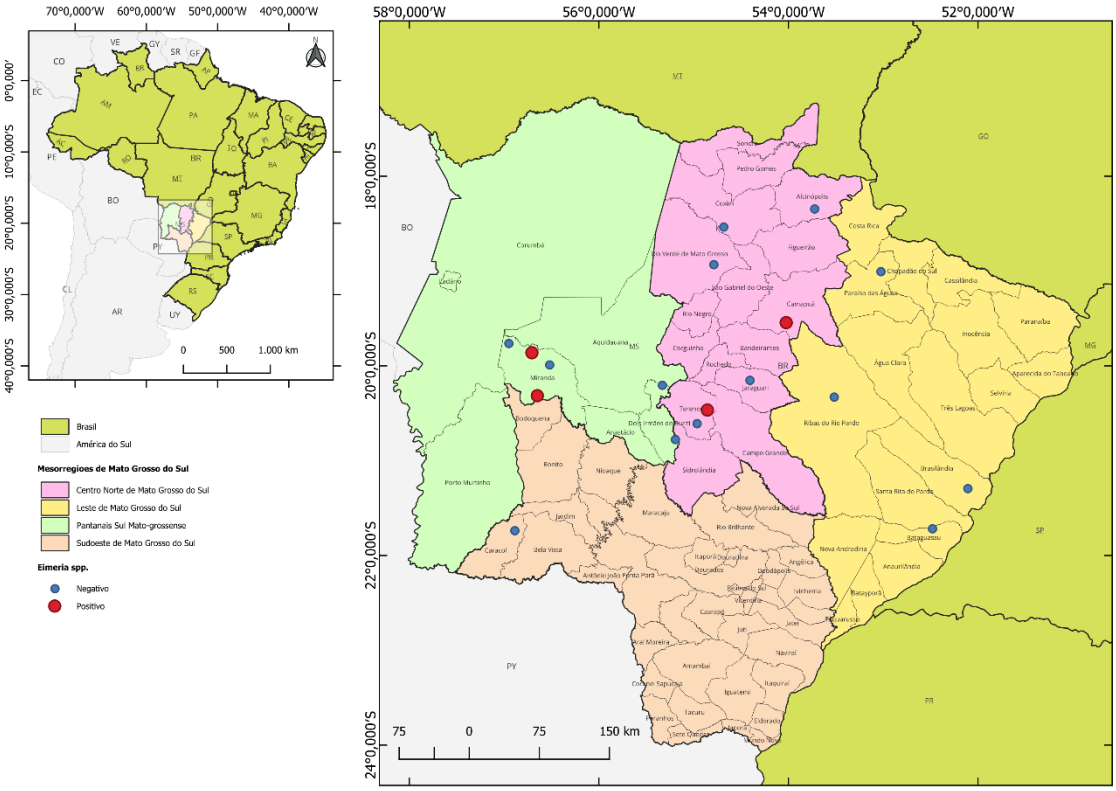

Figura 10. Distribuição das 18 propriedades amostradas no presente estudo (círculos). Marcadas com círculo em vermelho estão as propriedades com resultados positivos para *Eimeria* spp. Marcadas com círculos em azul estão as propriedades nas quais não se encontrou *Eimeria* spp.

Todas as propriedades em que se observou casos positivos para *Eimeria* spp. realizavam o sistema de criação com cria e recria, ou cria, recria e engorda de bovinos. Nas propriedades em que não se observou amostras positivas, algumas realizam apenas o sistema de cria, ou seja, os bezerros nasciam e eram mantidos no mesmo local.

Após a esporulação e classificação, os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da classificação de *Eimeria* spp. em amostras de fezes de bezerros com e sem diarreia em Mato Grosso do Sul, Brasil.

	Propriedades					
Espécies	Propriedade 1 com diarreia	Propriedade 1 sem diarreia	Propriedade 2 com diarreia	Propriedade 3 com diarreia	Propriedade 4 com diarreia	Propriedade 4 sem diarreia

E. alabamensis	0%	3%	0%	0%	0%	0%
E. auburnensis	0%	0%	3%	0%	0%	0%
E. bovis	0%	26%	0%	27%	0%	8%
E. brasiliensis	1%	0%	0%	0%	0%	0%
E. canadensis	9%	20%	0%	0%	0%	0%
E. cylindrica	0%	0%	0%	1%	0%	0%
E. elipsoidalis	4%	0%	34%	0%	0%	84%
E. pellita	1%	46%	0%	0%	0%	0%
E. zuernii	84%	5%	63%	72%	100%	8%

A avaliação micrométrica de alguns oocistos identificados está demonstrada na figura 11.

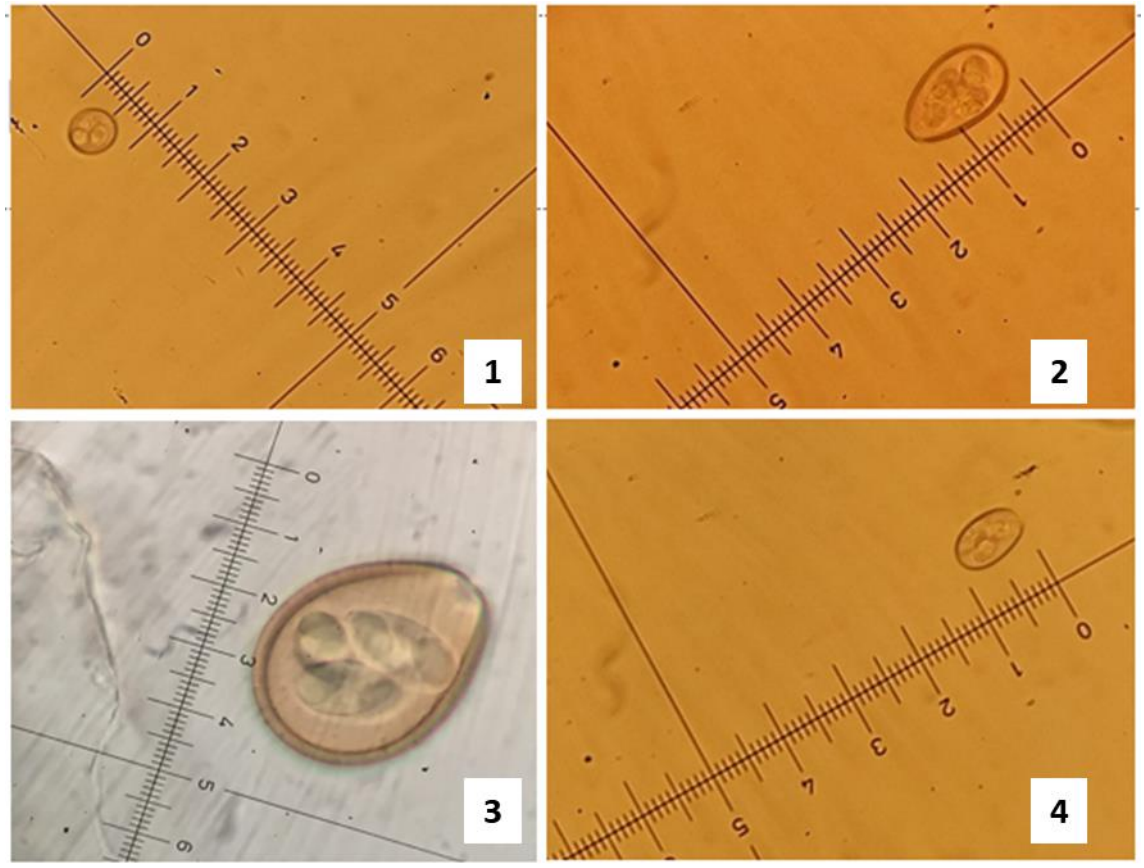

Figura 11. Avaliação micrométrica de oocistos esporulados de *E. zuerni* (1), *E. auburnensis* (2), *E. pellita* (3) *e E. elipsoidalis* (4) em amostras fecais de bezerros em Mato Grosso do Sul, Brasil. Obj 40x Fonte: Arquivo pessoal.

Nove espécies de *Eimeria* foram identificadas entre os seis pools de fezes. A espécie mais prevalente foi *E. zuernii*, estando presente em todas as

propriedades e em maior frequência nas amostras oriundas de animais com diarreia. Infecções mistas envolvendo duas a três espécies foram observadas em 83,33% das amostras positivas. Nas amostras originadas de bovinos sem diarreia, a principal espécie identificada foi *E. ellipsoidalis.*

Após análise estatística pelo método do Qui-quadrado, observou-se que os animais com mais de 30 dias de idade apresentavam uma frequência geral de oocistos significativamente maior do que os animais mais jovens (p = 0,0001). Já em relação à raça, os cruzados (Nelore X Angus) apresentaram frequência geral de oocistos significativamente maior que os animais da raça Nelore (0,0004). Não houve associação significativa entre a frequência geral de oocistos e a ocorrência de diarreia.

A infecção de bezerros por *Eimeria* spp. pode ocorrer nas primeiras horas de vida, porém, o aparecimento de oocistos nas fezes depende do período pré-patente de cada espécie (DÍAZ DE RAMIREZ et al. 2001). A forma subclínica, com presença de oocistos nas fezes e ausência de sinais clínicos é a forma de infecção mais frequente em animais adultos que são considerados portadores assintomáticos e contaminam o ambiente com a liberação de oocistos (JOLEY; BARDSLEY 2006), porém, animais jovens geralmente apresentam sintomatologia e são infectados pelos adultos assintomáticos. O grupo de animais com diarreia foi o que apresentou maior número de oocisto, com uma média de 4.334 oocistos. Já no grupo de animais sem diarreia a média foi de 25 oocistos. Considera-se que a eimeriose clínica existe quando os bezerros apresentam mais de 4.000 de OOPG e sinais de diarreia (KEETON; NAVARRE 2018), portanto o que observamos no presente trabalho.

Após a esporulação observou-se que *E. zuernii* foi a espécie mais prevalente, estando presente em todas as amostras (pools) com ou sem diarreia, seguida por *E. elipsoidalis* presente em três dos seis pools (50%) com uma carga parasitária dessa espécie que variou de 4 a 84% e *E. bovis* presente em três dos seis pools (50%) com a carga parasitária de 8 a 27%. Infecções mistas causadas por duas a três espécies foram encontradas em 100% das propriedades, porém em uma das propriedades, no pool de amostras com diarreia só foi identificada *E. zuernii*, e o número de espécies *de Eimeria* spp. por amostra examinada em

infecções mistas variou de três a cinco. Os bezerros geralmente são coinfectados com duas ou mais espécies, mas nem sempre apresentam sinais clínicos (CARDIM et al. 2018), isso vai depender de quais espécies esses animais albergam, se são patogênicas ou não.

Em relação a identificação de ovos tipo estrongilídeos, apenas 15 (4,83%) dos 310 animais apresentaram resultados positivos, com OPG variando de 25 a 225. Segundo Barbieri et al (2010), os estrongilídeos são o grupo de helmintos que mais tardiamente apareceram, isso se deve ao fato de a infecção ocorrer a partir da ingestão de larvas de terceiro estágio, quando os bezerros passam a pastar, além do período pré-patente de 21 dias. Portanto o baixo número de ovos pode ser explicado pela idade dos bezerros do presente estudo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos, podemos inferir que no estado do Mato Grosso do Sul as diarreias virais não apresentam grande relevância, visto que, nenhum RNA viral foi detectado nas amostras coletas no período do estudo. No entanto, não podemos descartar que ocorram pontualmente em algumas propriedades, causando surtos e grandes prejuízos.

Com relação a *Cryptosporidium* sp., baixas frequência foram encontradas nas amostras analisadas. Demonstrando baixa relevância como causador de diarreias nesse caso.

O coccídeo *Eimeria* spp. foi identificado em algumas propriedades, sendo a infecção por *E. zuernii* a mais comum em animais sintomáticos e *E. ellipsoidalis* em assintomáticos. Portanto, o diagnóstico e identificação das espécies é de grande importância para instituir o tratamento adequado dos animais.

Em relação as bactérias causadoras de diarreia, *Escherichia coli* predomina, sendo *E. coli* produtora da toxina Shiga o patótipo mais frequente identificado nos biomas analisados. Como este patótipo causa doenças em humanos, o presente relato é importante para a saúde pública, embora o patótipo não seja uma causa relevante de doenças em bovinos. Outra preocupação foi a alta frequência de cepas com fenótipos de resistência antimicrobiana. Os pecuaristas no Brasil podem facilmente obter acesso a antimicrobianos e o uso indiscriminado dessas drogas

provavelmente contribuiu para as altas taxas de isolados MDR de origem animal, representando uma ameaça zoonótica em escala nacional e internacional.

7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

Esse estudo pode auxiliar na conduta dos veterinários a campo. Conhecer sobre os principais agentes causadores de diarreia, irá auxiliar os médicos veterinários na conduta clínica correta, principalmente em relação a identificação dos agentes causadores e tratamento correto e melhores medidas preventivas. Do ponto de vista de saúde pública, os resultados aqui observados podem auxiliar na tomada de decisões para implementação de políticas sanitárias que visem reduzir o risco de infecções por bactérias multirresistentes, seja em animais ou humanos.

Além disso, no quesito econômico, esses fatores poderão diminuir os gastos com medicamentos e perdas por mortes dos animais, aumento a produtividade na pecuária.

8. REFERÊNCIAS

ABABU, A.; ENDASHAW, D.; FESSEHA, H. Isolation and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* O157: H7 from raw milk of dairy cattle in Holeta District, Central Ethiopia. **International Journal of Microbiology**., v.2020, p.8, 2020.

ABIEC- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes: ABIEC, 2023. Disponível em: https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023/. Acesso em: 08 junho de 2024.

ACAR, J., & MOULIN, G. Integrating animal health surveillance and food safety: The issue of antimicrobial resistance. **Revue Scientifique et Technique.,** v.32, p.383-392, 2013.

AKTAS, M.; OZUBEK, S. Molecular evidence for trans-stadial transmission of *Anaplasma platys* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. **Medical and Veterinary Entomology**., v.32, p.78-83, 2018.

ALGAMMAL, A.M.; ABO HASHEM, M.E.; ALFIFI, K.J., *et al*. Sequence Analysis, Antibiogram Profile, Virulence and Antibiotic Resistance Genes of XDR and MDR *Gallibacterium anatis* Isolated from Layer Chickens in Egypt. **Infection and Drug Resistance.** v.15, p.4321-4334, 2022.

ALKAN, F.; KARAYEL, I.; CATELLA, C., *et al*. Identification of a bovine enteric calicivirus, Kirklareli virus, distantly related to neboviruses, in calves with enteritis in Turkey. **Journal of Clinical Microbiology**., v. 53, p.3614-3617, 2015.

ANDERSON M. & BLANCHARD P. The clinical syndromes caused by *Salmonella* infection. **Veterinary Medicine**, v.84, p.816-819, 1989.

ANDRADE G.I., COURA F.M., SANTOS E.L.S., *et al*. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, 413 Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. v. 44, p.1783-1790, 2012.

ASLAM, B.; KHURSHID, M.; ARSHAD, M.I. *et al*. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.11, 771510, 2021.

AWAD, W. S.; EL-SAYED, A. A.; MOHAMMED, F. F. *et al*. Molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic and in-contact cattle and buffalo calves. **Tropical Animal Health and Production**, v.*52*, p.3173-3185, 2020.

BAUER A. W.; KIRBY W. M.; SHERRIS M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method**. American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p.493–910 496, 1966.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p.455-912 469. 2009.

BERTO B.P., MCINTOSH D., LOPES C.W.G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, p.1-15, 2014.

BIANCHI, E.; MARTINS, M.; WEIBLEN, R, *et al*. Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarréia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (2000-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.649-655, 2011.

BIHANNIC, M., HAENNI, M., OSWALD, E., *et al*. Divergent Evolution of the repFII Replicon of IncF Plasmids Carrying Cytotoxic Necrotizing Factor cnf2, Cytolethal

Distending Toxin cdtIII, and f17Ae Fimbrial Variant Genes in Type 2 Necrotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Calves**. Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 510-517, 2015.

BILBAO, G.N.; MALENA, R.; JUAN, A., *et al*. Detección de serovares de *Salmonella* en terneros de crianza artificial de la región lechera Mar y Sierras, Argentina, **Revista Argentina de Microbiología**, v. 51, p.241-246, 2019.

BLANCHARD P.C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v .28, p. 443-464, 2012.

BLANCO, M., BLANCO J. E., MORA A.*, et al*. Distribution and characterization of faecal necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1 and CNF2 isolated from healthy cows and calves. **Veterinary Microbiology,** v. 59, p. 183-192, 1998.

BRASIL. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp*.* Ministério da Saúde. Brasília. 64p. 2011.

BROWNLIE J. Coronaviridae. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors. **Fenner's Veterinary Virology***.* 5th ed. San Diego, California: Elsevier; 2017. P. 435–459.

BRUM, L.P.B.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R., *et al*. Detecção de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em amostras de tanques de leite de rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul, RS. **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**, v.11, p.84-87, 2004.

BUESA, J.; COLOMINA, J.; RAGA, J. *et al*. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. **Research in Virology**, v. 146, p.353-361, 1996.

CANDIDO, M.; ALENCAR, A. L.; ALMEIDA-QUEIROZ, *et al*. First detection and molecular characterization of Nebovirus in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v.144, p.1876-1878, 2016.

CARDIM, S. T., SEIXAS, M., TABACOW, V. B. D., et al. Prevalence of *Eimeria* spp. in calves from dairy farms in northern Paraná state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.27, p.118-122, 2018.

CASAUX, M. L.; CAFFARENA, R. D.; SCHILD, C. O. et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* enterica isolated from dairy calves in Uruguay. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.50, p.1139-1144, 2019.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B. *et al*. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.69, p.827-834, 2014.

CHAVES, N.P.; BEZERRA D.C.; DE SOUSA, V.E. *et al*. Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina em bovinos leiteiros não vacinados no estado do Maranhão. **Arquivo Instituto Biológico de São Paulo**, v.79, p.495-502, 2012.

CHENGYUAN JI, YAO ZHANG, RUINI SUN, JIALE MA, ZIHAO PAN, HUOCHUN YAO. Isolation and Identification of Type F Bovine Enterovirus from Clinical Cattle with Diarrhoea. **Viruses**, v.13, p. 2217, 2021

CHO, K.O., HASOKSUZ, M., NIELSEN, P.R., *et al*. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2401–2419, 2001.

CLSI, Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. CLSI supplement M100, v. 41, n. 03. USA, 2021.

CLSI VET01S ED6— Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 6th Edition. 2023.

COBBOLD R.N; HANCOCK D.D; RICE D.H, BERG J. *et al*. Rectoanal junction colonization of feedlot cattle by *Escherichia coli* O157:H7 and its association with super shedders and excretion dynamics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.1563-1568, 2007.

CONSTABLE, P.D. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. **Journal of Veterinary Internal Medicine,** v. 18, p. 8-17, 2004.

CONSTABLE, P.D. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**. v. 25, p. 101-120, 2009.

CONSTABLE, P.D; BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. St. Louis Missouri: Elsevier; 2017.

COSTA, A.R.F.; LIMA, K.V.B.; SOUSA, C.O.; LOUREIRO, E.C.B. Development of multiplex PCR to detect and differentiate the categories of diarrheagenic *Escherichia coli*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v.1, p.77–84, 2010.

COURA F.M., DE ARAÚJO DINIZ S., MUSSI J.M.S., *et al*. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. **Folia Microbiologica,** *v.*62, p.139–144, 2017.

COURA, F. M.; FREITAS, M. D.; RIBEIRO, J. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, p.3–11, 2015.

CRAWFORD, S. E.; RAMANI S.; TATE J. E. *et al*. Rotavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers.** v.3, p.17083, 2017.

CRUVINEL, V.R.N; ZOLNIKOV, T.R.; TAKASHI, OBARA, M. *et al*. Vector-borne diseases in waste pickers in Brasilia, Brazil. **Waste Management**, v.105, p.223-232, 2020.

CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* 460 pathogenicity. **Nature**, v. 8, p. 20-38, 2010.

CRUVINEL, L. B.; BASTOS, T. S. A.; NICARETTA, J. E. *et al*. Surtos consecutivos ocasionados por *Eimeria zuernii* em bezerros de corte de uma propriedade do estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, p.277-284, 2018.

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

DAUGSCHIES A, NAJDROWSKI M. Eimeriosis in cattle: current understanding. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**. v.52, p.417-427, 2005.

DI FELICE, E.; MAUROY, A.; POZZO, F. D*., et al*. Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea diagnosis. **Veterinary Journal**, v.*207*, p.53-62, 2016.

DI MARTINO, B.; DI PROFIO, F.; MARTELLA, V., *et al*. Evidence for recombination in neboviruses. **Veterinary Microbiology***.* v.153, p.367-372, 2011.

DOANE F.W. Electron microscopy for the detection of gastroenteritis viruses. In: Kapikian A.Z., editor. *Viral Infections of the Gastro-intestinal Tract.* Marcel Dekker; New York, USA: 1994. pp. 101–130.

DONG, H.; ZHAO, Q.; HAN, H., *et al*. Prevalence of coccidial infection in dairy cattle in Shanghai, China. **Journal of Parasitology**. v.98, p.963-966, 2012.

ELBEHIRY, A., ALDUBAIB, M., AL RUGAIE, O. et al. *Brucella* species-induced brucellosis: Antimicrobial effects, potential resistance and toxicity of silver and gold nanosized particles. **PLoS One**. v.*17,* 2022.

ELMONIR, W.; SHALAAN, S.; TAHOUN A., *et al*. Prevalence, antimicrobial resistance, and genotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods of cattle origin, diarrheic cattle, and diarrheic humans in Egypt. **Gut Pathogens***. v.*13, p.8, 2021.

BARBIERI, F.S.; BRITO, L.G.; FIGUEIRÓ, M.R., et al. **Parasitismo natural por helmintos gastrintestinais em búfalos criados em Presidente Médici, Rondônia, Brasil**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 66. Porto Velho, RO: EMBRAPA, 2010. Disponível em https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/46295/1/bpd66-bufalo-1.pdf Acesso em 14 de julho de 2024.

ENG, S.K.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N.S.A, *et al*. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Front Life Sciences: Home.** v.8, p.284–293.

FAMASUL. Boletim Casa Rural. Ed. nº 007/2020 | Novembro de 2020. Disponível em: https://portal.sistemafamasul.com.br/sites/default/files/boletimcasapdf/BOLETIM%20RADAR%20AMBIENTAL%20N%20007.pdf. Acesso em 10 de maio de 2024

FAMASUL 2021. Disponível: https://portal.sistemafamasul.com.br/artigos/um-olhar-socioecon%C3%B4mico-e-ambiental-ao-pantanal-de-ms. Acesso em 25 de outubro 2023.

FAYER, R., ANDREWS, C., UNGAR, B. L. & B., B. Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. **Journal of Parasitology**, v.75, p.393-397, 1989.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.260-266, 2007.

FERENS W.A. & HOVDE C.J. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.8, p.465-487, 2011.

FESSEHA, H.; MATHEWOS, M.; ALIYE, S., *et al*. Isolation and antibiogram of *Escherichia coli* O157: H7 from diarrhoeic calves in urban and peri-urban dairy farms of Hawassa town. **Veterinary Medicine and Science**. v.8, p.864-876, 2022.

FIROOZI, Z.; SAZMAND, A.; ZAHEDI, A., *et al*. Prevalence and genotyping identification of *Cryptosporidium* in adult ruminants in Central Iran **Parasites & Vectors**, v.12, p. 510, 2019.

FLORIÃO, M.M.; LOPES, B. DO; BERTO, B.P., *et al*. New approaches for morphological diagnosis of bovine *Eimeria* species: a study on a subtropical organic dairy farm in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. v.48, p.577-584, 2016.

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary** 470 **Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, p. 13–36, 2009.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 5°ed. New York: Wiley-Liss, 2005. Ch. 4, Laboratory Design and Layout. p 43-53.

GELETU, U. S.; USMAEL, M. A.; BARI, F. D. Rotavirus in Calves and Its Zoonotic Importance. **Veterinary medicine international**, v.2021, 6639701, 2021.

GESSNER, D.K.; RINGSEIS, R.; EDER, K. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. **Journal of Applied Microbiology**. v.101, p.605–628, 2017.

GONZALEZ, A.G., CERQUEIRA, A.M., GUTH, B.E.C., *et al*. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from healthy dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**. *v.*121, p.1130-1143, 2016.

GOMEZ, D. E., & WEESE, J. S. Viral enteritis in calves**. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, v.*58*, p.1267–1274, 2017.

GORDON, H. M.C.L. The diagnosis of helminthosis in sheep. **Reviews in Veterinary Medicine**, v. 2, p.140-168, 1967.

GREENING GE, WOLF S. 2010. **Contaminação ambiental Calicivirus**, p. 25–44.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; *et al.* Supplement 2003 - 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann -Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2010.

GUIZELINI, C.C.; TUTIJA, J.F.; MORAIS, D.R., *et al*. Outbreak investigation of septicemic salmonellosis in calves. **The Journal of Infection in Developing Countries**. v.14, p.104-108, 2020.

GÜNTHER H., OTTO P. Diarrhea in young calves. “Zackenvirus” (Jena agent 117/80) a new diarrhea pathogen in calves. **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin.** v.41, p.934–938, 1987.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES C.A., PRESCOTT J.F., 937 SONGER J.G., THOEN C.O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa: Wiley-938 Blackwell. p.231-265, 2010.

HADFIELD SJ, ROBINSON G, ELWIN K, *et al*. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology,** v.49, p.918-924,2011.

HAGHI, M.M.; KHORSHIDVAND, Z.; KHAZAEI, S. *et al. Cryptosporidium* animal species in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and Health.** v.48, p.97, 2020.

HAILU, M.; ASMARE, K.; GEBREMEDHIN, E.Z., *et al*. *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in dairy calves in southern Ethiopia. **Parasite Epidemiology and Control**. v.10, 2020.

HALL GA, BRIDGER JC, BROOKER BE, *et al*. Lesions of gnotobiotic calves experimentally infected with a calicivirus-like (Newbury) agente (Newbury). Veterinary **Pathology**, v.21, p.208-215, 1984.

HAO, L.; CHEN, C.; BAILEY, K., *et al*. Bovine kobuvirus-A comprehensive review. **Transboundary and Emerging Diseases**. v.68, p.1886–1894, 2020.

HASHISH, E.A.; EL DAMATY, H.M.; TARTOR Y.H., *et al*. Epidemiological study of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in newborn calves. **Pakistan Veterinary Journal**. v.36, p.54–58, 2016.

HENRIKSEN PERSSON, S.; JACOBSEN, T.; OLSEN, J. E., *et al*. A new real-time PCR method for the identification of *Salmonella* Dublin. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p. 615–621, 2012.

HEMASHENPAGAM, N.; KIRUTHIGA, B.; SELVARAJ, T., *et al*. Isolation, identification, and characterization of bacterial pathogens causing calf diarrhea with special reference to *Escherichia coli*. **International Journal of Microbiology.** v.7, p.1–4, 2009.

HERNANDES R.T.; ELIAS W.P.; VIEIRA M.A., et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters***.* v.297, p.137–149, 2009.

HILLE, K.; RUDDAT, I.; SCHMID, A., *et al*. Cefotaxime-resistant *E. coli* in dairy and beef cattle farms-joint analyses of two cross-sectional investigations in Germany. **Preventive Veterinary Medicine**. v.2, p.142- 145, 2017.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. Microbiologia Veterinária. 1ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.

HOLSCHBACH, C.L.; PEEK, S.F. *Salmonella* in dairy cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.34, p.133–154, 2018.

HOMEM, C. G., NAKAMURA, A. A., SILVA, D. C. *et al*. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of Cryptosporidium parvum in calf fecal samples. **Parasitology Research**, v.110, p.1741-1745, 2012.

HOSSAIN, M.K.; RAHMAN, M.; NAHAR, A., *et al*. Isolation and identification of diarrheagenic *Escherichia coli* causing colibacillosis in calf in selective areas of Bangladesh. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine***.* v**.**11, p.145–149, 2014.

HOUSE, J.K.; SMITH, G.W.; MCGUIRK, S.M., *et al*. Manifestations and management of disease in neonatal ruminants. In: Smith BP, Van Metre D, Pusterla N, editors. **Large Animal Internal Medicine***,* 6th edition. St. Louis (Missouri, USA): Elsevier; (2020). p. 335–81.

HUIJBERS, P.M.; BLAAK, H.; DE JONG, M.C., *et al*. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. **Environmental Science & Technology.** v.49, 2015.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, v. 88, 481 p. 450-465, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal. 2018. Disponível em: https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/18/0 < Acesso em 10 de março de 2020>.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Pesquisa da Pecuária Municipal: tabela 3939: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. 2022. Disponível em: https://sidra.ibge. gov.br/tabela/3939. Acesso em: 29 de abril de 2024.

ISEGAWA, Y., NAKAGOMI, O., NAKAGOMI, T., *et al*. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes,** v.7, p. 277– 284, 1993.

JOLEY, W. R; BARDSLEY, K. D. Ruminant coccidiosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** v.22, p.613-621, 2006.

JOR, E.; MYRMEL, M.; JONASSEN, C.M. SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. **Journal of Virological Methods**. v.169, p.1–7, 2010.

JUNG, K., SCHEUER, K.A., ZHANG Z., *et al*. Pathogenesis of GIII.2 bovine norovirus, CV186-OH/00/US strain in gnotobiotic calves. **Veterinary Microbiology.** v.168, p. 202–207, 2014.

KAPLON, J.; GUENAU, E.; ASDRUBAL, P.; *et al*. Possible novel nebovirus genotype in cattle, France. **Emerging Infectious Diseases**. *v.*17, p.1120–1123, 2011.

KEETON, S.T.N.; NAVARRE, C.B. Coccidiosis in large and small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.34, p. 201-208, 2018.

KIPKORIR, K.C.; ANG'IENDA, P.O.; ONYANGO, D.M. *et al.* Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* from Humans and Black Rhinoceroses in Kenya. **EcoHealth Alliance**. v.17, p.41–51, 2020.

LAMMERS, G.A.; JORDAN, D.; MC, C.C., *et al*. Daily shedding dynamics of *E. coli* O157 in an Australian grass-fed beef herd. **Epidemiology & Infection**. v.144:2948–55.

LATHROP, S. L.; WITTUM, T. E.; BROCK, K. V., *et al.* Association between infection of the respiratory tract attributable to bovine coronavirus and health and growth performance of cattle in feedlots. **American Journal of Veterinary Research.** v.61, p.1062–1066, 2000.

LEVINE, N.; IVENS, V. The sporulated oocysts of *Eimeria* illinoisensis n. sp. and of other species of *Eimeria* of the Ox. **Journal of Protozoology Research**. v.14, p.360-363, 1967.

LIBERTMANN, H. Infecções por pestivírus: diarreia viral/ doença das mucosas dos bovinos. In: BEER, J. **Doença infecciosa em animais domésticos**. 2ª ed., São Paulo: Roca, 1998. 457p.

LI, N.; WANG, R.; CAI, M., *et al*. Outbreak of cryptosporidiosis due to Cryptosporidium parvum subtype IIdA19G1 in neonatal calves on a dairy farm in China. **International Journal for Parasitology.** v.*49*, p.569–577, 2019.

CHENGYUAN, J.; ZHANG, Y.; SUN, R., *et al*. . Isolation and Identification of Two Clinical Strains of the Novel Genotype *Enterovirus E5* in China. **Microbiology Spectrum**, v.157, p.2369–2375, 2012.

LOMBARDELLI, J. A.; TOMAZIC, M. L.; SCHNITTGER, L., *et al.* Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in dairy calves and GP60 subtyping of diarrheic calves in central Argentina. **Parasitology Research**. v.118, p. 2079–2086, 2019.

LORENZETTI, L.; LEME, R. A.; RIBEIRO, J. Neonatal diarrhea by bovine coronavirus (BCoV) in beef cattle herds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 3795-3800, 2013.

MAGIORAKOS, A.-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection***.* v,18, p.268–281, 2012.

MAINIL J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 152, p.2-12, 2013.

MAINIL, J.G., FAIRBROTHER, J.M. Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. In: Morabito S., editor. *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology.* Horizon Scientific Press and Caister Academic Press; Norwich, UK: 2014. pp 19–43.

MARTI, E.; VARIATZA, E.; BALCAZAR, J.L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**. v.22, p.36-41, 2014.

MATTISON K, SHUKLA A, COOK A, *et al.* Human noroviruses in swine and cattle. **Emerging and Infection Disease**, v.13, p.1184–1188, 2007.

MATSUNAGA, T.; CHIKUNI, K.; TANABE R., *et al.* A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Science.** v.51, p.43-148,1999.

MEGANCK, V.; HOFLACK, G.; PIEPERS, S., *et al*. Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v.118, p.64–70, 2015;

MELTON-CELSA A. Shiga toxin (Stx) classification, structure, andfunction. **Microbiology Spectrum**. v. 2, p.1–21, 2014.

MELTON-CELSA, A.; MOHAWK, K.; TEEL, L., *et al*. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 357, p. 67-103, 2012.

MERLE, R.; HAJEK, P.; KÄSBOHRER, A., *et al*. Monitoring of antibiotic consumption in livestock: A German feasibility study. **Preventive Veterinary Medicine**, 104, 34–43, 2012.

MILLER, J.M., AND J.W. WRIGHT. Spot indole test: evaluation of four reagents. **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, p.589-592, 1982

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico | Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente | Ministério da Saúde. Volume 55 | N.º 2 | 17 jan. 2024. > disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-deconteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidem-vol-55-n-2.

MUNNS, K.D.; ZAHEER, R.; XU, Y., *et al*. Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from super-shedder and low-shedder cattle. **PLoS One**. v.11, 2016.

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

NG Q., HE F., KWANG J. Progresso recente em direção a Novel EV71 Anti-Therapeutics and Vaccines. **Vírus**.; v.7, p. 6441-6457, 2015.

NGUYEN, V. D.; BENNETT, S.D.; MUNGAI, E., et al. Increase in multistate foodborne disease outbreaks—United States, 1973–2010. **Foodborne Pathogens.** *v.*12, p. 867–872, 2015.

NIELSEN L.R. ***Salmonella* Dublin in dairy cattle: use of diagnostic tests for investigation of risk factors and infection dynamics. 2003**. PHD thesis, Department of Animal Science and Animal Health, Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. 219p.

NIELSEN, L. R. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.162, p.1-9, 2013.

NUNES, A. P. Quantas espécies de aves ocorrem no Pantanal brasileiro? **Atualidades Ornitológicas**, v. 160, p. 45-54. 2011.

ODENIRAN, P.O.; ADEMOLA, I.O. Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in different hosts in Nigeria: A meta-analysis. **Parasitology International**. v.71, p.194-206, 2019.

PRICE R. O'Neill report on antimicrobial resistance: funding for antimicrobial specialists should be improved. **European Journal of Hospital Pharmacy: Science and Practice**. v.*23*, p.245–247, 2016.

PROCOP, G.W., CHURCH, D.L., HALL, G.S., *et al*. **Microbiological Diagnosis: Text and Color Atlas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. *et al*. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1ª ed. Porto Alegre: editora Artmed, 2005, 512p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C., *et al.* **Veterinary Medicine – a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses**. 10. ed. Edinburgh: Saunders. 2007. p.127-160; 896-920.

REUTER G, BOLDIZSÁR A, PANKOVICS P. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae. **Archives of Virology** v. 154, p.101-108, 2009.

RIBEIRO, J.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A.F., *et al.* Kobuvirus (*Aichivirus B*) infection in Brazilian cattle herds. **Veterinary Research Communications**. v.38, p.177–182, 2014.

RIDPATH, J.F.; BOLIN, S.R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**. v.12, p.101-106, 1998.

RIGHI C.; CURINI V.; TORRES C., *et al*., Molecular Detection and Genetic Characterization of Bovine Kobuvirus (BKV) in Diarrhoeic Calves in a Central Italy Herd, **Transboundary and Emerging Diseases.** v.74, 7 pages, 2023.

RILEY, J. M.; PEEL, D. S.; RAPER, K. C. *et al.* Invited Review: Economic consequences of beef cow-calf disease mismanagement: Bovine viral diarrhea virus. **Applied Animal Science**. v. 35, p. 606-614, 2019.

ROBINS-BROWNE, R.M.; BORDUN, A.M.; TAUSCHEK, M., et al. *Escherichia coli* and community acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging Infectious Diseases Journal** . v.10, p.1797-805, 2004.

SÁNCHEZ-SAN, C.; LÓPEZ, T.; ARIAS C.F. Characterization of rotavirus cell entry. **Journal Virology**. v. 78, p. 2310–2318, 2004.

SAPOUNTZIS P.; SEGURA A.; DESVAUX M., *et al*. An Overview of the Elusive Passenger in the Gastrointestinal Tract of Cattle: The Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. **Microorganisms***. v.*8, p.877, 2020.

SCHEUTZ, F. Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Microbiology. Spectrum***. v.*2, p.1–15, 2014.

SHAHRANI, M.; DEHKORDI, F.S.; MOMTAZ, H. Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. **Biological Research.** v. 47, 2014.

SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology***.* v.43, p.957–970,2013.

SMITH, D. B.; MEYERS, G.; BUKH, J., *et al*. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. **The Journal of General Virology**. v. 98, p. 2106-2112, 2017.

SOUZA, C. B. M. **A Bovinocultura de Corte do Estado de Mato Grosso do Sul: Evolução e Competitividade**. 2010. 194 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico). Instituto de Economia, Universidade Estadual de Campinas, Campina, 2010.

SOUZA, M.L.; COELHO, M.L.; DA SILVA, A.O., *et al*. *Salmonella* spp. infection in psittacidae at a wildlife rehabilitation center in the state of Mato Grosso Do Sul, Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**. v.56, p.288-293, 2020.

STIPP, D. T.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. **Tropical Animal Health e Produção,** v. 41, p.1563-1567, 2009.

SYDOW, A. C. M. D.G. V. **Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de** *Escherichia coli* **em fezes de cães errantes**. 2005. 89 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SWIATEK, D. L., PALOMBO, E. A., LEE A., *et al*. Characterisation of G8 human rotaviruses in Australian children with gastroenteritis. **Virus Research**, v.148, p.1–7 2010.

TAKIUCHI, E.; STIPP, D.T.; ALFIERI, A.F. *et al*. 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, p. 148–154,2006.

TAYLOR, M.A; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia veterinária**. 3ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Kooagan. 768p, 2010.

TEIXEIRA, W.F.P.; COELHO, W.M.D.; SOUTELLO, R.V.G., *et al*. Diagnóstico de criptosporidiose em amostras fecais de bezerros por imunofluorescência direta e microscopia de contraste de fase. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1057-1062, 2011

THIRY, D.; SAULMONT, M.; TAKAKI, S., *et al*. Enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 in young calves with diarrhea, Belgium. **Emerging Infectious Diseases***.* v.23, 2017.

TIRANTI, K.; LARRIESTRA, A.; VISSIO, C., *et al.* Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária***.* v.20, p.65–72, 2011.

TURAN, T., IŞIDAN, H., ATASOY, M. O., *et al*. Detection and Molecular Analysis of Bovine Enteric Norovirus and Nebovirus in Turkey. **Journal of Veterinary Research**, v.62, p.129–135, 2018.

TURINI, L.; MANTINO, A.; TOZZI, B., *et al*. Effect of a Phytogenic Feed Additive in Preventing Calves' Diarrhea. **Frontiers in Veterinary Science,** v.11, 2022.

TUTIJA, J.F.; FREITAS, M.G.; MARTINEZ, E.V., *et al*. High frequency of multidrug-resistant *Escherichia coli* from cattle in the Cerrado and Pantanal biomes of Brazil, **Microbial Pathogenesis**. v.192, 2024.

TUTIJA, J.F.; RAMOS, C.A.; LEMOS, R.A; *et al*. Molecular and phenotypic characterization of Escherichia coli from calves in an important meat-producing region in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries***.* v.16, p.1030-1036, 2022.

TZIPORI, S.; SMITH, M.; HALPIN, C., *et al.* Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. **Veterinary Record.** v.112, p. 116-120, 1983.

UDAONDO, Z.; HUERTAS, M. J. Fighting the enemy: one health approach against microbial resistance. **Microbial biotechnology.** v.*13*, p.888–891, 2020.

Unicef. 1 em cada 3 pessoas no mundo não tem acesso a água potável, dizem o Unicef e a OMS. 2019. Disponível em: https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/1-em-cada-3-pessoas-no-mundo-nao-tem-acesso-agua-potavel-dizem-unicef-oms#:~:text=Cerca%20de%202%2C2%20bilh%C3%B5es,para%20a%20higieniza%C3%A7%C3%A3o%20das%20m%C3%A3os. Acesso em 05 de junho de 2024.

VASCONCELOS, A. B.; ANDRADE, V.; MORAES, A. C. I. *et al.* Occurrence and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* spp. in calves from the Mesoregion Sertão of Alagoas, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, p. 36-40, 2021.

ZHANG, X.X.; ZHANG, N.Z.; ZHAO, G.H., *et al*. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* infection in pet parrots in North China. **BioMed Research International**. v. 6, 2015.

ZHU, D.; AN, X.L.; CHEN, Q.L., *et al*. Antibiotics disturb the microbiome and increase the incidence of resistance genes in the gut of a common soil collembolan. **Environmental Science & Technology**. v.52, p. 3081-3090, 2018.

ZHU L, XING Z, GAI X, *et al*. Identification of a novel enterovirus E isolates HY12 from cattle with severe respiratory and enteric diseases. **PLoS One**, v9, 2014.

WOODE, G.N.; BRIDGER, J.C. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. **Journal of Medical Microbiology**. v.11, p.441–452, 1978.

WALKER, P. G. et al. A reliable, practical, and economical protocol for inducing diarrhea and severe dehydration in the neonatal calf. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 62, p. 205, 1998.

WORKMAN, A.M.; KUEHN, L.A.; MCDONALD, T.G., *et al*. Evaluation of the effect of serum antibody abundance against bovine coronavirus on bovine coronavirus shedding and risk of respiratory tract disease in beef calves from birth through the first five weeks in a feedlot. **American Journal of Veterinary Research**. v.78, p.1065–1076, 2017.

World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. *World Health Organization*.

ANEXO 1 – High frequency of multidrug-resistant *Escherichia coli* from cattle in the Cerrado and Pantanal biomes of Brazil

ELSEVIER

Microbial Pathogenesis

Volume 192, July 2024, 106704

High frequency of multidrug-resistant *Escherichia coli* from cattle in the Cerrado and Pantanal biomes of Brazil

J.F. Tutija, M.G. Freitas, E.V. Martinez, J.F.G. Silva, M.B.M. Araripe, C.R.B. Leal, A.F. Souza Filho, C.A.N. Ramos

ANEXO 2 – Caracterização morfológica de espécies de *Eimeria* em bovinos de corte no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil

Artigo submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira e normatizado segundo suas regras.

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA
Brazilian Journal of Veterinary Research

Caracterização morfológica de espécies de Eimeria em bovinos de corte no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil1

Journal:	*Pesquisa Veterinária Brasileira*
Manuscript ID	PVB-7529
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	27-May-2024
Complete List of Authors:	Tutija, Juliane ; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, FAMEZ Borges, Dyego G.L.; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul de Freitas, Mariana; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Reckziegel, Guilherme ; Universidade Federal do Acre Santos, Maria Luiza; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul de Almeida Borges, Fernando; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Zootecnia de Souza Filho, Antônio; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Ramos, Carlos Alberto; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Area:	Livestock Diseases
Keyword:	eimeriosis, cattle, diagnosis, diarrhea, coccidiosis

ABSTRACT… 2024. **Caracterização morfológica de espécies de *Eimeria* em bovinos de corte no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**. *Pesquisa Veterinária Brasileira 41:00, 2021*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Av. Sen. Filinto Müler, 2443 - Pioneiros, Campo Grande 79070-900 MS, Brasil E-mail: juliane_tutija@hotmail.com

Eimeriosis, also called coccidiosis, is a disease caused by *Eimeria* spp., intracellular protozoan parasites of the intestinal epithelium of ruminants. The objective of the present study was to evaluate the species of *Eimeria* spp. and identify their possible associations with diarrhea in calves raised in different regions of Mato Grosso do Sul. 310 samples were collected from animals with and without diarrhea, from 18 beef cattle properties, distributed among different regions of the state. Only four properties observed were OOPG positive for *Eimeria* spp., which generated six pools, where new species of *Eimeria* were identified. Identification through oocyst sporulation is extremely important for the adoption of clinical management, as the treatment of animals must be based on the pathogenicity of the agent. Calves aged 30 to 60 days were more likely to be infected. *E. zuernii* infection is more common in symptomatic animals and *E. ellipsoidalis* in asymptomatic animals. Therefore, the diagnosis and identification of species are of great importance to institute adequate treatment of animals.

INDEX TERMS: eimeriosis, cattle, diagnosis, diarrhea, coccidiosis.

RESUMO.- [**Caracterização morfológica de espécies de *Eimeria* em bovinos de corte no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.**] A eimeriose, também denominada coccidiose, é uma doença causada por *Eimeria* spp., protozoários parasitas intracelulares do epitélio intestinal de ruminantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar as espécies de *Eimeria* spp. e identificar suas possíveis associações com quadros de diarreia em bezerros criados em diferentes regiões de Mato Grosso do Sul. Foram coletadas 310 amostras de animais com e sem diarreia, provenientes de 18 propriedades de gado de corte, distribuídas entre diferentes regiões do estado. Apenas em quatro propriedades observou-se OOPG positivo para *Eimeria* spp., que geraram seis pools, onde nove espécies de *Eimeria* foram identificadas. A identificação por meio da esporulação de oocistos é de suma importância para a adoção de uma conduta clínica, visto que o tratamento dos animais deve ser baseado na patogenicidade do agente. Bezerros de 30 a 60 dias tinham maior chance de serem infectados. Sendo a infecção por *E. zuernii* a mais comum em animais sintomáticos e *E. ellipsoidalis* em assintomáticos. Portanto, o diagnóstico e identificação das espécies são de grande importância para instituir o tratamento adequado dos animais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: eimeriose, bovinos, diagnóstico, diarreia, coccidiose.

INTRODUCTION

A eimeriose bovina é uma doença causada por protozoários do gênero *Eimeria* spp. que afeta principalmente bezerros com menos de um ano de idade, causando distúrbios gastrointestinais e, em alguns casos, a morte (Sánchez et al. 2013; Bangoura & Bardsley 2020). Pode envolver grandes perdas financeiras devido à diminuição do apetite, perda de peso, redução nas taxas de conversão alimentar, diarreia, anemia e aumento de suscetibilidade a outras doenças (Daugschies & Najdrowski 2005).

Existem 14 espécies neste gênero, descritas com a capacidade de infectar bovinos em todo o mundo: *Eimeria alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. brasiliensis*, *E. bukidnonensis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. illinoisensis*, *E. pellita*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis*, *E. zuernii* (Levine e Ivens 1967) e *E. ildefonsoi* (Florião et al. 2016). Geralmente, as espécies mais difundidas são *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. elipsoidalis* e *E. auburnensis* (Das et al. 2015; Dong et al. 2012).

A infecção de bezerros pode ocorrer nas primeiras horas de vida, porém, o aparecimento de oocistos *de Eimeria* spp. nas fezes depende do período pré-patente de cada espécie (Díaz De Ramirez et al. 2001). *E. bovis* e *E. zuernii* são as mais patogênicas, e os bovinos apresentam pico de eliminação de oocistos dessas espécies entre 20 e 40 dias de idade (Díaz De Ramirez et al. 2001; Sánchez et al. 2008). Os animais podem apresentar coinfecções por duas ou mais espécies, mas nem sempre apresentam sinais clínicos (Cardim et al. 2018).

O diagnóstico da infecção é realizado principalmente por meio de métodos coproparasitológicos para detecção de oocistos. Entretanto, a identificação das espécies é realizada observando-se características morfométricas específicas dos oocistos esporulados, como largura e comprimento, presença ou ausência de micrópila (Berto et al. 2014).

A morfometria das espécies de *Eimeria* spp. é uma importante ferramenta epidemiológica, pois, permite a identificação da distribuição espacial das espécies, a identificação de áreas sob risco de desenvolvimento de surtos de diarreia, e por consequência, a implementação de medidas preventivas. Em Mato Grosso do Sul, apesar da grande importância que a bovinocultura possui para o estado, poucas informações sobre a distribuição das espécies de *Eimeria* spp. estão disponíveis (Rodrigues 2014). Dessa forma, objetivou-se no presente estudo avaliar as espécies de *Eimeria* spp. e identificar suas possíveis associações com quadros de diarreia em bezerros criados em diferentes regiões de Mato Grosso do Sul.

MATERIALS AND METHODS

Study local and contextualization. Foram coletadas entre 2020 e 2022, 310 amostras de fezes provenientes de bezerros entre um e 60 dias de vida (divididos em duas categorias, um a 30 dias, 31 a 60 dias). Os animais eram da raça nelore e provenientes de cruzamento entre nelore e Angus. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS sob o número 1.002/2018.

Samples collection. As fezes foram coletadas em sacos plásticos diretamente da ampola retal dos animais e mantidas refrigeradas (4 °C), por até 48 horas. Em seguida, foram encaminhadas ao Laboratório Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), onde foram submetidas a contagem de oocistos por grama de fezes (OOPG), utilizando a técnica de McMaster modificada (Gordon & Whitlock 1939), com sensibilidade de 1:25.

Adicionalmente, as fezes foram analisadas segundo Walker et al. (1998), quanto ao aspecto visual macroscópico, à presença de estrias de sangue e classificadas em diarreicas ou não diarreicas.

Processamento de amostras e identificação de espécies de *Eimeria*. Amostras positivas para *Eimeria* spp. na técnica de OOPG foram agrupadas em pools de amostras diarreicas e não diarreicas por propriedade, em seguida submetidas a esporulação (Cruvinel et al. 2018). Aproximadamente 100 oocistos por pool (de cada categoria animal, com e sem diarreia) foram identificados em microscópio óptico. A diferenciação entre as espécies foi feita de acordo com as características fenotípicas dos oocistos, como cor, presença ou ausência de micrópila e comprimento e largura (Daugschies & Najdrowski 2005; Taylor et al. 2010).

Statistical analysis. As associações entre infecções por *Eimeria* spp. ocorrência de diarreia, idade e raça foram avaliadas com o auxílio dos testes de Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism®, versão 5.01.

A análise das frequências de espécies de *Eimeria* spp. foi realizada por meio de estatística descritiva.

RESULTS

Dentre as 310 amostras obtidas, 120 eram de animais não diarreicos (38,70%), e 190 de animais com fezes desde pastosas a líquidas com ou sem a presença de sangue (61,29%), essas amostras foram provenientes de 18 propriedades de gado de corte, distribuídas entre os biomas cerrado e pantanal do Mato Grosso do Sul.

Das 18 propriedades amostradas, apenas em quatro observou-se OOPG positivo para *Eimeria* spp., os valores variaram de 25 à 32900. As quatro propriedades geraram seis pools, isso porque em duas delas, apenas animais com diarreia apresentaram resultados positivos, gerando apenas um pool. As propriedades com resultados positivos para *Eimeria* spp. estão destacadas no mapa da figura 1.

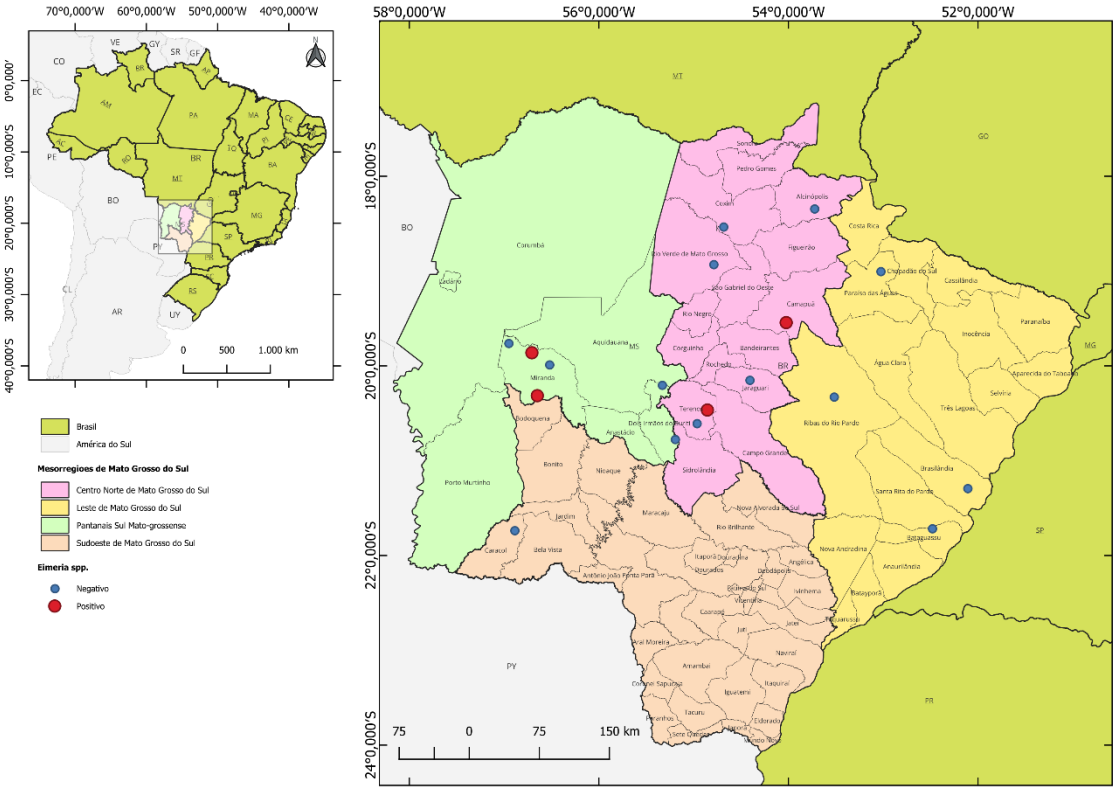

Fig.1. Distribuição das 18 propriedades amostradas no presente estudo (círculos). Marcadas com círculo em vermelho estão as propriedades com resultados positivos para *Eimeria* spp. Marcadas com círculos em azul estão as propriedades nas quais não se encontrou *Eimeria* spp.

Todas as propriedades em que se observou casos positivos para *Eimeria* spp. realizavam o sistema de criação com cria e recria, ou cria, recria e engorda de bovinos. Nas propriedades em que não se observou amostras positivas, algumas realizam apenas o sistema de cria, ou seja, os bezerros nasciam e eram mantidos no mesmo local.

Após a esporulação e classificação, os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados da classificação de *Eimeria* spp. em amostras de fezes de bezerros com e sem diarreia em Mato Grosso do Sul, Brasil.

	Propriedades					
Espécies	Propriedade 1 com diarreia	Propriedade 1 sem diarreia	Propriedade 2 Com diarreia	Propriedade 3 com diarreia	Propriedade 4 com diarreia	Propriedade 4 sem diarreia
E. alabamensis	0%	3%	0%	0%	0%	0%
E. auburnensis	0%	0%	3%	0%	0%	0%
E. bovis	0%	26%	0%	27%	0%	8%
E. brasiliensis	1%	0%	0%	0%	0%	0%
E. canadensis	9%	20%	0%	0%	0%	0%
E. cylindrica	0%	0%	0%	1%	0%	0%
E. elipsoidalis	4%	0%	34%	0%	0%	84%
E. pellita	1%	46%	0%	0%	0%	0%
E. zuernii	84%	5%	63%	72%	100%	8%

A avaliação micrométrica de alguns oocistos identificados estão demonstrados na figura 2-5.

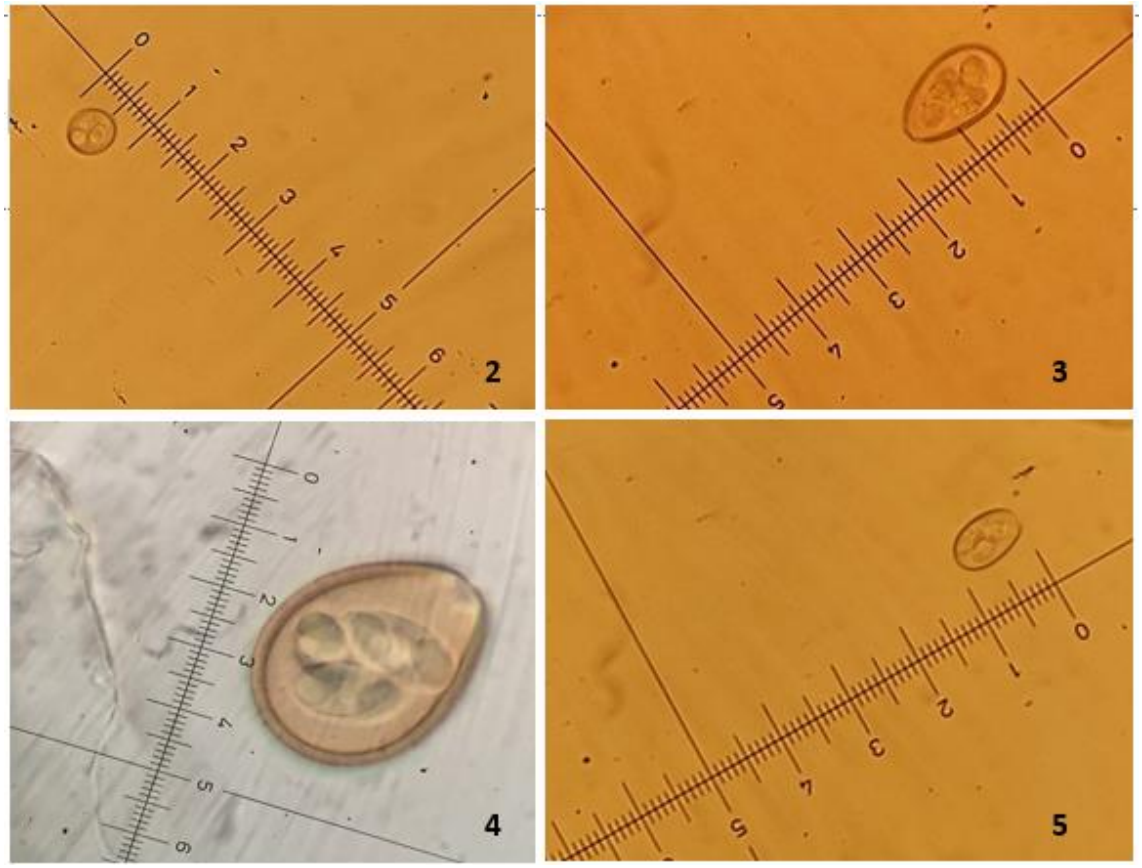

Fig.2-5. Avaliação micrométrica de oocistos esporulados de *E. zuerni (2), E. auburnensis (3), E. pellita (4) e E. elipsoidalis (5)* em amostras fecais de bezerros em Mato Grosso do Sul, Brasil. Obj 40x.

Nove espécies de *Eimeria* foram identificadas entre os seis pools de fezes. A espécie mais prevalente foi *E. zuernii*, estando presente em todas as propriedades e em maior frequência nas amostras oriundas de animais com diarreia. Infecções mistas envolvendo duas a três espécies foram observadas em 83,33% das amostras positivas. Nas amostras originadas de bovinos sem diarreia, a principal espécie identificada foi *E. ellipsoidalis.*

Após análise estatística pelo método do Qui-quadrado, observou-se que os animais com mais de 30 dias de idade apresentavam uma frequência geral de oocistos significativamente maior do que os animais mais jovens (p = 0,0001). Já em relação à raça, os cruzados (Nelore X Angus) apresentaram frequência geral de oocistos significativamente maior que os animais da raça Nelore (0,0004). Não houve associação significativa entre a frequência geral de oocistos e a ocorrência de diarreia.

DISCUSSION

Os valores das OOPG variaram de 25 a 32.900, com a infecção nos animais sob forma clínica e subclínica. A forma subclínica, com presença de oocistos nas fezes e ausência de sinais clínicos é a forma de infecção mais frequente em animais adultos que são considerados portadores assintomáticos e contaminam o ambiente com a liberação de oocistos (Joley & Bardsley 2006), porém, animais jovens geralmente apresentam sintomatologia e são infectados pelos adultos assintomáticos. O grupo de animais com diarreia foram os que apresentaram maior número de oocisto, com uma média de 4.334 oocistos. Já no grupo de animais sem diarreia a média foi de 25 oocistos. Considera-se que a eimeriose clínica existe quando os bezerros apresentam mais de 4.000

de OOPG e sinais de diarreia (Keeton e Navarre 2018), portanto o que observamos no presente trabalho.

Após a esporulação observou-se que *E. zuernii* foi a espécie mais prevalente, estando presente em todas as amostras (pools) com ou sem diarreia, seguida por *E. elipsoidalis* presente em três dos seis pools (50%) com uma carga parasitária dessa espécie que variou de 4 a 84% e *E. bovis* presente em três dos seis pools (50%) com a carga parasitária de 8 a 27%. Infecções mistas causadas por duas a três espécies foram encontradas em 100% das propriedades, porém em uma das propriedades, no pool de amostras com diarreia só foi identificada *E. zuernii*, e o número de espécies *de Eimeria* spp. por amostra examinada em infecções mistas variou de três a cinco. Os bezerros geralmente são coinfectados com duas ou mais espécies, mas nem sempre apresentam sinais clínicos (Cardim et al. 2018), isso vai depender de quais espécies esses animais albergam, se são patogênicas ou não.

Com relação à idade, os animais com mais de 30 dias apresentaram uma frequência significativamente maior de infecção. Esses resultados corroboram os resultados de Saravia et al. (2021) que avaliaram três grupos de animais, Grupo 1 (1 a 20 dias de idade), Grupo 2 (21 a 40 dias de idade) e Grupo 3 (41 a 65 dias de idade) e observaram que o pico de excreção de oocistos ocorre entre os dias 21 e 40, sugerindo que este é o período crítico para a ocorrência de eimeriose na criação de bezerros.

Em um estudo realizado por Cruviel et al. (2018) foram identificadas nove espécies de *Eimeria* nos bezerros em ordem decrescente: *E. brasiliensis, E. wyomingensis, E. bovis, E. canadenses, E. zuernii, E. auburnensis, E. ellipsoidalis, E. pellita* e *E. cylindrica,* em animais entre quatro e 10 meses de idade. Essas mesmas espécies foram encontradas no presente estudo, com exceção de *E. wyomingensis*, porém as espécies mais frequentes foram, *E. zuernii, E. bovis* e *E. elipsoidalis.* Nosso estudo foi realizado em animais com até 60 dias de idade, o que pode explicar essa diferença, uma vez que essa são as espécies mais prevalentes em animais mais jovens (Chandra et al. 2022).

E. bovis e *E. zuernii* são consideradas as espécies patogênicas mais prevalentes entre todas as espécies de *Eimeria* atualmente (Alemayehu et al. 2013; Dong et al. 2012). *E. zuernii* foi encontrada em todas as propriedades, em animais com e sem diarreia, porém o maior percentual foi em animais com diarreia. Isso pode estar associado a carga parasitária, pois animais assintomáticos podem ter o parasita, porém em quantidade insuficiente para causar diarreia. Cruviel et al., 2018 relatou surtos por *E. zuernii* em bezerros entre 30 a 55 dias de idade, afirmando que certamente a diarreia nos bezerros tenha ocorrido pelo elevado grau de infecção destes animais, além de outras causas, como vírus enteropatogênicos e bactérias, que poderiam ter ocorrido de forma associada.

Muitos trabalhos relatam a maior prevalência de *E. bovis*, porém não foi o que observamos no presente estudo. Tomczuk et al. (2015) na Polônia, reportaram que a espécie mais frequente em bezerros até três ou quatro meses de idade foi *E. zuernii,* enquanto que *E. bovis*, foi observada em bovinos em faixa etária superior. Portanto o maior número de oocistos de *E. zuernii* identificados no presente estudo podem estar relacionados a idade dos animais (até 60 dias de idade).

Rodrigues, 2014 no estado de Mato Grosso do Sul, encontraram maior positividade para *E. bovis*, porém na forma subclínica. Também foram encontradas uma grande variedade de espécies, cerca de onze. Os animais mais jovens tinham de 7 a 24 meses de idade. Nosso estudo também encontrou essa espécie em grande quantidade em animais assintomáticos, porém não foi a espécie mais prevalente. Uma justificativa seria pelo fato da idade dos animais ser superior à relatada no presente estudo, onde os animais apresentam até dois meses de idade.

E. ellipsoidalis, foi a espécie mais prevalente em animais sem diarreia, não sendo encontrada em animais sintomáticos, assim como em um estudo realizado por Santos et al. (2022) que encontraram positividade em 14,54% das amostras. Sabe-se que não há relação entre a presença desta espécie e o desenvolvimento de sinais clínicos graves de eimeriose em animais infectados, isso ocorre, pois, essa espécie está associada à forma subclínica da doença, devido a sua baixa patogenicidade (Bangoura & Bardsley 2020).

A identificação através da esporulação de oocistos é de suma importância para a adoção de uma conduta clínica, visto que o tratamento dos animais deve ser baseado na patogenicidade do agente, além dessa identificação ser relevante para pesquisa de outros agentes que possam estar envolvidos na diarreia. Considerando ainda que algumas propriedades fazem apenas cria e recria e vendem seus animais para outros locais, o monitoramento através da identificação das espécies

é de suma importância, podendo ser recomendado medidas preventivas como tratamentos profiláticos antes da movimentação dos animais.

CONCLUSION

Com base em análises estatísticas, identificou-se que bezerros de 30 a 60 dias tinham maior chance de serem infectados. Sendo a infecção por *E. zuernii* a mais comum em animais sintomáticos e *E. ellipsoidalis* em assintomáticos. Portanto, o diagnóstico e identificação das espécies são de grande importância para instituir o tratamento adequado dos animais.

Acknowledgments. Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código 001, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Desenvolvimento], códigos 401971/2023-6 Este estudo foi realizado com apoio da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)/Ministério da Educação.

Conflict of interest statement.- The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

Alemayehu A., Mohammed N., Timketa B. 2013. Prevalence of bovine coccidia in Kombolcha district of South Wollo, Ethiopia. J Vet Med Anim Health. 5(2):41–45 <https://doi.org/10.1155/2024/3145241>

Bangoura B, Daugschies A. Eimeria. In: Florin-Christensen M, Schnittger L, editors. 2018. *Parasitic protozoa of farm animals and pets* Heidelberg, Germany: Springer; p. 55-101. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_3>

Berto B.P., McIntosh D., Lopes C.W.G., 2014. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). Rev. Bras. Parasitol. Vet., 23 (1): 1-15 <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001>

Cardim, S. T., Seixas, M., Tabacow, V. B. D., Taroda, A., Carneiro, P. G., Martins, T. A., Barros, L. D. de ., Minutti, A. F., Chryssafidis, A. L., Vidotto, O., & Garcia, J. L.. 2018. Prevalence of *Eimeria* spp. in calves from dairy farms in northern Paraná state, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 27(1): 118–122 <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017072>

Chandra Deb. L., Ahmed S.S.U., Baidhya C.C, Deb Nath N., Ghosh S., Paul S. 2022. Prevalence of *Eimeria* spp. with associated risk factors in dairy calves in Sylhet, Bangladesh. Vet Med Sci. 8(3): 1250-1257 < doi:10.1002/vms3.776>

Cruvinel, L. B., Bastos, T. S. A., Nicaretta, J. E., Couto, L. F. M., Borges, D. G. L., Borges, F. A., Soares, V. E., & Lopes, W. D. Z. 2018. Surtos consecutivos ocasionados por *Eimeria zuernii* em bezerros de corte de uma propriedade do estado de São Paulo. Pesq.Vet. Bras. 38(2): 277–284. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5330>

Daugschies A, Najdrowski M. 2005. Eimeriosis in cattle: current understanding. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 52(10): 417-427. <doi:10.1111/j.1439-0450.2005.00894.x>

Dong, H., Zhao, Q., Han, H., Jiang, L., Zhu, S., Li, T., Kong, C., & Huang, B. 2012. Prevalence of coccidial infection in dairy cattle in Shanghai, China. J Parasitol. 98(5): 963-966. doi:10.1645/GE-2966.1

Das, M., Deka, D. K., Sarmah, P. C., Islam, S. & Sarma, S. 2015. Diversity of *Eimeria* spp. in dairy cattle of Guwahati, Assam, India. Vet World, 8, 941–945 < doi:10.14202/vetworld.2015.941-945>

Florião M.M., Lopes B. do, Berto B.P., Lopes C.W.G.. 2016. New approaches for morphological diagnosis of bovine *Eimeria* species: a study on a subtropical organic dairy farm in Brazil Trop. Anim. Health Prod. 48(3): 577-584 < doi:10.1007/s11250-016-0998-5>

Joley, W. R; Bardsley, K. D. 2006. Ruminant coccidiosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 22(3):613-621 <doi:10.1016/j.cvfa.2006.07.004>

Keeton S.T.N., Navarre C.B. 2018. Coccidiosis in large and small ruminants Vet Clin North Am Food Anim Pract. 34(1): 201-208 <doi:10.1016/j.cvfa.2017.10.009>

Levine N., Ivens V. 1967. The sporulated oocysts of *Eimeria* illinoisensis n. sp. and of other species of *Eimeria* of the Ox. J. Protozool. 14, 360-363 <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02008.x>

Rodrigues F, *Eimeria* SPP. 2014. Em ruminantes domésticos no estado do Mato Grosso do Sul. Disssertação. Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Campo Grande.

Sánchez R., Romero J., Rossanigo C.. Epidemiología y Control de Coccidios y *Criptosporidium*. H. Sur (Ed.), Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva En Rumiantes – Fundamentos Epidemiológicos Para Su Prevención y Control (2013), pp. 357-380. Buenos Aires, Argentina.

Santos K.K.F.D, Macedo L.O.. Conceição ÂID, Santos LAD, Mendonça CL, Alves LC, Ramos RAN, Carvalho GA. 2022. Diversity of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) species and risk factors associated in natural infecting calves at the Southern Agreste Microregion in the State of Pernambuco, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 31(2) <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022026>

Saravia A., Miraballes C., Riet-Correa F., Castro-Janer E. 2021. *Eimeria* spp. in dairy calves in Uruguay. Identification, dynamics of oocyst excretion and association with the age of calves. Vet Parasitol Reg Stud Reports. 25:100588. <doi:10.1016/j.vprsr.2021.100588>

Tomczuk K., Grzybek M., Szczepaniak K., Studzinska M., Demkowska-Kutrzepa M., Roczen-Karczmarz M. & Klockiewicz M. 2015. Analysis of intrinsic and extrinsic factors influencing the dynamics of bovine *Eimeria* spp. From central-eastern Poland. Vet. Parasitol. 214(1-2):22-28. <doi:10.1016/j.vetpar.2015.09.027>

Sánchez R.O., Romero J.R., Founroge R.D. 2008. Dynamics of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age. Vet. Parasitol., 151, (2-4): 133-138 < doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.003>

Taylor, M.A; Coop, R. L.; Wall, R. L. 2010. Parasitologia veterinária. p.768 3ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Kooagan.

ANEXO 3- Questionário epidemiológico

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- LABAC

Questionário Epidemiológico

Responsável pelo preenchimento: _____

Proprietário: _____

Cel._____email_____

Propriedade_____

Região:_____

- Propriedade:

Área total da propriedade (hectare; alquere):

Tipo de sistema de produção desenvolvido na propriedade ( ) cria ( ) recria ( ) engorda

Raças (Quais)? Faz cruzamento industrial? (Qual)?

_____

_____

_____

Qual o tipo de Pastagem? (predominante)_____

Qual sistema de pastejo utilizado? Quantidade e área média dos piquetes? Tempo de permanência em cada piquete?

_____

_____

Fonte de fornecimento de água?

( ) Poço Artesiano ( )Corrego ( )Nascente dentro da fazenda ( )Nascente fora da fazenda.

Forma de Fornecimento de água?
( ) Pilhetas ( ) Direto da Fonte.

Faz limpeza das pilhetas? Com que frequência?_____

Já enviaram amostras para diagnóstico laboratorial?
( )Sim ( )Não. Quais ? Quando?
_____
_____
_____
_____

Ingesta de colostro é acompanhada? ( ) Sim ( )Não. Usa banco de colostro ou equivalente? Se sim, Qual?
_____

- **BEZERROS:**

Qual origem dos animais? ( ) Compra (Fazenda e Leilão) ( ) Própria da fazenda

✔ Manejo dos bezerros:
Início dos nascimentos:_____
Qual Idade dos bezerros ao desmame:_____
É realizada cura do umbigo? Como é realizada?
_____
_____
É realizada aplicação de algum medicamento após nascimento? Qual?_____

_____

✔ Sanidade:

Sinais clínicos observados:

( ) Febre	( ) Mucosas Pálidas	( ) Hálito Urêmico	( ) Mialgia
( ) Diarreia	( ) Emagrecimento	( ) Apatia	( ) Icterícia
( ) Letargia	( ) Esplenomegalia	( ) Edema Submandibular	( ) Anorexia
( ) Outros	( ) Outros	( ) Outros	( ) Outros

Em que período teve início os casos?_____

Houve óbitos? Quantos?_____

Qual tempo transcorrido entre o aparecimento dos sinais clínicos e a morte dos animais?____

_____

✔ Diarreia:

Animais apresentam diarreia com quantos dias após o nascimento?_____

Qual aspecto das fezes? Qual coloração das fezes?

_____

_____

Foi realizado tratamento? Como ?_____

Qual critério de escolha do tratamento ?_____

Houve melhora após o tratamento?_____

Os animais são vacinados? Quais são elas e quando são realizadas?

VACINA	MARCA	PERÍODO
( ) Brucelose		3 a 8 meses ( )S ( )N

( ) Febre Aftosa		( )Planalto ( )Cerrado
( ) Raiva		
( ) Clostridiose		
( ) IBR		
( ) BVD		
( ) Leptospira		
( ) Colibacilose		
( ) Outros		

2165