

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PESQUISA DE ROTAVÍRUS E ENTEROBACTÉRIAS EM
EPISÓDIOS DE DIARREIA NEONATAL EM CAPRINOS E
OVINOS NO ESTADO DA PARAÍBA**

Domingos Fernandes Lugo Neto
Médico Veterinário

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PESQUISA DE ROTAVÍRUS E ENTEROBACTÉRIAS EM
EPISÓDIOS DE DIARREIA NEONATAL EM CAPRINOS E
OVINOS NO ESTADO DA PARAÍBA**

Domingos Fernandes Lugo Neto

Orientador: Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciência Agrária da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal do brejo paraibano.

2014

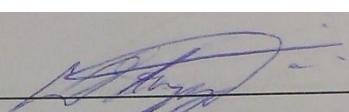
DOMINGOS FERNANDES LUGO NETO

**PESQUISA DE ROTAVÍRUS E ENTEROBACTÉRIAS EM
EPISÓDIOS DE DIARREIA NEONATAL EM CAPRINOS E
OVINOS NO ESTADO DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciência Agrária da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal do brejo paraibano.

APROVADA EM 20/03/2014

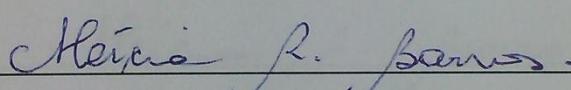
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp
DCV/CCA/UFPB
Orientador



Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
DZ/CCA/UFPB
Examinador



Profª. Drª. Mércia Rodrigues Barros
DMV/UFRPE
Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DOMINGOS FERNANDES LUGO NETO – Patos, 25 de janeiro de 1977, possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba (2002). Pós-graduação Lato Sensu (Especialização) em Gestão em Saúde pela Universidade Estadual da Paraíba (2013). Atualmente é médico veterinário da Prefeitura Municipal de Sapé, lotado na Secretaria de Agricultura. Médico Veterinário Autônomo e Responsável Técnico do Mundo Pet Santos Diniz. Vice-presidente da Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais do Estado da Paraíba (gestão 2012-2014). Presidente do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado da Paraíba (gestão 2013-2016).

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho em especial à Alecsonia Pereira Araújo, minha esposa, que ao longo desta jornada esteve de mãos dadas como a vivência das inúmeras dificuldades para cumprir os cronogramas.

As pessoas de significativo auxílio a este trabalho: o meu orientador Danilo Tancler Stipp, Mércia Rodrigues Barros e Débora Rochelly Alves Ferreira que me impulsionaram na conclusão deste mestrado.

Aos colegas de estudo Rodrigo Guimarães, Max Bruno, Tércio, Vânia, Juliana, Samantha, Karla Malta e demais colegas que partilharam as inúmeras horas de sono perdidas para adquirir mais conhecimento nesta jornada.

A minha mãe Maria Gorete Xavier da Costa e ao meu pai Domingos Fernandes Lugo Filho, pela vida que me ofereceram e exemplo dado ao longo de minha existência.

Finalmente a duas pessoas de suma importância para continuar lutando a cada dia a Deus e a Lucas Pereira Lugo, meu filho.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO GERAL	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 CAPÍTULO 1.....	18
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS.....	44
APÊNDICES.....	52

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 Número médio de Caprinos e Ovinos, matrizes e animais jovens até 90 dias. Caprinos/Ovinos.....	36
Tabela 2 Número de óbitos por propriedade e método de controle parasitário.....	36
Tabela 3 Caracterização das propriedades quanto se recebe incentivo do governo, padrão zootécnico no rebanho, orientação veterinária e satisfação com a criação.....	36

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figure 01 Gel electroforese de amostra de <i>E. coli</i> de fezes diarréicas de caprinos para detecção do gen TspE4C2.1, nas 15 amostras positivas para este gen.....	37

PESQUISA DE ROTAVÍRUS E ENTEROBACTÉRIAS EM EPISÓDIOS DE DIARREIA NEONATAL EM CAPRINOS E OVINOS NO ESTADO DA PARAÍBA

RESUMO GERAL – Os prejuízos econômicos determinados pela diarreia neonatal à exploração econômica de animais resumem-se em aumentos nos custos diretos e indiretos da criação. A diarreia está como um dos principais problema sanitário no período neonatal que compromete os rebanhos de caprinos e ovinos. Os principais agentes etiológicos apontados são *Escherichia coli*, *Salmonela* sp, *Cryptosporidium* sp., *Eimeria* sp. e *Giardia* sp e os rotavírus. A etiologia das diarreias neonatais em rebanhos caprino e ovino na região nordeste brasileira é sistematicamente e de forma generalizada atribuída às endoparasitoses, no entanto o presente trabalho tem como objetivo determinar os possíveis agentes etiológicos envolvidos em episódios de diarreia em caprinos e ovinos e analisar os principais aspectos epidemiológicos da doença nos rebanhos do estado da Paraíba. A metodologia consistiu em visitas a os rebanhos caprinos e ovinos das mesorregiões do estado da Paraíba. Sendo aplicado questionários epidemiológicos. Foram coletados 27 amostras de fezes diarréicas, sendo 23 amostra de caprinos e 4 de ovinos com até 80 dias de idade. As amostras foram submetidas à identificação de rotavírus por ss-PAGE e à técnica de isolamento de enterobactérias com a identificação pelo padrão bioquímico de cada espécie bacteriana. Os isolados de *E. coli* foram submetidos a mPCR para diferenciação dos grupos genotípicos. As amostras foram negativas para rotavírus e com isolados para *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella sonnei* e *Enterobacter aerogenes*. Dos aspectos epidemiológicos relevantes nas nove propriedades estudadas, apresentaram média 36 caprinos e 16 ovinos por propriedade, onde a criação extensiva 6/9 (66,6%), aptidão para carne 5/9 (55%), o controle trimestral de vermifugação 5/9 (55%) foram maioria. Os resultados obtidos no presente estudo podem contribuir para a melhoria da sanidade animal dos rebanhos do Estado da Paraíba, com a implementação de medidas de controle e prevenção das diarreias neonatais.

Palavras-chave: Enterobactéria, Diarreia, Caprino, Ovino.

ROTAVIRUS AND ENTEROBACTER RESEARCH IN EPISODES OF DIARRHEA NEWBORN IN SHEEP AND GOATS IN PARAÍBA STATES

ABSTRACT – The Economic losses determined by the neonatal diarrhea economic exploitation of animals are summarized in increases in direct and indirect costs of creation. Diarrhea is one of the main health problem in the neonatal period that compromises the flocks of goats and sheep. The main etiologic agents are appointed *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Cryptosporidium* sp., *Eimeria* sp., *Giardia* sp. and rotavirus. The etiology of neonatal diarrhea in goat and sheep herds in the Brazilian northeast region is systematically and widely given to endoparasitosis, however this study aims to determine the possible etiologic agents involved in episodes of diarrhea in sheep and goats and analyze the main epidemiological aspects of the disease in herds in Paraíba's state. The methodology consisted of visits to the goat and sheep herds of Paraíba's state. Epidemiological questionnaires being applied. And 27 diarrheic fecal samples were collected, with 23 sample of goats and 4 in sheep with 80 days old. The samples were subjected to the identification of rotavirus by ss-PAGE and isolation technique for the identification Enterobacter biochemical pattern of each bacterial species. Isolates of *E. coli* were subjected to mPCR to differentiate the genotype groups. Samples were negative for rotavirus and *E. coli* isolates, *S. typhi*, *Shigella sonnei* and *Enterobacter aerogenes*. Relevant epidemiological aspects of the nine properties studied showed an average of 36 goats and 16 sheep per property, where extensive farming 6/9 (66.6%), suitability for meat 5/9 (55%), quarterly control worming 5/9 (55%) were the majority. The results obtained in this study may contribute to the improvement of animal health of herds in the Paraíba's state, with the implementation of control measures and prevention of neonatal diarrhea.

Keywords: *Enterobacter*, *Diarrhea*, *Goat*, *Sheep*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil conta com mais de 35 milhões de pessoas morando na zona rural. Deste total 15 milhões vivem na região do semi-árido nordestino (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006). Como uma área de grande representatividade populacional para a agricultura familiar, principal modelo de produção nordestina, esta área está associada a pobreza de períodos de longas estiagens, como o vivido em 2013, considerada a pior seca dos últimos 50 anos, com cerca de 1400 municípios afetados (ONUBR, 2013).

Fatores como este afetam a caprinovinocultura, que é uma atividade de suma importância para a economia brasileira, geradora de renda e emprego, capaz de mudar o cenário de pobreza. Das 9.163.560 de caprinos e 16.811.721 de ovinos no Brasil (IBGE, 2009) sendo um rebanho considerável e com boa capacidade de adaptação, sem elencar a capacidade de melhoria de renda das famílias pelo baixo custo de manejo e rapidez no retorno financeiro.

O grande prejuízo econômico em consequência às falhas no manejo, principalmente sanitário, é relatado há décadas em vários estados, como Bahia (Caldas *et al.*, 1989), Pernambuco (Lima, 1979; Souza Neto, 1987), Paraíba (Bandeira *et al.*, 2007), Rio Grande do Norte (Filgueira *et al.*, 2009) e Ceará (Pinheiro *et al.*, 2000); sendo a grande limitação ao desenvolvimento da caprinovinocultura, ainda que haja o crescimento da demanda por produtos de origem caprina e ovina.

Análises quanto às características sanitárias dos sistemas de produção caprina e ovina na microrregião do Cariri foram realizadas. Santos *et al.* (2011), reuniram dados de 90 propriedades em nove municípios, por meio de questionário epidemiológico, onde 65,1% (58/90) dos produtores relataram que a diarreia foi o principal sinal clínico apontado como o que mais acomete as criações de caprinos e ovinos; seguida da alta mortalidade de cordeiros e cabritos (56,2%) relacionada ou não à diarreia neonatal (Bandeira *et al.*, 2007). Estudos realizados em outros estados da região nordeste também descrevem a diarreia como uma principal queixa clínica pelos produtores. No estado do Ceará, as diarreias foram relatadas

por 78,7% dos 124 produtores (Pinheiro *et al.*, 2000). Em Pernambuco, 87,8% das 147 propriedades investigadas a diarreia foi a principal queixa clínica, sendo em muitos casos atribuída às helmintoses, coccidioses e também por etiologia não identificada (Alencar *et al.*, 2010). Porém, para entender melhor a etiologia das diarreias neonatais é necessário considerar outras variáveis que tenham sido associadas a este problema sanitário, sejam fatores determinantes ou predisponentes de origem infecciosa ou não. Fatores ambientais, nutricionais, assim como falhas de manejo zootécnico-sanitário, estão entre as causas mais frequentes de diarreias de origem não infecciosa.

O diagnóstico conclusivo das enterites causadas pelos enteropatógenos é laboratorial, pois os sinais clínicos e as alterações patológicas observadas na infecção não permitem o diagnóstico clínico, já que os sinais clínicos ocasionados por diferentes agentes etiológicos de diarréia neonatal são muito semelhantes. Podemos citar como agentes patogênicos os Rotavírus, que podem ser utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida seguida da coloração pela prata (*silver stained polyacrylamide gel electrophoresis – ss-PAGE*) é uma das técnicas mais utilizadas para a detecção dos segmentos do RNA do RV. (HERRING *et al.*, 1982).

Entre os processos diarreicos de etiologia viral, os rotavírus (RV) são considerados a maior causa de infecções entéricas em mamíferos e em espécies aviaras jovens em todo o mundo. Pertencente à família *Reoviridae*, os rotavírus, não apresentam envelope lipoprotéico e o capsídeo é constituído por três camadas concêntricas de proteínas. O genoma viral é formado por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA).

Em contraste com estudos, globalmente distribuídos, que descrevem os RV em outros animais de produção, a ocorrência de RV em rebanhos ovinos é descrita em poucos países. No Chile, Berríos *et al.* (1988) identificaram RV em 15,6% (25/160) amostras de fezes, por meio de ELISA, em cabritos com até quatro meses de idade apresentando ou não diarreia. Na Espanha, o RV-A foi associado, juntamente com *Cryptosporidium* spp, como agente etiológico de um surto de síndrome diarreica ovina (ODS) que acometeu 192 ovelhas de um total de 203, com mortalidade de 17% dos animais (Cardiel *et al.*, 2011). Wani *et al.* (2004)

descreveram a ocorrência concomitante de RV-A e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) sorogrupos O26 e O133 em amostras diarréicas de ovinos com mais de três meses na Índia. Ghosh *et al.* (2010) identificaram em rebanhos caprinos de Bangladesh a presença de RV sorogrupo A (RV-A) em amostras de fezes diarréicas de animais com até três meses.

No Brasil, a ocorrência de rotavírus em caprinos ou ovinos é incerta. Devido à carência de estudos, principalmente envolvendo animais neonatos em episódios de diarréia, a causa etiológica é erroneamente conferida às endoparasitoses de forma generalizada. Os poucos estudos realizados no país sobre diarréia em pequenos ruminantes não tinham como objetivo a detecção de agentes etiológicos de origem infecciosa; tratam-se de inquéritos cujo objetivo era caracterizar a produção caprina e ovina, relatando a queixa de produtores frente às enfermidades encontradas ao longo da cadeia produtiva. (Pinheiro *et al.*, 2000; Bandeira *et al.*, 2007; Alencar *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011). Até o momento, o envolvimento de RV foi descrito apenas em um surto de diarréia em caprinos no estado de São Paulo (Buzinaro *et al.*, 2011).

A importância dos agentes etiológicos é variável e o predomínio de um agente em países, regiões ou mesmo a sua distribuição sazonal, está diretamente relacionado com o grau de regularidade e intensidade com que medidas de caráter higiênico-sanitárias são adotadas (Elad *et al.*, 1998).

Embora a maioria das causas de diarréia neonatal em uma variedade de animais esteja bem definida, existem alguns casos que ainda permanecem de origem desconhecida em decorrência de métodos laboratoriais ineficazes ou mesmo pela falta de estudos. Dentre aproximadamente 20 a 30% dos casos de enterite neonatal que compõem o grupo de diarréias, a etiologia não pode ser determinada (Janke, 1989). Portanto, isto realça a importância do desenvolvimento de estudos epidemiológicos com a utilização de métodos diagnósticos sensíveis e específicos que possam detectar a ampla variedade de enteropatógenos envolvidos nesta enfermidade.

Entre os principais patógenos de importância na caprinocultura destaca-se a *Escherichia coli*, bactéria que coloniza diferentes hospedeiros e é amplamente distribuída no meio ambiente. Este microrganismo apresenta diversos patotipos,

caracterizados pela presença de diferentes fatores de virulência codificados por genes específicos (Teng *et al.*, 2004).

A origem evolutiva de *E. coli*, especialmente de isolados extra-intestinais, tem sido estudada pela análise da presença de fatores de virulência em relação à organização populacional desta bactéria em diferentes grupos, a qual é definida por métodos filogenéticos (Johnson *et al.*, 2001). As análises filogenéticas têm mostrado que cepas desta bactéria podem ser classificadas em quatro grupos principais conhecidos para esta espécie, sendo: A, B1, B2 e D (Clermont *et al.*, 2000). As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas são classificadas no grupo D. Por outro lado, as cepas comensais pertencem aos grupos A e B1 (Herzer *et al.*, 1990; Lecointre *et al.*, 1998; Sabaté *et al.*, 2006).

Os principais marcadores de patogenicidade são: *chuA*, um gene necessário para o heme transporte em *E. coli* enterohemorrágica (0157:H7) (Mills; Payne, 1995; Bonacorsi *et al.*, 2000); *yjaA*, um gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* K12, cuja função ainda é desconhecida (Blattner *et al.*, 1997) e um fragmento de DNA designado TSPE4.C2 (Bonacorsi *et al.*, 2000) .

As *E. coli* podem ser divididas em relação aos seus mecanismos de patogenicidade em: *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Shiga toxigênica ou Verotoxigênica (STEC/VETEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* Uropatogênica (UPEC).

A *E. coli* ETEC caracteriza-se por ocasionar uma enfermidade que provoca diarréia neonatal principalmente em animais com idade entre zero e quatro dias. Esta bactéria adere-se à mucosa do intestino delgado graças à presença de adesinas fimbriais, tais como F4, F5, F6, F18 e F41, que são responsáveis por sua ligação aos receptores específicos nas células epiteliais com posterior produção de exotoxinas termoestáveis (STa e STb) e termolábil (LT). Dentro as fímbrias, a F4 é uma das principais encontradas em isolados de diarréia (COSTA *et al.*, 2008) e o gene responsável por sua expressão localiza-se no mesmo plasmídeo que alberga o gene da hemolisina. Apesar da importância da presença de fímbrias para a virulência dos isolados e determinação da doença, existem animais geneticamente resistentes à adesão por estas cepas, uma vez que não possuem receptores

fimbriais nas células intestinais (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). As toxinas LT são intimamente relacionadas em estrutura e função à enterotoxina da cólera, expressa pelo *Vibrio cholerae* (SIXMA *et al.*, 1993). As toxinas ST possuem classes que diferem em estrutura e mecanismo de ação, sendo elas STa e STb, responsáveis por danos histológicos no epitélio intestinal devido à perda das vilosidades ou atrofia parcial (CHAO; DREYFUS, 1997).

Esta enfermidade provoca desde uma diarréia branda sem evidências de desidratação até sinais caracterizados por fezes aquosas e amareladas com severa desidratação. Em casos severos, pode ocorrer a perda de 30 a 40% do peso corporal ou ainda a morte por choque.

A *E. coli* EPEC é membro de um grupo de microrganismos patogênicos que podem determinar sérios prejuízos econômicos devido à ocorrência de diarréias neonatais e pós-desmame associadas à má absorção de nutrientes (AN *et al.*, 2000). Tendo importância clínica em ruminantes, cães, macacos e humanos (BEAUDRY *et al.*, 1996; SARIDAKIS *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 2003; NAKAZATO *et al.*, 2004; TENG *et al.*, 2004).

Cepas deste patotipo aderem-se às células do hospedeiro, os enterócitos são degenerados e ocorre inflamação da lâmina própria, principalmente no íleo. No entanto, o duodeno e o ceco são os locais onde ocorre a maior colonização (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999; AN *et al.*, 2000). A diarréia causada por este patotipo é pouco severa e está associada a múltiplos mecanismos, incluindo secreção de íons, aumento da permeabilidade, inflamação intestinal e consequentemente má absorção de nutrientes (NATARO; KAPER, 1998).

A *E. coli* Shiga toxigênica ou Verotoxigênica (STEC/VETEC) demonstram uma alta relação com as EPEC. Produz uma toxina encontrada como parte do genoma de um fago temperado, o qual se integra ao genoma da célula hospedeira sendo encontrado em diversos sorotipos de *E. coli* e em outros membros da família Enterobacteriaceae (DOUGAN *et al.*, 2001; TOTH *et al.*, 2003). A enfermidade ocorre quando cepas de *E. coli* STEC se aderem ao intestino delgado por meio de fímbrias F18a/b e se multiplicam, produzindo exotoxinas (shiga toxinas) que são absorvidas pela circulação sistêmica. Essas toxinas inativam a síntese protética em células do endotélio vascular do intestino delgado, tecido subcutâneo e encéfalo. A

lesão nas células endoteliais induz o aparecimento do edema e sinais nervosos característicos da enfermidade (HENTON; HUNTER, 1994).

A *E. coli* EHEC compreende um grupo importante de patógenos entéricos zoonóticos, podendo em muitos casos determinar doença fatal. Os ruminantes são reservatórios freqüentes da bactéria e as infecções humanas associam-se ao contato direto ou indireto com as fezes destes animais (NATARO; KAPER, 1998). Caracteriza-se pela produção de hemolisina é prejudicial para uma variedade de células endoteliais e epiteliais, incluindo células do cólon e do íleo humanos. A infecção por EHEC pode ocasionar a síndrome hemolítica urêmica, podendo apresentar taxa de mortalidade de até 12% (GERBER *et al.* 2002; GARG *et al.* 2003). Esta doença ocorre quando as toxinas produzidas por *E. coli* são absorvidas pela circulação sistêmica. Caracteriza-se por trombocitopenia, anemia hemolítica e nefropatia (KARMALI *et al.*, 1985). A resistência natural à doença ocorre pela ausência de expressão de receptores (F18a/b) no intestino dos animais. A morbidade é extremamente variável, geralmente entre 30% e 40%, porém pode chegar a 80%. A mortalidade média é de 50%, no entanto, em alguns casos atinge índices maiores que 90%. O curso da doença varia de quatro a 14 dias, podendo surgir e desaparecer subitamente (STRAW *et al.*, 1999). Os sinais clínicos incluem incoordenação motora, cegueira, dispneia, edema de pálpebras, paralisia, tremores, convulsões e movimentos de pedalagem, podendo alcançar altos índices de mortalidade.

As cepas caracterizadas como EIEC apresentam características bioquímicas, genéticas e de patogenicidade semelhantes à *Shigella* sp. (BRENNER *et al.*, 1973). Os mecanismos de patogenicidade deste patótipo ainda não estão completamente elucidados, contudo estudos demonstram que o microrganismo invade profundamente o epitélio do intestino, especialmente do cólon. Em seguida, atinge o sistema linfático, onde se multiplica ao mesmo tempo em que ocorre a morte de algumas células bacterianas e produção de endotoxinas. Os fatores de virulência como cápsula, adesinas, sideróforos e α-hemolisina são importantes para a sobrevivência de cepas invasivas, que são responsáveis por causar colisepticemia. Ainda, produz uma forte reação inflamatória caracterizada pela presença de úlceras, as quais provavelmente estão relacionadas à diarréia. O quadro clínico caracteriza-

se por diarréia aquosa podendo apresentar muco ou sangue (NATARO; KAPER, 1998).

O trato urinário é um dos sítios mais comuns de infecções bacterianas e *E. coli* UPEC é um dos principais agentes relacionados a essas enfermidades, sendo responsável por graves prejuízos, redução de peso, mortalidade dos neonetos e gastos com medicação (BRITO et al., 2004). As infecções urinárias ocorrem pela penetração e multiplicação da bactéria no trato urinário, sendo que geralmente são ascendentes do trato gastrointestinal (SOBESTIANSKI et al., 1999).

Estes fatores de virulência auxiliam na inibição ou subversão das defesas do hospedeiro, provocando alterações fisiológicas e invasão de tecidos, o que causa uma resposta inflamatória severa (JOHNSON et al., 2001). Geralmente o curso da infecção é subclínico, porém podem ser observados sinais de apatia, febre, dificuldade de levantar e permanecer em estação, além de alterações físico-químicas na urina e secreção vaginal (STRAW et al., 1999).

O presente trabalho tem como objetivo determinar os possíveis agentes etiológicos envolvidos em episódios de diarreia em caprinos e ovinos e analisar os principais aspectos epidemiológicos da doença nos rebanhos do estado da Paraíba.

2 CAPÍTULO 1

PESQUISA DE ROTAVÍRUS E ENTEROBACTÉRIAS EM EPISÓDIOS DE DIARREIA NEONATAL EM CAPRINOS E OVINOS NO ESTADO DA PARAÍBA

Domingos F Lugo Neto, MV; Rodrigo Guimarães, MV; Fábio Júnior R. Xavier, MVs;
Ricardo P Lima, MVs; Elis Lorenzetti MSc; Rafael Felipe C. Vieira, Ph. D.; Amauri A.
Alfieri, Ph.D, Danilo Stipp, Dr.

Artigo submetido à revista Small Ruminant Research

Resumo

Os métodos de produção de caprinos e ovinos no estado da Paraíba são bastante diversificados, os produtores relataram que a diarreia esta entre as causas mais frequentes de óbitos. O objetivo é conhecer o manejo sanitário e os problemas sanitários nos criatórios de caprinos e ovinos da região do semi-árido da Paraíba, identificar os agentes etiológicos envolvidos nos casos de diarreia neonatal. Como universo amostral foi aplicado questionário aos proprietários de 9 propriedades de 4 municípios que abrange o semi-árido e agreste paraibano. Foram visitadas um total de 1800 animais e coletadas 27 amostras diarréicas, com idade de até 80 dias. Com médias 36 caprinos e 16 ovinos por propriedade. Com relação à aptidão das propriedades, 5/9 (55%) apresentavam aptidão para carne, 1/9 (11%) para leite e 3/9 (33%) dos rebanhos com dupla aptidão. Com relação a queixa clínica principal analisada (diarreia), esta foi apenas apontada em 4/9 (44%) das propriedades. As amostras diarréicas submetidas para detecção de rotavírus foram negativas em ss-PAGE. Após as análises bacterianas, foram identificadas 18 (24%) isoladas de *E. coli* na espécie caprina e 6 (8%) *Salmonela typhi*, sendo duas em ovinos e 4 em caprinos, 37 (49%) *Shigella sonnei*, 13 (17%) isolados indiferenciados e 1 (1%) *Enterobacter aerogenes*. As *E. coli* foram caracterizada genotipicamente por mPCR 6% (1) pertencente ao grupo A, 88% (16) ao grupo B1 (Figura 1), 0% (0) ao grupo B2 e 6% (1) ao grupo D. A maioria dos criadores de caprinos e ovinos desta pesquisa adota uma criação de subsistência e explora basicamente carne/pele. As diarréias continuam sendo uma das principais causas de óbitos em neonatos e corroboram para diminuição da rentabilidade dos rebanhos e das propriedades mantidas por este tipo de criação.

Palavras-chave: Pequenos Ruminantes, Diarreia, Neonatos, *E. coli*, Enteropatógenos

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho caprino e ovino de 9.163.560 e 16.811.721 animais, respectivamente, distribuídos por todas as regiões do país, sendo 90,6% e 56,9% da produção de caprinos e ovinos, respectivamente, concentrado na Região Nordeste (IBGE, 2009). Os métodos de produção de caprinos e ovinos no estado da Paraíba são bastante diversificados, principalmente quanto às práticas de manejo e os aspectos sanitários, o que interfere sobremaneira na produtividade do rebanho (AZEVEDO, 1982). O prejuízo econômico em consequência a falhas no manejo sanitário, é relatado há décadas em vários estados, porém a etiologia das infecções diarreicas são pouco estudadas. Limitando, assim o desenvolvimento da caprinovinocultura na Paraíba (BANDEIRA *et al.*, 2007). A real situação dos rebanhos é uma incógnita bem como o manejo das micro-criações familiares.

Os métodos de produção de caprinos e ovinos no estado da Paraíba são bastante diversificados, devido às características ambientais distintas das regiões onde estão localizadas as propriedades. A mesorregião da Borborema, que engloba a microrregião do Cariri Paraibano apresenta a maior densidade de caprinos (19,19 cabeças/km²) e ovinos (14,79 cabeças/km²) do continente americano. O Cariri está inserido no Semiárido brasileiro, com clima quente e seco, temperatura média acima de 26°C e pluviosidade irregular variando de 250 até 700 mm/ano. As demais mesorregiões do estado (Sertão, Agreste e Litoral Paraibano) apresentam um pequeno plantel e baixa capacidade produtiva, compostas por animais sem padrão racial definido para uma determinada exploração e criados de forma extensiva, sendo animais tipicamente para criação de subsistência.

Análises quanto às características sanitárias dos sistemas de produção caprina e ovina na microrregião do Cariri foram realizadas. Santos *et al.* (2011), reuniram dados de 90 propriedades em nove municípios, por meio de questionário epidemiológico, onde 65,1% (58/90) dos produtores relataram que a diarreia, fatores ambientais, nutricionais, assim como falhas de manejo zootécnico-sanitário, estão entre as causas mais frequentes de óbitos nos criadouros de ovinocaprinocultores.

As diarreias, especialmente as de origem infecciosa incluem uma gama de micro-organismos enteropatogênicos, como bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella*

sp, *Clostridium perfringens* tipo C), protozoários (*Cryptosporidium* sp, *Eimeria* sp, e *Giardia* spp), fungos (*Candida glabrata*) e vírus (rotavírus, coronavírus), que determinam tanto a frequência de ocorrência quanto a intensidade dos casos. Esses agentes podem atuar de forma isolada ou em associação, comprometendo ainda mais a severidade da doença.

A origem evolutiva de *E. coli*, especialmente de isolados extra-intestinais, tem sido estudada pela análise da presença de fatores de virulência em relação à organização populacional desta bactéria em diferentes grupos, a qual é definida por métodos filogenéticos (JOHNSON *et al.*, 2001). As análises filogenéticas têm mostrado que cepas desta bactéria podem ser classificadas em quatro grupos principais conhecidos para esta espécie, sendo: A, B1, B2 e D (CLERMONT *et al.*, 2000). As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas são classificadas no grupo D. Por outro lado, as cepas comensais pertencem aos grupos A e B1 (HERZER *et al.*, 1990; LECOINTRE *et al.*, 1998; SABATÉ *et al.*, 2006). Cepas extra-intestinais patogênicas e comensais de *E. coli* diferem de acordo com os fatores de virulência, expressos por genes geralmente agrupados em ilhas de patogenicidade, proporcionando um mecanismo de transferência horizontal coordenada desses genes de virulência (SHERLEY *et al.*, 2004). A reação em cadeia pela polimerase (PCR) para grupos filogenéticos é um método utilizado para a classificação dos isolados de *E. coli* por meio da detecção dos genes chuA, yjaA e do fragmento de DNA TSPE4.C2 (CLERMONT *et al.*, 2000).

O direcionamento das pesquisas é de suma importância para a relação custo/benefício. Pensando nisto e na carência de trabalhos epidemiológicos, este estudo teve por objetivo conhecer mais detalhadamente o manejo sanitário empregado e os problemas sanitários mais relevantes nos criatórios de caprinos e ovinos da região do semi-árido da Paraíba, bem como, identificar os agentes etiológicos envolvidos nos casos de diarreia neonatal em caprinos e ovinos. O questionário epidemiológico serviu como base para levantamento dos surtos de diarreia neonatal, facilitando assim a coleta de material para análise dos enteropatogenos envolvidos nestes episódios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Inquérito epidemiológico

Como universo amostral foi aplicado questionário aos proprietários de 9 propriedades de 4 municípios que abrange o semi-árido e agreste paraibano. Como não existe uma listagem representativa dos criadores caprinos e ovinos no estado da Paraíba, a amostragem não probabilística foi utilizada para selecionar os criadores. A produção de caprinos e ovinos foi a única característica pré-determinada requerida para que as propriedades fossem incluídas na amostragem.

O rebanho foi considerado leiteiro quando os animais eram ordenhados regularmente e o leite utilizado para o consumo próprio ou comercializado, e de corte/pele quando existia abate para consumo próprio com a pele comercializada ou havia venda regular de animais vivos destinados ao abate.

Uma lista de problemas sanitários foi pré-estabelecida no questionário com foco principal no surto de diarreia em neonatos, aplicado diretamente ao indivíduo responsável pelo rebanho, tomndo-se o cuidado de levar em conta os problemas ocorridos no período de um ano.

Com base nos questionários aplicados, foi determinado o perfil sanitário da amostra estudada. Para a análise das informações colhidas constituiu-se um banco de dados por meio de tabulação e codificação, analisado pelo programa Epi-info (DEAN *et al.*, 1992), estabelecendo-se a frequência de cada variável na amostra levantada.

2.2 Amostras clínicas e Critérios de Inclusão

Foram visitadas um total de 1800 animais e coletadas 27 amostras diarreicas, sendo 23 em caprinos e 4 em ovinos com idade de até 80 dias, pertencentes a quatro rebanhos com histórico de diarreia neonatal no estado da Paraíba, região nordeste do Brasil.

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal e encaminhadas sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) para análise de patógenos entéricos ao

Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Hospital Veterinário, Universidade Federal da Paraíba.

2.3 Extração do dsRNA e detecção de rotavírus

A extração do RNA foi realizada a partir de alíquotas de 400 µl das amostras fecais, utilizando a técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico descrita por THEIL *et al.* (1981).

Para a detecção de rotavírus caprino e ovino e identificação dos respectivos eletroferogrupos foi realizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% seguida da coloração pela prata (ss-PAGE), segundo PEREIRA *et al.* (1983).

2.4 Análise Bacteriológica

A identificação bacteriana foi feita em etapa prévia de enriquecimento em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e, posteriormente, semeadas em meio Levine com incubação por 24 horas a 37,5°C. As colônias sugestivas de enterobactérias foram submetidas à análise bioquímica por meio de inoculação em meio TSI, Citrato, SIM, VM e VP, com leitura após 24 horas e análise de acordo com o Manual Bergey (WHITMAN, *et al.* 2012).

As colônias sugestivas foram estocadas, mantidas em caldo Triple Sugar Iron (TSI) e, posteriormente, transferidas para BHI glicerinado, sendo congeladas até seu uso.

2.5 Extração de DNA e análise molecular dos isolados de *Escherichia coli*

Os isolados foram enriquecidos em caldo BHI e novamente inoculados em Agar MacConkey, sendo incubados por 24 horas, à 37°C. Colônias isoladas foram coletadas usando uma alça de platina e ressuspensas em microtubo contendo 500ul H₂O milli-Q. Aquecidas à 100°C por 11 minutos e em seguida em gelo por 4

minutos, centrifugada a 14.000 RPM por 2 minutos retirando o sobrenadante com o DNA bacteriano (COSTA, 2007).

A solução “master mix” utilizada para os genes foi composta de: 15 μ l de H₂O milli-Q, 2,5 μ l de tampão, 1 μ l MgCl₂, 1 μ l dNTPs, 1 μ l de cada primers (Tab 01) e 0,5 μ l Taq polimerase. Foram utilizados 22 μ l da solução “master mix” acrescido de 3 μ l de H₂O milli-Q como controle negativo e 3 μ l de cada amostra de DNA. A amplificação dos genes ChuA e YjaA consistiu de desnaturação a 94°C por 4 min.; seguido por 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s; com extensão final à 72°C por 7 min. A amplificação do gene TspE4C2 consistiu de desnaturação a 94°C por 3 min.; seguido por 35 ciclos de 94°C por 3 min., 55°C por 1min. e 72°C por 45s; com extensão final à 72°C por 7 min. (COSTA, 2007).

Foi utilizado 18 μ l das amostras amplificadas em gel de agarose 1,5%, corado com 4 μ l brometo de etídio, submetido à 100 V e 120mA por 3h.; visualizado após sob luz ultravioleta. (COSTA, 2007)

3. Resultados

O levantamento epidemiológico estendeu-se de janeiro a março de 2013 e foi delineado para verificar aspectos sanitários e dados do manejo sanitário do rebanho caprino (apêndice 1). O número de animais nos rebanhos visitados variou entre 3 a 104 e 4 a 87, caprinos e ovinos respectivamente. Com médias 36 caprinos e 16 ovinos por propriedade.

A Tabela 1 apresenta o número médio de animais, matrizes, jovens até 90 dias vida, seguimento este focado em nosso estudo. Quanto ao regime de criação, houve o predomínio de regime extensivo 6/9 (66,6%) e semi-intensivo 3/9 (33,3%), não sendo encontrada nenhuma propriedade com o regime intensivo.

Com relação à aptidão das propriedades, 5/9 (55%) apresentavam aptidão para carne, 1/9 (11%) para leite e 3/9 (33%) dos rebanhos com dupla aptidão. Com relação a queixa clínica principal analisada (diarreia), esta foi apenas apontada em 4/9 (44%) das propriedades. Questionou-se sobre os óbitos no período de 6 últimos meses, e em apenas uma não tinha ocorrido óbitos, nas demais a média de óbitos foi de 3,5 animais por propriedade (tab. 2).

Das 4 propriedades que apresentaram diarreia, todas tiveram a presença de médico veterinário para orientar o tratamento e apenas 3/4 (75%) realizaram o tratamento recomendado. Com relação à época de ocorrência da diarreia foi relatado que em 4/9 (44%) aconteciam na época seca, 2/9 (22%) na época chuvosa, 2/9 (22%) durante o ano todo e apenas um disse não saber dizer a em que época ocorre.

Das 9 propriedades, 2 (22%) dispunham de incentivo financeiro pelo governo. E apenas 5 propriedades responderam quanto ao valor médio mensal gasto com o rebanho onde 3/5 (60%) giravam em até 100,00 R\$ e 2/5 (40%) de 100,00 a 500,00 R\$, valor muito abaixo do preconizado por propriedade de lucro estimado e apto ao desenvolvimento de planejamento financeiro rentável. O Lucro nas propriedades foi questionado e em apenas uma foi relatado que não havia nenhum tipo de lucro em 2/9 (22%) mensal, 3/9 (33%) semestral e 3/9 (33%) anual.

Apenas 3/9 (33%) tinha recebido orientação para manejo de sua criação e em 5/9 (55%) tinha algum tipo de caracterização zootécnica no rebanho quanto ao questionamento final foi com relação a satisfação sobre a criação do rebanho em 8/9 (88%) estava satisfeito com a sua criação e em apenas um não estava.

As amostras diarreicas submetidas para detecção de rotavírus foram negativas em ss-PAGE. Na análise bacteriológica 24 (88%) inoculadas em meio Levine apresentaram-se sugestivas para enterobactérias. Destas três colônias foram isoladas de cada placa submetida a análise bioquímica. Após as análises, foram identificadas 18 (24%) isoladas de *E. coli* na espécie caprina e 6 (8%) *Salmonella typhi*, sendo duas em ovinos e 4 em caprinos, 37 (49%) *Shigella sonnei*, 13 (17%) isolados indiferenciados e 1 (1%) *Enterobacter aerogenes*.

As *E. coli* foram caracterizada genotipicamente por mPCR 6% (1) pertencente ao grupo A, 88% (16) ao grupo B1 (Figura 1), 0% (0) ao grupo B2 e 6% (1) ao grupo D. Das 18 amostras classificadas apenas 6% (1/18) são patogênicas e a grande maioria apresentou nos grupos A e B1 94% (17/18) grupo característico de cepas comensais (CLERMONT et al, 2000).

Nas propriedades P6, P9 e P7 apresentaram casos de diarreia neonatal determinados por bactérias, sendo que em P6 e P7, foram isolados concomitantemente *E. coli* e *S. typhi*, em P6 detectou os genótipos do grupo D, B1 e

A, em P7 e P9 só apresentaram genótipo B1. Na propriedade P9 a *E. coli* foi identificada em infecção singular.

4. Discussão

A média de animais encontrada nas referidas propriedades difere do apresentado por Gutierrez *et al.* (1981) onde apresentava 116 animais por propriedade, refletindo no fato de poucos animais para serem coletados, além de que nestes animais a quantidade de fezes na ampola retal, sempre apresentava um volume reduzido, impossibilitando a análises parasitológicas associadas a exames bacteriológicos e pesquisa de rotavírus, inviabilizando a busca destes parasitos por necessitarem de um maior volume fecal para as análises.

No Rio de Janeiro e Minas em levantamento em criatórios de caprinos mostrou que o regime intensivo está associado ao nível sociocultural dos criadores pela sua preocupação com o rendimento dos animais e ganho de peso acompanhado (MAGALHÃES *et al.*, 1985), não encontrado semelhantemente na Paraíba. A maioria dos criatório na região pesquisada não possuía o cuidado com relação a recria, os animais eram soltos no pasto sem nenhum tipo de acompanhamento o que influenciava na capacidade de lucratividade com o rebanho e seus cuidados intensivos na sanidade animal. Esses dados diferentes dos encontrados em três municípios no interior da Bahia (TINÔCO, 1983), onde havia um regime de predominantemente semi-intensivo, o que foi encontrado em apenas uma propriedade, que possuía o cuidado com as matrizes na época do parto, realizando um melhor controle parasitário e sanitário.

A criação extensiva tem como objetivo a produção de carne e pele em sua maioria, enquanto que os sistemas semi-intensivo exploram principalmente a produção mista (carne/pele e leite) ou a produção de leite (PINHEIRO *et al.*, 2000). Corroborando para o que foi encontrado no presente estudo com maioria na criação extensiva logo com aptidão semelhantemente para carne/pele.

O principal aspecto clínico pesquisado foi a diarreia, apontado como queixa principal por Alencar *et al* (2010), foi relatada em apenas 4/9 (44%) em nosso estudo, diferente ao apresentado pelo autor com 87%. Quando a diarreia é apontada

como queixa principal ele é empiricamente ligada a verminose gastrintestinal (VIEIRA *et al.*, 1998). Na propriedade sem casos de óbitos não realizava vermifugação periódica dos animais, a frequência do tratamento anti-helmíntico é altamente responsável pela disseminação da resistência parasitária, na qual se encontra a grande maioria de nematoides gastrintestinais (SISSAY *et al.*, 2006).

As demais propriedades fazem controle trimestral 5/9 (55%), semelhante ao encontrado por Pinheiro *et al.* (2000) e controle mensal 1/9 (11%) e anual 1/9 (11%), diferente do encontrado por Magalhaes (1985). Souza Neto *et al.* (1996) relatam que os rebanhos leiteiros nos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte eram, em geral, vermifugados apenas uma ou duas vezes por ano, diferente do encontrado, onde a maioria foi trimestral.

É importante ressaltar que, especialmente, os caprinos metabolizam os anti-helmínticos mais rapidamente do que os ovinos (SANGSTER *et al.*, 1991), promovendo uma seleção mais rápida para a resistência em caprinos (HENNESSY, 1997). Justificando desta forma a baixa incidência de resistência em ovinos e consequentemente a ausência de óbito na propriedade 2.

Em estudo realizado no Cariri Paraibano (LIMA, *et al.* 2010) observou-se que dentre em 8 propriedades estudadas pelo autor, 6 (75%) delas a vermifugação dos animais era realizada semestralmente fator este não relatado em nenhuma propriedade deste estudo.

No Brasil, devido à carência de estudos, principalmente envolvendo animais neonatos em episódios de diarreia, a causa etiológica é erroneamente conferida às endoparasitoses de forma generalizada (BANDEIRA *et al.*, 2007). Os poucos estudos realizados no país não tinham como objetivo a detecção de agentes etiológicos de origem infecciosa (SANTOS *et al.*, 2011). Desta forma, o estudo foi realizado para identificar os possíveis agentes infecciosos envolvidos nos casos de diarreia. Outros trabalhos objetivaram inquéritos para caracterizar a produção caprina e ovina sem levar em consideração os agentes causadores (PINHEIRO *et al.*, 2000), apenas relatando as queixa de produtores frente às enfermidades encontradas ao longo da cadeia produtiva (ALENCAR *et al.*, 2010).

O diagnóstico de infecções causadas por *E. coli* é geralmente realizado pela observação dos sinais clínicos presuntivos, dados epidemiológicos e exames

laboratoriais, sendo estes essenciais para a caracterização de isolados patogênicos, pois este microrganismo é comensal nos tratos urinário e entérico de animais saudáveis (BRITO *et al.*, 2004). O cultivo desta bactéria em laboratório pode ser realizado em meio de cultura sólida, no qual as colônias são observadas após 24 horas de incubação, apresentando aspecto mucóide. Em ágar Levine as colônias são caracterizadas por apresentar coloração verde brilhante e negra, o que possibilita a diferenciação de outras bactérias de origem entérica.

A *E. coli* é identificada por diferentes características bioquímicas, como ausência da enzima citocromo oxidase, produção de indol, redução de nitratos, fermentação da glicose e outros carboidratos, produção de gás. A maioria dos isolados não produz ácido sulfídrico (H_2S) (QUINN *et al.*, 1994). Contudo, a identificação fenotípica deve ser utilizada com prudência, por não apresentar 100% de fidedignidade, pois aproximadamente 10% das cepas são lactose negativa, e 1% das cepas não produzem indol, que se constitui no principal teste para diferenciação de *E. coli* dos outros membros da família Enterobacteriaceae (NATARO; KAPER, 1998).

Três marcadores de patogenicidade têm sido estudados: *chuA*, um gene necessário para o heme-transporte em *E. coli* enterohemorrágica (0157:H7) (MILLS; PAYNE, 1995; BONACORSI *et al.*, 2000); *yjaA*, um gene inicialmente identificado no genoma de *E. coli* K12, cuja função ainda é desconhecida e um fragmento de DNA designado TSPE4.C2 (BONACORSI *et al.*, 2000; Figura 01) . A virulência de *E. coli* pode ser descrita em varias espécies pela técnica de análise filogenética por agrupamento, podendo ser complementada por análises dos genes de virulência.

A classificação genotípica demonstrou uma maior representatividade dos grupos comensais B1 e A, diferente do identificado em humanos (BINGEN *et al.*, 1998). Em animais os grupos mais resistentes a antibióticos e consequentemente mais virulentos não são classificados no grupo B2 (SABATÉ, *et al.*, 2008).

A grande variação de genótipos pode ser explicado pela variação geográfica e caracterização individual de cada espécie (ZHANG *et al.*, 2002), principalmente, em caprinos que são animais de forte adaptabilidade as condições ambientais.

Em suínos foi relatado que a maioria das *E. coli* pertencentes ao grupo B1 são identificadas em amostras de urina (LILLIAN *et al.*, 2009). Diferentemente, o presente

trabalho determinou que a maioria das *E. coli* com esta caracterização (83%) foram encontradas em fezes de caprinos e ovinos. Ainda, os dados obtidos da caracterização da *E. coli* encontrados são classificados como não patogênicos, pertencentes ao grupo A (CLERMONT *et al*, 2000). Em estudo prévio de *E. coli* comensais em animais e humanos, diversidades na sua distribuição de grupos genotípicos em diferentes populações foi relatado, o que justifica as características dos isolados em caprinos e ovinos (PICARD *et al*, 1990).

A grande quantidade dos isolados nos intestinos de animais demonstram certa prevalência com os encontrados em outros animais, pois a maioria dos achados em amostra fecais é do grupo A e B1, mostrando a similaridade dos caprinos com as demais espécies (CHAPMAN *et al*, 2006).

Estudos descrevem que 52% das *E. coli* comensais apresentam genes de virulência em modelos descrito em suínos que podem ser analisados futuramente para determinar se esta prevalência também é observada em caprinos e ovinos (LILLIAN *et al*, 2009). Cepas patogênicas e comensais de *E. coli* têm sido estudadas em suas características genéticas. Cepas comensais de *E. coli* são autóctones, porém podem abrigar genes de virulência (CAMPOS *et al*, 2008). Neste caso, a associações genética incorretas podem estar relacionadas com qualquer quadro clínico entérico. A presença de genes de virulência não é equivalente à sua expressão. Genes que se voltaram para facilitar infecções são dependentes do ambiente e condições imunológicas de cada espécie (CHAPMAN *et al*, 2006).

Estudos sugerem que a *E. coli* tem um ancestral em comum em sua origem, uma linhagem patogênica e outra não patogênica esta possivelmente envolvida em uma transmissão horizontal de genes de virulência (SILVEIRA *et al*, 2002). A manutenção destes genes de virulência parte como mecanismo de sobrevivência da *E. coli* para aumentar sua diversidade e sua capacidade de adaptação as múltiplas espécies hospedeiras (CHAPMAN *et al*, 2006).

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos encontrados em estudos de aves que classificam a maioria das *E. coli* nos grupos A, B1 e D (JOHNSON *et al*, 2008), enquanto que em suínos as cepas bacterianas estão no grupo D e B1 (LILLIAN *et al*, 2009).

5. Conclusão

A maioria dos criadores de caprinos e ovinos desta pesquisa adota uma criação de subsistência e explora basicamente carne/pele. O manejo sanitário nesses criatórios é precário, independentemente do tipo de exploração ou regime de criação. A mortalidade de animais, principalmente de jovens, é alta, o que compromete seriamente o desenvolvimento da atividade produtiva. Mesmo com toda falta de apoio financeiro e técnico as criações o produtor familiar ainda sente satisfação em manter um rebanho pequeno e que pode promover o sustento alimentar de sua família, mesmo em épocas de estiagem prolongada como a aplicada neste estudo.

Considerando as técnicas descritas para detecção de enteropatógenos e considerando uma análise epidemiológica dos criadouros da região o método de mPCR para identificação de *E. coli* pode auxiliar o clínico na diminuição de prevalência de óbitos em neonatos nos rebanhos caprinos e ovinos da Paraíba.

As diarreias continuam sendo uma das principais causas de óbitos em neonatos e corroboram para diminuição da rentabilidade dos rebanhos e das propriedades mantidas por este tipo de criação. As bactérias são um dos principais agentes etiológicos envolvidos neste processo e associadas a outros agentes podem agravar o grau de desidratação dos neonatos levando ao processo rápido de óbito. Estudos complementares devem ser seguidos para demonstrar a resistência bacteriana a antibióticos e a sua associação a outros agentes patogênicos.

6. Referências

ALENCAR, S.P.; MOTA, R.A.; NASCIMENTO, S.A.; COELHO, M.C.O.C.; ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, p.131-140, 2010.

AZEVEDO, C.F. Criação de caprinos e ovinos no Nordeste. Natal, **EMPARN**, 1982. (EPARN. Boletim Técnico, n.12).

BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; MELO, L.S.S.; MELO, C.B.; AZEVEDO, E.O. Características de produção da caprinocultura leiteira na região do Cariri na Paraíba. **Ciência Veterinária Trópicos**, v.10, p.29-35, 2007.

BINGEN E, PICARD B, BRAHIMI N, et al.: Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **Journal Infectious Diseases** 177:642–650, 1998.

BONACORSI, S. P. P., O. CLERMONT, C. TINSLEY, I. LE GALL, J. C. BEAUDOIN, J. ELION, X. NASSIF, AND E. BINGEN. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infect Immunity**. 68: 2096–2101, 2000.

BRITO, B. G. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 34, n. 2, p. 645-652, mar./abr., 2004

CAMPOS TA, LAGO JC, NAKAZATO G, et al.: Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 28:533-540, 2008.

COSTA, MATEUS MATIUZZI DA,. Caracterização patotípica de isolados de *Escherichia coli* obtidos de suínos: presença de plasmídeos e perfil de resistência aos antimicrobianos. **Tese de doutorado**, Porto Alegre, 2007

CHAPMAN TA, WU XY, BARCHIA, I., et al.: Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. **Applied Environmental Microbiology**. 72: 4782-4795, 2006.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E.: Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied Environmental Microbiology**. 66:4555- 4558, 2000.

DEAN, A.G., DEAN, J.A., BURTON, A.H. et al. Epi-info, [version 6: A word processing, database and statistic program for epidemiology on micro-computers.] Atlanta: **Center for Disease Control**, 1992.

HENNESSY, D. R. Physiology, pharmacology and parasitology. **International Journal of Parasitology**, [S. I.], v. 27, p. 145-152, 1997.

HERZER, P. J. et al. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single- stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/Tabela/protabl.asp?z=t&o=12&i=P>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 183, p. 78-88, jan., 2001.

JOHNSON TJ, WANNEMUEHLER Y, DOETKOTT C, et al.: Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal Clinic Microbiology**. 46: 3987-3996, 2008.

LECOINTRE, G. et al. Escherichia coli Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Molecular Biology and Evolution**, USA, v. 15, n. 12, p. 1685-1695, 1998.

LILIAN, K., VARGAS, A. C. Phylogenetic and pathotype analysis of escherichia coli swine isolates from southern brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2009.

LIMA, W. C., ATHAYDE, A. C.R., MEDEIROS, G. R., LIMA, D. A. S. D., BORBUREMA, J. B., SANTOS, E. M., VILELA, V. L.R. e AZEVEDO, S. S., Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30(12):1003-1009, dezembro 2010

MAGALHÃES H.H. Diagnóstico de situação da caprinocultura em algumas microrregiões dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro – Resultados Preliminares. **Cabras & Bodes**, v.1, p.5-7, 1985.

MILLS, M.; PAYNE, S. Genetics and regulation of haem iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 177, n. 11, p. 3004-3009, jun., 1995.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, USA, v.11, n. 1, p. 142-201, jan., 1998.

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

PICARD B, GOULLET P, SAMMARTINO AE, CHAVENTRE A: Electrophoretic polymorphism of esterases in strains of *Escherichia coli* isolated from different host populations. In Pluridisciplinary Approach to Human Isolates, pp. 233-242. **The Institut National d'Etudes De mographiques** (INED), Paris, 1990.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.110-117, 2000.

QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR: **Clinical Veterinary Microbiology**. WOLFE, 1994, 648p, 1994.

SABATÉ M, MORENO E, PÉREZ T, ANDREU A, PRATS G: Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology Infection**. 12:880–886, 2006.

SABATÉ M, PRATS G, MORENO E, et al.: Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. **Research Microbiology**. 159: 288-293, 2008.

SANGSTER, N. C. et al. Disposition of oxfedazole in goats and ewes compared with sheep. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 51, p. 258-263, 1991.

SANTOS, T.C.P.; ALFARO, C.E.P.; FIGUEIREDO, S.M. Aspectos sanitários e de manejo em criações de caprinos e ovinos na microrregião de Patos, região semi-árida da Paraíba. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.206-212, 2011.

SHERLEY, M.; GORDON, D. M.; COLLIGNON, P. J. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology**, USA, v. 150, n. 5, p. 1539-1546, 2004.

SILVEIRA WDS, FERREIRA A, BROCCHI M, et al.: Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology** 85:47-53, 2002.

SISSAY, M. M. et al. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: Exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 135, p. 337-346, 2006.

SOUZA NETO, J., BAKER, G.A., SOUSA, F.B. Caprinocultura de duplo propósito no Nordeste do Brasil: avaliação do potencial produtivo. **RELATÓRIO TÉCNICO DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS** 1987-1995, p.210-212, 1996.

TINÔCO, A.L.A. Diagnóstico de situação da ovino/caprinocultura em três municípios do sertão baiano – Euclides da Cunha, Qujingue, Monte Santo – Bahia, 1981/1982. Belo Horizonte: **Escola de Veterinária da UFMG**, 1983. 13p. (Seminário).

VIEIRA, L.S., CAVALCANTE, A.C.R., XIMENDES, L.F. Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste. Sobral: **EMBRAPA-CNPC**. 1998. 50p.

WHITMAN, W.B., GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H.-J., TRUJILLO, M.E., LUDWIG, W., SUZUKI, K., Parte, A. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** Volume 5: The Actinobacteria Originally published by Williams & Wilkins, 1984 2nd ed. 2012, 1750 p. 297 illus.

ZHANG L, FOXMAN B, MARRS C: Both Urinary and Rectal Escherichia coli Isolates Are Dominated by Strains of Phylogenetic Group B2. **Journal Clinical Microbiology** 40:3951-3955, 2002.

Tabelas

	Animais	Matrizes	Jovens até 90 dias
Média	36/16	21/14	5/1,5
Máximo	104/87	70/87	25/5
Mínimo	¾	1/2	2/1

Tabela 1 - Número médio de Caprinos e Ovinos, matrizes e animais jovens até 90 dias. Caprinos/Ovinos

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Óbitos	3	0	6	3	3	3	5	4	1
Controle	A	N	A	T	M	T	T	T	T

A (anual), T (trimestral), M (mensal), N (não realiza)

Tabela 2 – Número de óbitos por propriedade e método de controle parasitário.

	SIM	NÃO
Incentivo Governo	2 (22%)	7 (78%)
Padrão Zootécnico	5 (55%)	4 (45%)
Orientação Veterinária	3 (33%)	6 (67%)
Satisfação com criação	8 (88%)	1 (12%)

Tabela 3 – Caracterização das propriedades quanto se recebe incentivo do governo, padrão zootécnico no rebanho, orientação veterinária e satisfação com a criação.

Figura

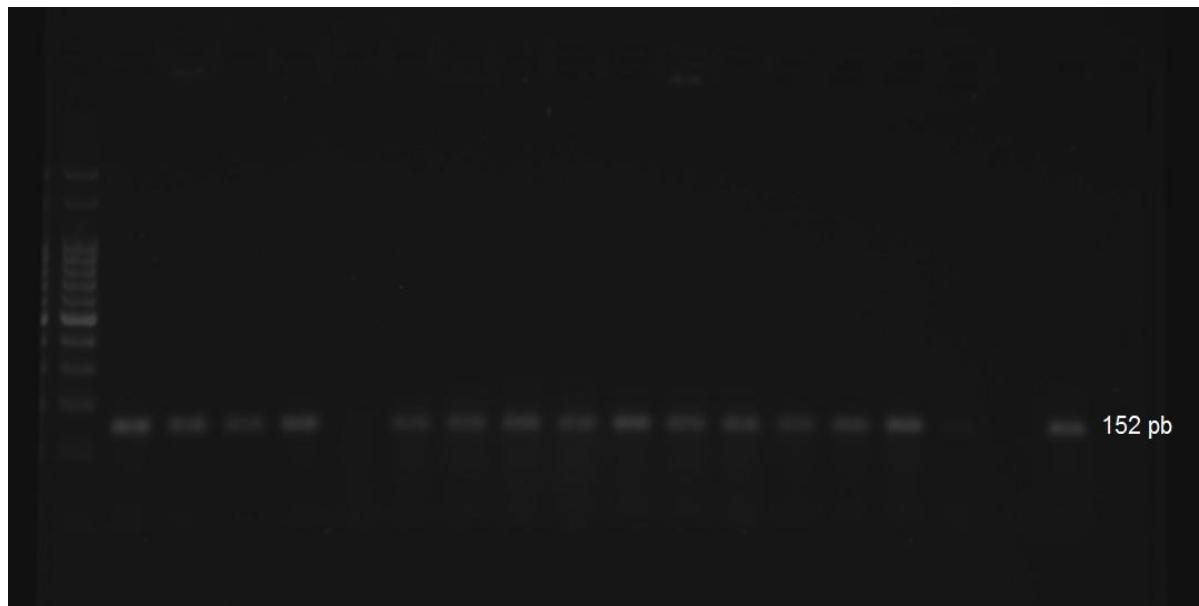


Figura 01 – Gel eletroforese de amostras de *E. coli* de fezes diarréicas de caprinos para detecção do gen TspE4C2.1, nas 15 amostras positivas para este gen.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação epidemiológica e o diagnóstico laboratorial de diarreias em caprinos e ovinos neonatos é de fundamental importância para identificar quais os agentes etiológicos estão envolvidos na cadeia epidemiológica das infecções do trato gastrintestinal nessas espécies em propriedades que desenvolvem a caprinovinocultura no estado da Paraíba e estes dados proporcionarão parâmetros para futuras pesquisas nas espécies estudadas.

A caracterização dos agentes etiológicos será um referencial dos patógenos específicos e servirá como base para que a assistência veterinária utilize antimicrobianos específicos e mais eficazes, reduzindo, desta forma, a utilização de outros fármacos e consequentemente a resistência antimicrobiana, protegendo o meio ambiente e garantido alimento saudável para a população.

A ausência da infecção por Rotavirus nos animais investigados não configura, necessariamente, a inexistência deste patógeno nas diarreias em caprinos e ovinos neonatos no estado da Paraíba, tendo em vista o registro e a proximidade de casos humanos com criatórios rurais na Paraíba. A longa estiagem modificou o perfil do plantel e certamente dificultou a ocorrência de estações de montas e épocas de nascimentos com perda na quantidade de amostras diarréicas por óbitos e falta de neonatos nas propriedades visitadas.

Os estudos sanitários e epidemiológicos realizados em propriedades que desenvolvem a caprinovinocultura são de fundamental importância para subsidiar boas práticas de manejo nestas espécies. Desta forma, contribuir para um melhor aproveitamento do rebanho de caprinos e ovinos do Estado da Paraíba.

Referências Bibliográficas

- ALENCAR, S.P.; MOTA, R.A.; NASCIMENTO, S.A.; COELHO, M.C.O.C.; ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira.**, v.11, p.131-140, 2010.
- AN, H. et al. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing Escherichia coli and characterization of eae, espA, espB and espD genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. **Microbial Pathogenesis**, v. 28, n. 5, p. 291-300, may., 2000.
- BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; MELO, L.S.S.; MELO, C.B.; AZEVEDO, E.O. Características de produção da caprinocultura leiteira na região do Cariri na Paraíba. **Ciência Veterinária Tropical**, v.10, p.29-35, 2007.
- BEAUDRY, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of Escherichia coli isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 34, n. 1, p. 144-148, jan., 1996.
- BERTSCHINGER, H. U.; FAIRBROTHER, J. M. Escherichia coli infections. In: STRAW, B.E. **Diseases of swine**. Iowa: Iowa State University Press, 1999. Cap. 32, p. 431-468.
- BERRÍOS, E.P.; NUNEZ, S.F.; CELEDON, V.M.O.; FIEGEHEN, C.P.; SANTIBANEZ, Z.M.C. Detection of rotavirus in goats in San Jose de Maipo, metropolitan region, Chile. **Avances-en-Ciencias-Veterinarieas**, v.3, p.98-101, 1988.
- BLATTNER, F. R. et al. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. **Science**, New York, USA, v. 277, n. 5331, p.1453-1461, sept., 1997.
- BONACORSI, S. P. P., O. CLERMONT, C. TINSLEY, I. LE GALL, J. C. BEAUDOIN, J. ELION, X. NASSIF, AND E. BINGEN. Identification of regions of the Escherichia coli chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infectum Immunologic**. 68: 2096–2101, 2000.
- BRENNER, D. J. et al. Polynucleotide sequence relatedness among Shigella species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, England, v. 23, p. 1-7, jan., 1973.
- BRITO, B. G. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de E. coli uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 34, n. 2, p. 645-652, mar./abr., 2004.

BUZINARO, M.G.; SAMARA, S.I.; CARVALHO, A.A.B.; PONTES, J.V.; SALLES, R.; SILVA, D.G. Detecção e isolamento de rotavírus caprino do grupo A. **Arq. Inst. Biol.**, v.78, p.301-304, 2011.

CALDAS, E.M.; SANTANA, A.F.; CAETANO, A.L.S.; Estudo da ovinocaprinocultura na região Nordeste do Estado da Bahia. **Arquivo Escola Medicina Veterinária**, v.12, p.1-98, 1989.

CARVALHO, V. M. et al. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (SPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 41, n. 3, p. 1225-1234, 2003.

CHAO, K. L.; DREYFUS L. A. Interaction of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, USA, v. 65, p. 3209–3217, aug., 1997.

CLERMONT, O; BONACORSI, S; BINGEN, E: Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Appl Environ Microbiol** 66:4555- 4558, 2000.

COSTA, M. M. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 39, p. 1-6, 2008.

DOUGAN, G. et al. The *Escherichia coli* gene pool. **Current Opinion in Microbiology, England**, v. 4, n. 1, p. 90-94, 2001.

ELAD, D.; BRENNER, A.; MARKOVICS, B.; YAKOBSON, S.; SHLOMOVITZ, S.; BASAN, J. Yeasts in the gastrointestinal tract of preweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. **Mycopathologia**, v.141, p.7-14, 1998.

FILGUEIRA, T.M.B.; AHID, S.M.M.; SUASSUNA, A.C.D.; SOUZA, W.J.; FONSECA, Z.A.A.S. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na região da chapada do Apodi. **Revista Verde**, v.4, p.64-67, 2009.

GALINDO-CARDIEL, I.; FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M.; LUJÁND, L.; BUESA, L.; ESPADA, J.; FANTOVA, E.; BLANCO, J.; SEGALÉS, J.; BADIOLA, J.J. Novel group A rotavirus G8P[1] as primary cause of an ovine diarrheic syndrome outbreak in weaned lambs. **Veterinary Microbiology**, v.149, p.467-471, 2011

GARG, A. X. et al. Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, USA, v. 290, p. 1360-1370, 2003.

GERBER, A. et al. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic–uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: A prospective study. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 186, p. 493-500, aug., 2002.

GHOSH, S.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; TALUKDAR, R.I.; PAUL, S.K.; KOBAYASHI, N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. **Journal Genetic Virology**, v.91, p.2367-2373, 2010.

HENTON, M. M.; HUNTER, P. E. *coli* infections. In: COETZER, J. A. W. et al. *Infectious Diseases of Livestock*. **Oxford University Press**, 1994. p.1085-1099.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal Clinic Microbiology**, v.16, p.473-477, 1982.

HERZER, P. J. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/Tabela/protabl.asp?z=t&o=12&i=P>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

_____. Censo agropecuário, 2006. Disponível em : <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

JANKE, B.H. Symposium on neonatal calf diarrhea. **Veterinary Medicine**, v.84, p.803-810, 1989.

JOHNSON, J. R. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 183, p. 78-88, jan., 2001.

LECOINTRE, G. *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. **Molecular Biology and Evolution**, USA, v. 15, n. 12, p. 1685-1695, 1998.

KARMALI, M. et al. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **The Journal of infectious diseases**, USA, v. 151, p. 775–782, may, 1985.

LIMA, E. O. Aspectos zoossanitários, zootécnicos, históricos e sócio-econômicos da caprinocultura em Pernambuco, Brasil. Recife: **Delegacia Federal de Agricultura em Pernambuco**, n.1, p.59, 1979.

MILLS, M.; PAYNE, S. Genetics and regulation of haem iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, USA, v. 177, n. 11, p. 3004-3009, jun., 1995.

NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL - ONUBR, 2013. Disponível em: <<http://www.onu.org.br/pior-seca-dos-ultimos-50-anos-no-nordeste-brasileiro-confirma-estatisticas-da-onu-sobre-escassez/>>. Acesso em: 02 fev. 2014.

NAKAZATO, G. et al. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 101, n. 4, p. 269-277, aug., 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, USA, v.11, n. 1, p. 142-201, jan., 1998.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.52, p.110-117, 2000.

SABATÉ M, MORENO E, PÉREZ T, ANDREU A, PRATS G: Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinic Microbiology Infection** 12:880–886, 2006.

SANTOS, T.C.P.; ALFARO, C.E.P.; FIGUEIREDO, S.M. Aspectos sanitários e de manejo em criações de caprinos e ovinos na microrregião de Patos, região semi-árida da Paraíba. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.206-212, 2011.

SARIDAKIS, H. O. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 54, n. 2, p. 145-153, feb., 1997.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e Patologia Suína**, 2 ed. Goiânia: J. Sobestiansky, 1999. 464 p.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**, 1 ed., Goiânia: Cânone Editorial, 2007. 770 p.

SOUZA-NETO, J. Características gerais da caprinocultura leiteira do Estado de Pernambuco. EMBRAPA-CNPC – **Boletim de pesquisa**, v.4, 1987.

STRAW, B. E. et al. **Disease of swine**, 8 ed.. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999. 1209 p.

TENG, L. J. et al. Genetic detection of diarrheagenic Escherichia coli isolated from children with sporadic diarrhea. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, China, v. 37, n. 6, p. 327-334, jun., 2004.

TOTH, I. et al. Transduction of porcine enteropathogenic Escherichia coli with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 69, n. 12, p. 7242-7247, dec., 2003.

WANI, S.A.; BHAT, M.A.; SAMANTA, I.; ISHAQ, S.M.; ASHRAFI, M.A.; BUCHH, A.S. Epidemiology of diarrhoea caused by rotavirus and Escherichia coli in lambs in Kashmir valley, India. **Small Ruminant Research**., v.52, p.145-153, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1

NORMAS DA REVISTA SMALL RUMINANT RESEARCH

Article structure Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organized in the following order:

- Abstract • Keywords (indexing terms), normally 3-6 items •Introduction • Material studied, area descriptions, methods, techniques • Results • Discussion • Conclusion • Acknowledgment and any additional information concerning research grants, etc. • References Essential title page information • Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. • Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. • Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address.

Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. Abstract A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Nomenclature and units Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information. Authors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. Math formulae Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ¹⁸O. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full.

Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅). Footnotes Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. Table footnotes Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork Electronic artwork General points • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Embed the used fonts if the application provides that option. • Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar. • Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files. • Provide captions to illustrations separately.

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version. • Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. Formats If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi. Please do not: • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors; • Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content. Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations. Figure captions Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Tables Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. References Web references As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. Reference style Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated

(Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith , R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. Video data Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. AudioSlides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity

to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper. Supplementary data Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high- resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

ANEXO 2**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**

Protocolo CEUA N° 10/5/2012

APÊNDICES

PROJETO ROTAVIROSE
Laboratório de Virologia Veterinária – CCA/LVV – UFPB
QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO – CAPRINOS E OVINOS

Cidade: _____ Propriedade nº _____

Data: ____ / ____ / ____

Proprietário: _____ Fone: _____

1) N° de Caprinos _____ 2) N° de matrizes _____ 3) Jovens até 90 dias: _____

4) N° de Ovinos _____ 5) N° de matrizes _____ 6) Jovens até 90 dias: _____

7) Aptidão do rebanho? () Leite () Carne () Dupla aptidão

8) Tipo de alimentação: _____

9) Teve caso de diarreia nos últimos 6 meses: () Sim () Não

10) Quantidade de óbitos no período: _____

11) Época em que apareceram: () Seco () Chuvoso () Todo ano

12) Como resolveu o problema: () Sem tratamento () Tratando

13) Qual produto? _____ Teve veterinário: () Sim () Não

14) Usa vermífugo frequente: () Mensal () Trimestral () Semestral () Anual

15) Qual produto? _____ Teve veterinário: () Sim () Não

16) Possui incentivo do governo: () Sim () Não

17) Quanto gasta por mês com rebanho? _____

18) Quanto ao lucro? () Mensal () Semestral () Anual

19) Possui animal com características zootécnicas: () Sim () Não

20) Tem ou teve orientação técnica Para criação: () Sim () Não

21) Esta satisfeito com a criação: () Sim () Não