Identificação de fatores de virulência de isolados de *Escherichia coli* oriundos de fezes de bezerros na região Sul do Brasil

Identification of Virulence Factors of *Escherichia coli* Isolates from Fecal Samples of Calves in Southern Brazil

Sergio Farias Vargas Júnior^{1,6}, Rodrigo Casquero Cunha², Daniela Isabel Brayer Pereira³,
Sônia de Ávila Botton⁴, Sílvia Regina Leal Ladeira⁵, Thomaz Lucia Júnior⁶ & Eliza Simone Viegas Sallis⁵

ABSTRACT

Background: *Escherichia coli* (*E. coli*) is an enteropathogen that commonly causes diarrhea in calves. However, not all *E. coli* isolates are pathogenic. The aim of this study was to identify *E. coli* virulence factors derived from fecal samples collected in the southern region of Rio Grande do Sul state (RS) from calves with and without diarrhea, as well as investigate the antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolates from calves with diarrhea.

Materials, Methods & Results: Forty stool samples were collected in 12 farms, each one from calves having one day to six months of age, with and without diarrhea. The total DNA of from these isolates was extracted and a PCR using primers specific for the virulence factors Stx1, Eae, F41, F5 and STa was conducted. The susceptibility testing used the disk diffusion method and the susceptibility profile was evaluated against the following antimicrobials: ampicillin, penicillin, chloramphenicol, enrofloxacin, gentamicin, trimethoprim, sulfonamide, tetracycline and streptomycin. From all calves, 15 (15/40, 37.5%) had diarrheal stools and 25 (25/40, 62.5%) had normal or semi-liquid stools. Twelve (12/40; 30%) *E. coli* isolates showed at least one virulence factor. These factors were found in four isolates (4/15; 26.6%) from diarrheal stools and eight isolates (8/25; 28.5%) from normal stool. The Stx1 factor was identified in five isolates (5/40; 12.5%), and the Eae and the Sta factors in one (1/40; 0.2%) and in atypical associations between Stx1 and Eae and also between Eae and F41 in two isolates (2/40; 0.5%). Also, the Eae and Sta factors were identified in one isolate (1/40; 0.2%). The susceptibility test showed resistance to penicillin and tetracycline in 93% and 80% of the tested isolates, respectively.

Discussion: The identification of virulence factors is necessary because *E. coli* is an enterobacterium present in calves gastrointestinal tract, to prove its pathogenicity. The virulence factor most commonly found in *E. coli* isolates derived from feces of calves with and without diarrhea in the southern region of the RS was the Stx1 (Shiga toxin-producing *E. coli* STEC). It is likely that the highest occurrence of *E. coli* isolates positive for the Stx1 virulence factor was due to the fact that cattle were the main reservoirs of this type of bacteria. The occurrence of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) in animals of nine and 34 days of life, respectively, is highlighted. Studies have shown that contamination of animal foods with EHEC can cause enteric disorders, hemorrhagic colitis, and uremic hemolytic syndrome (UHS) in humans. Although in the present study the identification of the Stx2 factor was not performed, authors describe that the presence of the genes encoding Stx2 and Eae is determinant in the occurrence of UHS. In the susceptibility test, it was observed that *E. coli* isolates from diarrheal stools showed resistance to antimicrobials penicillin (10 mg) and tetracycline (30 mg) [93% and 80%, respectively], ampicillin (10 mg) [47%], streptomycin (10 mg) [47%], trimethoprim (5 mg) [47%] and sulfonamide (300 mg) [53%]. Although the percentage of antimicrobial resistance varies among studies, it is believed that the indiscriminate use of antimicrobial therapies as a common practice among rural properties contributes to bacterial resistance to these drugs. The sensitivity profile to antimicrobials showed that the analyzed *Escherichia coli* isolates are resistant to the antimicrobials commonly used for diarrhea treatment in the southern region of the Rio Grande do Sul state, Southern Brazil.

Keywords: cattle diseases, antimicrobial susceptibility testing (AST), molecular diagnostics, productive chain of cattle, economic losses.

Descritores: doenças de bovinos, teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA), diagnóstico molecular, cadeia produtiva de bovinos, perdas econômicas.

Received: 4 March 2017

Accepted: 23 July 2017

Published: 18 August 2017

¹Programa de Pós-graduação em Veterinária, ²Laboratório de Bacteriologia, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) & ³Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia (IB), Universidade federal de Pelotas (UFPeL), Pelotas, RS, Brazil. ⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. ⁵Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) & ⁶Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPel), UFPeL, Pelotas. CORRESPONDENCE: S.F. Vargas Júnior [juniorfvargas@hotmail.com - Tel.: +55 (53) 3275-7188]. Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Campus Universitário s/n. CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

Diarreia em bezerros é uma das principais causas de perdas econômicas na bovinocultura [28]. Dentre suas etiologias, *Escherichia coli* (*E. coli*) é o enteropatógeno mais descrito ligado à doença [9,15]. A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é mundialmente descrita como causa de diarreia neonatal em bovinos, todavia *E. coli* enteropatogênica (EPEC) também pode estar envolvida na enfermidade em bezerros [3,13].

O patotipo ETEC possui dois fatores de virulência (fímbrias) que facilitam sua ligação ao epitélio intestinal que são F5(K99) e F41 e a produção de uma toxina termoestável (Stx) responsável pela hipersecreção no lúmen intestinal [19]. A EPEC possui a proteína de membrana intimina (Eae) que faz a ligação da bactéria ao enterócito determinando uma lesão na célula intestinal. *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) produz dois tipos de toxinas (Stx1 e Stx2). *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) produz tanto as toxinas (Stx1 e Stx2) quanto intimina (Eae) e podem causar gastroenterites hemorrágicas e a síndrome hemolítica urêmica em humanos [10].

A técnica de reação em cadeia de polimerase (PRC) é empregada para a identificação desses fatores por ser uma técnica rápida, específica e sensível. Vários estudos identificaram fatores de virulência em fezes de bezerros com e sem diarreia [3,13], cordeiros [4], leitões [2] e no homem [20]. No entanto, no Rio Grande do Sul, estes estudos são escassos.

Este estudo objetivou identificar os fatores de virulência de *E. coli* patogênica em amostras de fezes de bezerros com e sem diarreia na região Sul do Rio Grande do Sul (RS) e avaliar a suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Escherichia coli* dos animais com diarreia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de fezes de 40 bezerros, 21 da raça Holandesa e 19 da raça Jersey, de um dia a seis meses de idade, com diarreia (n = 15) e sem diarreia (n = 25), foram coletadas em 12 propriedades da Região Sul do RS, Brasil. As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal, armazenadas em sacos plásticos e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas. Cada amostra foi diluída em solução salina 0,85% (1:4) e subsequentemente submetida a cinco diluições seriadas. Um volume de 100 µL de cada diluição foi semeado em placas de Petri contendo agar Mac Conkey e incubadas por 16-24 h a 37°C. Realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e as placas que apresentavam de 20-50 colônias bacterianas, lactose positiva, foram selecionadas

para extração de DNA total. Para isto, a superfície do agar foi inundado com 2 mL de solução salina 0,85% e as colônias homogeneizadas por 30 s com movimentos circulares da placa sobre uma superfície para obtenção de um *pool*. Um mL do sobrenadante foi coletado e a extração do DNA total foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio [26]. PCR foram realizadas separadamente para os fatores de virulência Stx1, Eae, F41, K99 e Stx (Tabela 1) de *E. coli*, conforme previamente descrito por Andrade *et al.* [3], com modificações. A PCR foi realizada com os seguintes reagentes: 5 ng/µL (1 µL) de DNA template, 5 pmol/µL (1 µL) de cada *primer*, Taq polimerase e os demais constituintes contidos em 12,5 µL da enzima (GoTaq® Colorless Master Mix)¹ e água ultrapura qsp 25 µL; e nas seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação de 99°C / 3 min, seguidos de 35 ciclos de amplificação de 94°C / 45 s, 51,5°C / 45 s e 71°C / 45 s. Como controle positivo foram incluídos as cepas padrão de *E. coli* B41 (O101: H–: F41+, F5+, STa+) e EDL 933 (O157: H7: Stx1+, Stx2+, eae+). Como controle negativo foi utilizado água ultrapura da grade de PCR. As amostras foram corridas em gel de agarose 1,5%, coradas com Gel Red e reveladas com luz UV.

O teste de suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos (TSA) empregou o método de difusão em disco [5]. Os isolados provenientes de fezes diarreicas (n = 15) foram avaliados frente aos seguintes grupos de fármacos antibacterianos: beta-lactâmicos (ampicilina 10 mg e penicilina 10 mg), aminoglicosídeos (gentamicina 10 mg e estreptomicina 10 mg), quinolonas (enrofloxacin 5 mg) trimetopim (5 mg), sulfonamida (300 mg), cloranfenicol (30 mg) e tetraciclina (30 mg).

RESULTADOS

Dos quarenta animais, quinze (15/40; 37,5%) apresentaram fezes diarreicas e 25 (25/40; 62,5%) fezes normais ou amolecidas. Das amostras analisadas, 30% (12/40) apresentaram ao menos um fator de virulência e em 70% (28/40) não foi encontrado nenhum dos fatores avaliados. Os fatores de virulência foram encontrados em 26,6% (4/15) de fezes diarreicas e em 32% (8/25) de fezes não diarreicas (Tabela 2). O fator Stx1 (STEC) foi identificado em cinco (5/40) isolados (12,5%), Eae (EPEC) e Stx em 2,5% (1/40), Stx1 e Eae (EHEC); Eae e F41 em dois (2/40; 5%) e Eae e Stx em um (1/40) isolado (2,5%) [Tabela 2].

Os resultados do perfil de suscetibilidade dos 15 isolados de *Escherichia coli* oriundas de fezes de bezerros com diarreia estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 1. Primers empregados nas reações de PCR para identificação de fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* oriundas de fezes de bezerros com e sem diarreia.

Primer	Sequência dos primers 5'–3'	Fator investigado (Tamanho amplicon)
Stx1 (F)	TTC GCT CTG CAA TAG GTA	Stx1 (555 pb)
Stx1 (R)	TTC CCC AGT TCA ATG TAA GAT	
Eae (F)	ATA TCC GTT TTA ATG GCT ATC T	Eae (425 pb)
Eae (R)	AAT CTT CTG CGT ACT GTG TTC A	
F41 (F)	GCA TCA GCG GCA GTA TCT	F41 (380 pb)
F41 (R)	GTC CCT AGC TCA GTA TTA TCA CCT	
K99(F5) (F)	TAT TAT CTT AGG TGG TAT GG	K99 (314 pb)
K99(F5) (R)	GGT ATC CTT TAG CAG CAG TAT TTC	
Sta (F)	GCT AAT GTT GGC AAT TTT TAT TTC TGT A	Sta (190 pb)
Sta (R)	AGG ATT ACA ACA AAG TTC ACA GCA GTA A	

Andrade *et al.* [3].

Tabela 2. Fatores de virulência identificados em isolados de *Escherichia coli* oriundos de fezes de bezerros com e sem diarreia.

Fator	Com diarreia (15/40)	Sem diarreia (25/40)	Amostras + (12/40)	Porcent. + (x/40)
Stx1 (STEC)	1	4	5	12,5%
Eae (EPEC)	-	1	1	2,5%
F41	-	-	0	0,0%
K99	-	-	0	0,0%
Sta	1	-	1	2,5%
Stx1 e Eae	-	2	2	5,0%
(EHEC)	-	-	-	-
Eae e F41	2	-	2	5,0%
Eae e Sta	-	1	1	2,5%
Total	4/15(26,6%)	8/25(32%)		12/40(30%)

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Escherichia coli* (n = 15) oriundos de fezes de bezerros com diarreia.

Classe	Antimicrobiano	Resistente	Sensível	Intermediário
Beta lactâmicos	Ampicilina	7/15(47%)	8/15(53%)	0/15(0%)
	Penicilina	14/15(93%)	0/15(0%)	1/15(7%)
Aminoglicosídeos	Gentamicina	4/15(27%)	11/15(80%)	0/15(0%)
	Estreptommicina	7/15(47%)	7/15(47%)	1/15(7%)
Quinolonas	Enrofloxacina	3/15(20%)	12/15(80%)	0/15(0%)
Outros	Trimetropim	7/15(47%)	8/15(53%)	0/15(0%)
	Sulfonamida	8/15(53%)	7/15(47%)	0/15(0%)
	Cloranfenicol	3/15(20%)	12/15(80%)	0/15(0%)
	Tetraciclina	12/15(80%)	3/15(20%)	0/15(0%)

DISCUSSÃO

O prejuízo econômico causado pela diarreia gira em torno de 20% a 52%, com custos totais em relação a doenças entéricas equivalentes a US\$ 33,46 bezerro/ano e com mortalidade podendo chegar até 34% [16]. Neste contexto, *E. coli* é descrita como uma das principais causas de diarreia de etiologia bacteriana em bezerros no mundo [3,6-8,25]. Entretanto, a identificação de fatores de virulência é necessária, pois a *E. coli* é uma enterobactéria presente no trato gastrointestinal de bezerros, para comprovação de sua patogenicidade. Desta forma, estudos prévios têm relatado o emprego de PCR para a identificação dos fatores de virulência Eae, Stx1, Stx2, Sta, F41 e F5(K99) em isolados de *E. coli* oriundos de fezes de bezerros [3,13,25] evidenciando que esses fatores de virulência podem estar presentes em isolados de *E. coli* oriundos de fezes com e sem diarreia. Os fatores de virulência podem ser encontrados isoladamente ou em associação, o que caracteriza os diferentes patótipos de *E. coli* [8].

No presente estudo, o fator de virulência Stx1 foi o de maior ocorrência, sendo identificado em 58% (7/12) dos isolados que apresentaram ao menos um fator de virulência, sendo apenas um (1/7) proveniente de fezes de bezerros com diarreia. Evidenciou-se que Stx1 foi encontrado isoladamente em cinco isolados (5/12), o que caracterizou o patótipo STEC e em dois isolados (2/7) em associação com Eae, caracterizando o patótipo EHEC. Previamente, Andrade *et al.* [3] ao avaliarem fezes de bezerros em Minas Gerais, demonstraram que Stx1 ocorreu em 82,8% dos isolados de *E. coli* positivos para ao menos um fator de virulência. Em outro estudo, avaliando bovinos de corte saudáveis, 57% dos isolados de *E. coli* obtidos das fezes eram STEC [12]. Similarmente, no Rio Grande do Sul, Timm *et al.* [27] ao estudar amostras de fezes de bovinos de corte em abatedouros encontraram que 39% das amostras eram positivas para pelo menos um fator de virulência de STEC. É provável que a maior ocorrência de isolados de *E. coli* positivos para o fator de virulência Stx1 tenha ocorrido pelo fato dos bovinos serem os principais reservatórios deste tipo de bactéria [19]. Este patótipo foi encontrado em animais de cinco dias até seis meses de idade, o que demonstra a grande ocorrência deste tipo de bactérias como integrante da flora intestinal. Os dados acima descritos demonstram que *E. coli* produtoras de Shiga toxina (Stx) estão co-

mumente presentes em fezes de bovinos e nem sempre estão associados a quadros clínicos de diarreia.

O segundo fator de virulência mais encontrado neste estudo foi Eae, tanto isoladamente, como em associações atípicas, conforme descrito na Tabela 2. Estudos têm demonstrado a presença de Eae tanto isoladamente quanto em associação com outros fatores de virulência em fezes de bezerros com e sem diarreia [1,3,27]. Em um estudo realizado na Índia, 9,73% dos isolados de *E. coli* em fezes de bezerros com diarreia foram EPEC [29]. No presente estudo, a EPEC foi encontrada em somente uma amostra de bezerro sem diarreia. A atribuição de patogenicidade da EPEC é contestável, uma vez que esta bactéria é frequentemente encontrada em animais sadios [3,14].

Ressalta-se a ocorrência de dois isolados (2/12) caracterizados como o patótipo EHEC (Stx1 e Eae) em animais de nove e 34 dias de vida, respectivamente. Estudos mostram que a contaminação de alimentos de origem animal com EHEC pode causar distúrbios entéricos, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) no homem [18,23]. Embora no presente estudo não tenha sido realizada a identificação do fator Stx2, autores descrevem que a presença dos genes que codificam Stx2 e Eae seja determinante na ocorrência de SHU [11]. Em apenas dois isolados (2/40; 5%) foi identificado o fator de virulência F41 em associação atípica com Eae em amostras de fezes diarreicas. Adicionalmente, o fator de virulência Sta ocorreu isoladamente em um isolado de *E. coli* (1/40; 2,5%) e em associação atípica com Eae em outro (1/40; 2,5%) [Tabela 2]. A identificação de associações atípicas entre estes fatores de virulência tem sido descrita em bezerros com e sem diarreia [3,13,24,25]. A presença do fator de virulência F5(K99) não foi observada em nenhuma das amostras analisadas. Estes dados diferem de estudos que encontraram Sta, F41 e K99 em 67,4% de isolados de *E. coli* de fezes de bezerros [17,21] que relataram a presença dos fatores de virulência K99, F41 e Sta em 18,9%, Stx1 em 13,5%, Stx2 em 5,4% e Eae em 8,1% de isolados de *E. coli* avaliados.

No TSA observou-se que os isolados de *E. coli* oriundos de fezes diarreicas evidenciaram resistência aos antimicrobianos penicilina (10 mg) e tetraciclina (30 mg) [93% e 80%, respectivamente], ampicilina (10 mg) [47%], estreptomicina (10 mg) [47%], trimetropim (5 mg) [47%] e sulfonamida (300 mg) [53%]. Estes resultados são similares aos relatados por Rigobelo

et al. [24] que detectaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos em 100% dos isolados de *E. coli* provenientes de fezes diarreicas de bezerros leiteiros do estado de São Paulo. Esses autores identificaram que as maiores resistências ocorreram frente à cefalotina e tetraciclina (46,1% e 45,7%, respectivamente). Adicionalmente, Oliveira Filho et al. [22] relataram resistência à tetraciclina (30,4%) e à ampicilina (31,9%) em isolados de *E. coli* provenientes de fezes de bezerros Nelore criados extensivamente no estado do Mato Grosso. Embora se constate que o percentual de resistência aos antimicrobianos varie entre os estudos, acredita-se que o uso indiscriminado de terapias antimicrobianas como prática comum entre as propriedades rurais, contribua para a resistência bacteriana aos fármacos.

Interessantemente, na Região Sul do RS, a penicilina e a tetraciclina são os fármacos mais utilizados pelos produtores. Provavelmente por este motivo os elevados índices de resistência frente a estes antimicrobianos tenham sido evidenciados no presente estudo.

CONCLUSÕES

O fator de virulência mais encontrado nos isolados de *Escherichia coli* oriundos de fezes de bezerros, com e sem diarreia, na região Sul do RS foi o Stx1 (STEC). Adicionalmente, a presença dos patótipos EPEC e EHEC em fezes de bezerros sem diarreia evidencia que estes animais podem albergar patótipos de *E. coli* de relevância para a saúde humana e animal. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos evidencia que os isolados de *E. coli* analisados apresentam resistência aos antimicrobianos mais comumente empregados para o tratamento de diarreias na região Sul do RS.

MANUFACTURER

¹Promega Corporation. Madison, WI, USA.

Acknowledgements. A equipe do Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann que gentilmente cedeu às cepas de *E. coli* B41 e EDL 933.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Aida L., Penteado A.S., Trabulsi L.R., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J. & Pestana de Castro A.F. 2000. Subtypes of intimin among non-toxigenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in Brazil. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 64: 15-20.
- 2 Alustiza F.E., Picco N.Y., Bellingeri R.V., Terzolo H.R. & Vivas A.B. 2012. Frequency of virulence genes of *Escherichia coli* among new born piglets from an intensive pig farm in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 44: 250-254.
- 3 Andrade G.I., Coura F.M., Santos E.L.S., Ferreira M.G., Galinari G.C.F., Facury Filho E.J., de Carvalho A.U., Lage A.P. & Heinemann M.B. 2012. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 44: 1783-1790.
- 4 Bandyopadhyay S., Mahanti A., Samanta I., Dutra T.K., Ghosh M.K., Bera A.K., Bandyopadhyay S. & Bhattacharya D. 2011. Virulence repertoire of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) from diarrhoeic lambs of Arunachal Pradesh, India. *Tropical Animal Health and Production*. 43: 705-710.
- 5 Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.
- 6 Chandra M., Cheng P., Rondeau G., Porwollik S. & McClelland M. 2013. A Single Step Multiplex Pcr for Identification of Six Diarrheagenic *E. Coli* Pathotypes and Salmonella. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(4): 210-216.
- 7 Cho Y.I., Han J.I., Wang C., Cooper V., Schwartz K., Engelken T. & Yonn K.J. 2013. Case-Control Study of Microbiological Etiology Associated with Calf Diarrhea. *Veterinary Microbiology*. 166(3-4): 375-385.
- 8 Coura F.M., Lage A.P. & Heinemann M.B. 2014. Patótipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(9): 811-818.
- 9 De la Fuente R., Garcia A., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Luzon M., Cid D., Garcia S., Orden J.A. & Gomez-Bautista M. 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 36: 145-152.
- 10 Debroy C. & Maddox C.W. 2001. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Animal Health Research Reviews*. 2: 129-140.

- 11 Ethelberg S., Olsen K.E., Scheutz F., Jensen C., Schiellerup P., Enberg J., Petersen A.M., Olesen B., Gerner-Smidt P. & Molbak K. 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 10: 842-847.
- 12 Farah S.M.S.S., de Souza E.M., Pedrosa F.O., Irino K., da Silva L.R., Rigo L.U., Steffens M.B.R., Pigatto C.P. & Fadel-Picheth C.M.T. 2007. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, Southern Brazil. *Letters in Applied Microbiology*. 44: 607-612.
- 13 Franck S.M., Bosworth B.T. & Moon H.W. 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 1795-1797.
- 14 Foster D.M. & Smith G.W. 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 25: 13-36.
- 15 Gyles C.L. & Fairbrother J.M. 2010. *Escherichia coli*. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th edn. Iowa: Wiley-Blackwell, pp.267-309.
- 16 Kaneene J.B. & Hurd H.S. 1990. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. *Preventive Veterinary Medicine*. 8: 127-140.
- 17 Mainil J.G., Bex F., Jacquemin E., Pohl P., Couturier M. & Kaeckenbeeck A. 1990. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesion subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 51: 187-190.
- 18 Mittelstaed S. & Carvalho V.M. 2006. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 – revisão. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*. 24(3): 175-82.
- 19 Moxley R.A. & Smith D.R. 2010. Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 26: 29-56.
- 20 Nguyen T.V., Van P.L., Huy C.L., Gia K.N. & Weintraub A. 2005. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(2): 755-760.
- 21 Ok M., Güler L., Turgut K., Ok Ü., Sen I., Gündüz I.K., Birdane M.F. & Güzelbektes H. 2009. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*. 56: 94-101.
- 22 Oliveira Filho J.P., Silva D.P.G., Pacheco M.D., Mascarini L.M., Ribeiro M.G., Alfieri A.A., Alfieri A.F., Stipp D.T., Barros B.J.P. & Borges A.S. 2007. Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 27(10): 419-424.
- 23 Reising A., Hafer C., Hiss M., Kielstein J.T., Menne J., Gueler F., Beneke J., Linnenweber-Held S., Haller H. & Einecke G. 2016. Ultrasound findings in EHEC-associated hemolytic-uremic syndrome and their clinical relevance. *International Urology and Nephrology*. 48: 561-570.
- 24 Rigobelo E.C., Gamez H.J., Marin J.M., Macedo C., Ambrosin A.J. & Ávila F.A. 2006. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58(3): 305-310.
- 25 Salvadori M.R., Valadares G.F., Leite D.S., Blanco J. & Yano T. 2003. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34: 230-235.
- 26 Sambrook J. & Russell D. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2100p.
- 27 Timm C.D., Irino K., Gomes T.A.T., Vieira M.M., Guth B.E.C., Vaz T.M.I., Moreira C.N. & Aleixo J.A.G. 2007. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*. 44: 419-425.
- 28 Tzipori S. 1981. The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. *Veterinary Record*. 108: 510-514.
- 29 Wani S.A., Bhat M.A., Samanta I., Nishikawa Y. & Buchh A.S. 2003. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhea in India. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 121-126.