

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**GENES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE  
A EXTRATOS VEGETAIS DE ISOLADOS DE *Escherichia  
coli* ENTEROTOXIGÊNICAS (ETEC), SHIGATOXIGÊNICAS  
(STEC) e ENTEROPATOGENICAS (EPEC) EM BEZERROS**

**Juliana da Silva Menezes Azola**

Bióloga

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**GENES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE  
A EXTRATOS VEGETAIS DE ISOLADOS DE *Escherichia  
coli* ENTEROTOXIGÊNICAS (ETEC), SHIGATOXIGÊNICAS  
(STEC) e ENTEROPATOGENICAS (EPEC) EM BEZERROS**

**Juliana da Silva Menezes Azola**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

**2016**

A996g Azola, Juliana da Silva Menezes  
Genes de virulência e perfil de susceptibilidade a extratos vegetais de isolados de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC), shigatoxigênicas (STEC) e enteropatogênicas (EPEC) em bezerros / Juliana da Silva Menezes Azola. -- Jaboticabal, 2016  
xiv, 62 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Fernando Antônio de Ávila

Banca examinadora: Luiz Carlos do Nascimento, Roberta Hilsdorf Piccoli, Hélio José Montassier, Karina Paes Bürger

Bibliografia

1. Colibacilose. 2. Enterobactérias. 3. PCR. 4. *Salvia officinalis* L. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: GENES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A EXTRATOS VEGETAIS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICAS (ETEC), SHIGATOXIGÊNICAS (STEC) E ENTEROPATOGÊNICAS (EPEC) EM BEZERROS

AUTORA: JULIANA DA SILVA MENEZES AZOLA

ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. LUIZ CARLOS DO NASCIMENTO  
Departamento de Alimentos e Medicamentos / UNIFAL - Alfenas, MG

Profa. Dra. ROBERTA HILSDORF PICCOLI  
Departamento de Ciências dos Alimentos / UFLA - Lavras, MG

Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 13 de dezembro de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**JULIANA DA SILVA MENEZES AZOLA** – Nascida em Osasco, SP, em 21 de setembro de 1988, filha de Nilza Aparecida da Silva Menezes e Edilson Benedito Menezes. Bióloga, graduada em Licenciatura em janeiro de 2011 pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Campus de Alfenas. Foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de agosto de 2008 a julho de 2009. De março de 2012 a fevereiro de 2013, cursou Mestrado pelo Programa de Ciência Animal, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Campus de Alfenas, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em março de 2013, iniciou o Doutorado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

***“E não sede conformados com este mundo, mas sede transformados pela renovação do vosso entendimento, para que experimenteis qual seja a boa, agradável, e perfeita vontade de Deus.” (Bíblia – Romanos 12:2)***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela graça concedida da vida, pois devo a Ti, Senhor, meu respirar.

À minha amada família, sempre ao meu lado, meu porto seguro. Aos meus pais, Edílson Benedito Menezes e Nilza Aparecida da Silva Menezes, pelo amor incondicional. Aos meus irmãos, Rafael Henrique da Silva Menezes e Flávia da Silva Menezes, partes de mim. À minha avó querida, Ivone Tafuri da Silva, tão dedicada, meu sincero agradecimento. Ao meu esposo, Renato Aloísio Azola, presença constante, meu incentivo, meu companheiro, meu amor. À minha filha Manuella, que já é minha maior força para nunca desistir. Aos demais familiares, pela motivação, por serem presentes divinos na minha vida, obrigada pela união.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, pela humildade, respeito, exemplo e ensinamentos.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Câmpus de Alfenas, pela recepção carinhosa.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, pela oportunidade.

A todos do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Micro-organismos, meus queridos Bianca de Souza, Danielle de Souza, Luciana Rufino, Paulo César Faria e Lucimara Silva. Sem o apoio de vocês jamais seria possível concluir, obrigada pela amizade, vocês moram em meu coração.

Obrigada a todos que participaram, direta ou indiretamente, da realização desse trabalho. Na vida, sempre, juntos somos mais fortes.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	02
2.1 Bovinocultura.....	02
2.2 Diarreia neonatal em bezerros .....	03
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	03
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicas (ETEC).....	06
2.3.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas (EPEC) .....	08
2.3.3 <i>Escherichia coli</i> shigatoxigenicas (STEC) .....	09
2.4 Susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos.....	11
2.4.1 Resistência microbiana .....	12
2.4.2 Extratos vegetais: alternativa à resistência .....	14
3. JUSTIFICATIVA .....	17
4. OBJETIVOS .....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
5.1 Localização do estudo.....	19
5.2 Caracterização das amostras.....	19
5.3 Isolamento e identificação microbiológica .....	20
5.4 Extração de DNA.....	21
5.5 Detecção dos genes de virulência por PCR.....	22
5.6 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos .....	23
5.6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Antimicrobianos.....	24
5.7 Identificação sorológica .....	24
5.8 Obtenção dos extratos hidro alcóolicos vegetais .....	25



5.8.1 Triagem – Extrato vegetal .....	26
5.8.2 Determinação CIM – Extrato vegetal.....	27
5.8.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	28
6. RESULTADOS .....	29
6.1 Detecção dos patótipos de <i>E. coli</i> .....	29
6.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	31
6.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Antimicrobianos.....	35
6.4 Determinação dos sorogrupos O dos isolados de <i>E. coli</i> .....	35
6.5 Atividade antimicrobiana – Extratos vegetais .....	37
7. DISCUSSÃO .....	39
8. CONCLUSÕES .....	46
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	47
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AE - "*Attaching and effacing*"
- BFP- Fator de aderência denominado "*bundle forming pill*"
- BHI – Agar "*Brain and Heart Infusion*"
- CBM – Concentração Bactericida Mínima
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CLSI - "*Clinical and Laboratory Standards Institute*"
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- EAF- Plasmídio "*EPEC Adherence Factor*"
- EDTA - Ácido dietilenodiaminotetracético
- EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
- ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
- FV – Fator de Virulência
- LPS - Lipopolissacarídeo
- MAR - Múltipla resistência a antimicrobianos
- µL - Microlitro
- µM - Micromolar
- mL - Mililitro
- mmHg – Milímetros de mercúrio
- mM - Milimolar
- pb - Pares de base
- PBS - Tampão fosfato salino
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- Pmol - picoMol

Região LEE – Ilha de patogenicidade “*Locus of enterocyte effacement*”

rpm – Rotações por minuto

STEC - *Escherichia coli* Shigatoxigênica TEB - Solução tampão Tris-EDTA-Borato

TSI – Agar “*Triple Sugar Iron*”

UFC – Unidade formadora de colônia

UV - Ultra-violeta

V – Volt

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
1. Lista de “primers” utilizados nas reações de PCR.....	23
2. Perfil genético associado aos patótipos de <i>E. coli</i> STEC, ETEC e EPEC em amostras fecais oriundas de bezerros diarreicos .....	30
3. Perfil genético associado ao patótipo STEC em animais sem diarreia .....	31
4. Perfil de resistência aos antimicrobianos - isolados animais diarreicos .....	32
5. Perfil de resistência aos antimicrobianos - isolados animais sem diarreia .....	33
6. Relação de isolados e respectivos dados sorológicos .....	36

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
1. Uma das propriedades leiteiras de colheita, exemplos de animais e de sistema de manejo.....	19
2. Metodologia – Microdiluição em caldo – CIM para extratos vegetais em placas de 96 poços.....	28
3. Gráfico de porcentagens de isolados oriundos de animais diarreicos resistentes ao antimicrobianos testados.....	33
4. Gráfico de porcentagens de isolados oriundos de animais sem diarreia resistentes aos antimicrobianos testados .....	34
5. Triagem. 1 – controle positivo (clorexidina 0,12%), 2 – controle negativo (água estéril), 3 – concentração 150 mg/mL, 4 – concentração 100 mg/mL e 5 – concentração 50 mg/mL.....	37

**GENES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A EXTRATOS VEGETAIS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICAS (ETEC), SHIGATOXIGÊNICAS (STEC) e ENTEROPATOGÊNICAS (EPEC) EM BEZERROS**

**RESUMO** - A diarreia neonatal é uma das mais recorrentes enfermidades que acometem bezerros, acarretando prejuízos à pecuária leiteira. Nestes casos, um dos micro-organismos mais prevalentes é *Escherichia coli*, relacionada à contaminação fecal e a surtos alimentares. Para o tratamento, a crescente resistência bacteriana a antimicrobianos leva à busca por novas alternativas farmacológicas. O presente trabalho teve como objetivo geral testar a susceptibilidade de isolados de *E. coli* oriundos de bezerros neonatos diarreicos e sem diarreia a extratos vegetais. Os animais pertenceram a fazendas destinadas à produção leiteira no Estado de Minas Gerais, Brasil. As amostras foram submetidas ao isolamento microbiológico, à sorologia, à identificação genética por PCR e a testes antimicrobianos. Em relação aos antissoros polivalentes, houve isolados positivos a sorogrupos de importância clínica em humanos, como O26 e O111. Foram isoladas 36 estirpes oriundas de animais acometidos, positivas para pelo menos um gene testado, sendo eles *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae*, *bfp* e *Sta*. Relacionadas ao isolamento de animais sem diarreia, 9 estirpes foram carreadoras dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> ou ambos, caracterizando os bovinos como reservatórios do patótipo STEC. O gene *LT-II* não foi encontrado. Quanto aos testes de susceptibilidade, encontrou-se isolados resistentes a diferentes classes de antimicrobianos. Entre os extratos testados, houve sensibilidade frente à planta *Salvia officinalis* L. (sálvia). Assim, esta vertente de estudo coloca-se como alternativa ao combate a patógenos bacterianos, válida para futuros testes quanto à descoberta de novos componentes químicos que possuam atividade antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Colibacilose, enterobactérias, PCR, *Salvia officinalis* L.

**VIRULENCE GENES AND SUSCEPTIBILITY PROFILE TO THE PLANT  
EXTRACTS OF ISOLATES FROM ENTEROTOXIGENIC *Escherichia coli* (ETEC),  
SHIGA-TOXIGENIC (STEC) AND ENTEROPATOGENIC (EPEC) IN CALVES**

**SUMMARY** - Neonatal diarrhea is one of the most recurrent illnesses that affect calves, resulting in losses to dairy farming. In these cases, one of the most prevalent microorganisms is *Escherichia coli* that is related to fecal contamination and food outbreaks. For the treatment, the increase bacterial resistance to antimicrobials leads to the search for new pharmacological alternatives. The main aim of this study was to test the susceptibility of *E. coli* isolated from neonatal calves with diarrhea and healthy to plant extracts. The animals were found in farms which are dairy-producing in the State of Minas Gerais, Brazil. The samples were subject to microbiological isolation, serology, PCR genetic identification and antimicrobial testing. In relation to polyvalent antiserum, there were positive isolates of clinical importance of serogroups in humans, such as O26 and O111. Thirty six strains were isolated from affected animals and they were positive to at least one gene tested, such as *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae*, *bfp* and *Sta*. Related to the healthy animals, 9 strains were carriers of the genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> or both, characterizing the cattles as reservoirs of pathotype STEC. The gene *LT-II* was not found. In relation to susceptibility tests, resistant isolates to different classes of antimicrobials were found. Among the extracts that were tested, there was sensitivity to the *Salvia officinalis* L. plant (sálvia). Thus, this aspect of study can be alternative to combat the bacterial pathogens, valid for future tests as to the discovery of new chemical compounds with antimicrobial activity.

**Keywords:** Colibacillosis, enterobacteria, PCR, *Salvia officinalis* L.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa uma posição de destaque quando observados os índices de produção da pecuária leiteira mundial. Entretanto, algumas doenças originadas pela presença de micro-organismos patogênicos podem acometer o gado leiteiro, como a síndrome diarreica neonata. Esta enfermidade acarreta inúmeros prejuízos econômicos, entre eles, descarte de animais, possibilidade de disseminação entre o plantel e gastos com medicamentos. Ainda, constitui alerta à saúde pública, pois, o manejo ou o tratamento inadequado possibilitam a infecção humana e/ou o surgimento de estirpes resistentes.

De acordo com diversos estudos, *Escherichia coli* é um dos micro-organismos mais frequentemente isolados de amostras fecais provenientes de bezerros neonatos diarreicos em inúmeras propriedades rurais. Atualmente, conhecidos, existem inúmeros patótipos de *E. coli*, classificados de acordo com seus fatores de virulência, mecanismos de ação e promoção da enfermidade. Entre eles, podem ser citadas as estirpes enterotoxigênicas (ETEC), shigatoxigênicas (STEC) e enteropatogênicas (EPEC). Além disso, bovinos sem diarreia também podem ser reservatórios de bactérias patogênicas.

Para o tratamento da colibacilose, são utilizados vários antimicrobianos. Entretanto, a realização de antibiogramas, que demonstram a sensibilidade e/ou a resistência dos micro-organismos às drogas usadas, tem sido essencial para o conhecimento do poder de ação dos fármacos. Em consequência, como alternativa ao frequente surgimento de isolados multirresistentes aos antibióticos, estudos que abordam a possível atividade antibacteriana de extratos vegetais já ganharam espaço no cenário científico, sendo um vasto campo de pesquisas e futuras descobertas.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral detectar, por meio de técnicas microbiológicas e moleculares, estirpes de *E. coli* patogênicas em bezerros neonatos diarreicos e sem diarreia, e testar a susceptibilidade dos isolados em relação a antimicrobianos e a extratos vegetais.



## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Bovinocultura**

A bovinocultura é uma das principais atividades produtivas do agronegócio brasileiro, sendo, também, uma das mais rentáveis mediante ao quesito lucratividade (CNA, 2012). Desde os primórdios da civilização, a criação de bovinos está intimamente ligada a fatores econômicos e sociais circundantes ao estabelecimento e ao desenvolvimento de cidades, como a ocupação geográfica do país, estando estes animais relacionados ao transporte, bem como à produção de alimentos (ALMEIDA; MICHELS, 2012).

A produção leiteira é desenvolvida em todo o território brasileiro, com animais distribuídos em vários estabelecimentos pecuários. O rebanho bovino nacional está concentrado, principalmente, nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, que juntamente à região Sul, possuem 86,1% do rebanho nacional (IBGE, 2012).

Em 2011, o Brasil ocupou a sexta posição mundial na produção de leite. Porém, quando observada à quantidade média de vacas em lactação, o país alcançou o terceiro lugar no ranking (USDA, 2011). Entre os maiores produtores na última década, apresentou a maior taxa de crescimento anual de produtividade, o que reforça a argumentação do elevado potencial da produção nacional (MACHADO; CORREA; MARIN, 2008).

Com relação ao contingente de animais, os bezerros têm grande importância dentro do setor agropecuário, uma vez que investimentos envoltos à continuidade e à melhoria do rebanho estão objetivamente entrelaçados aos neonatos. Sendo assim, enfermidades relacionadas a eles são preocupantes e constantes alvos de estudos, visto que altas taxas de mortalidade influenciam diretamente a rentabilidade da atividade (ESCRIVÃO et al., 2005).

### **2.2 Diarreia neonatal em bezerros**

As infecções bacterianas entéricas são frequentemente notificadas na área científica, possuindo crescente importância para as cadeias produtivas, acarretando

impactos consideráveis na indústria leiteira mundial. De maneira geral, as conhecidas diarreias constituem fator produtivo limitante para a pecuária, acometendo animais em fase crítica de crescimento, ocasionando atrasos no desenvolvimento e redução da eficiência alimentar, ou até mesmo, em último caso, morte prematura (MENIN et al., 2008).

Entre os fatores que mais influenciam na mortalidade de bezerros jovens, está o manejo inadequado. Como exemplos, caracteres como a falta de higiene, colostragem mal realizada, parto não monitorado e tempo prolongado de permanência com a mãe podem afetar os animais e serem decisivos no aparecimento de diversas doenças, entre elas, as diarreias (RADOSTITS et al., 2007).

Na criação de bezerros, a diarreia neonatal é uma das síndromes mais importantes, devido ao fato de promover inúmeras e relevantes perdas econômicas decorrentes da redução nas taxas de crescimento animal, dos custos com tratamento medicamentoso e do aumento dos índices de mortalidade e morbidade no rebanho (OK et al., 2009).

A síndrome diarreica é um sério problema devido à existência de vários fatores envolvidos em sua gênese. Possui etiologia e patogênese complexa, com vários agentes infecciosos envolvidos, sendo *E. coli* um dos micro-organismos mais importantes tanto em casos de diarreia como em infecções extra intestinais humanas e animais (GAMEZ et al., 2006).

É de grande importância estudar a etiologia desta enfermidade, assim como as causas e os tipos mais comuns, uma vez que a sua incidência é considerável em rebanhos do mundo todo, inclusive do Brasil. Dessa forma, pode-se formar uma base teórica científica para dissertar a respeito de métodos de prevenção e de tratamento eficazes, visando-se, sobretudo, minimizar as perdas econômicas e reestabelecer o bem-estar animal (MENIN et al., 2008).

### **2.3 *Escherichia coli***

O gênero *Escherichia*, um membro da família Enterobacteriaceae, é composto por várias espécies, mas especialmente *E. coli* é um importante patógeno de

animais (DRUMMOND, 2011). Estirpes patogênicas desta espécie têm sido associadas a significantes perdas de bezerros neonatos (DEBROY; MADDOX, 2001).

É uma bactéria em formato de bastonete, Gram negativa, anaeróbia facultativa e detentora de flagelos peritríquios (TRABULSI et al., 2005). O intestino grosso, principalmente o cólon, é o habitat deste micro-organismo nos animais, sendo as fezes a principal fonte de contaminação. Uma vez eliminadas no meio ambiente, esses patógenos podem sobreviver por longos períodos, desde que em condições ideais de crescimento (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Essas bactérias fermentam o carboidrato lactose, o que constitui importante característica de diferenciação quando comparadas a outros patógenos entéricos. Fenotipicamente, a espécie é identificada por meio de vários fatores bioquímicos determinantes, como produção de indol, redução de nitratos, ausência da enzima citocromo oxidase, fermentação da glicose com produção de ácido e gás e não produção de ácido sulfídrico em meios específicos (TRABULSI et al., 2005).

No trabalho realizado por Oliveira Filho et al. (2007), no Estado do Mato Grosso, *E. coli* foi a enterobactéria mais frequentemente isolada nas fezes de bezerros com e sem diarreia. Resultado similar foi descrito por outros autores, como Langoni et al. (2004). No estudo desenvolvido por Gamez et al. (2006), na região de Ribeirão Preto, São Paulo, dos 200 espécimes fecais de bezerros com diarreia, foram isoladas *E. coli* em 86,5% (173/200). Andrade et al. (2009), em Minas Gerais, isolaram e identificaram enterobactérias em 133 amostras de fezes, sendo 90,22% (120/133) positivas para a presença de *E. coli*.

Sabe-se que somente o isolamento microbiológico, a partir de amostras de fezes e conteúdo intestinal, não é suficiente para o diagnóstico da enfermidade, pois técnicas mais avançadas já existem, sendo mais precisas, incisivas e confirmatórias. Nesse sentido, metodologias de sorotipificação, ELISA, imunofluorescência e PCR podem ser empregadas para melhor análise (COSTA et al., 2006).

Um conjunto particular de genes é necessário para que a bactéria ocasione determinada doença. Logo, os isolados são classificados quanto aos diferentes patótipos conforme o padrão de genes associados à sua patogenicidade. *E. coli* responsáveis por enfermidades entéricas são classificadas em vários grupos, de

acordo com fatores como propriedades características de virulência, interação com a mucosa intestinal e sintomas clínicos que ocasionam. Os principais patótipos responsáveis por ocorrências nos criatórios animais são *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* shigatoxigênicas ou verotoxigênicas (STEC ou VTEC), *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e *E. coli* enteroinvasivas (EIEC). As estirpes patogênicas de *E. coli* são, também, classificadas por meio de sorologia, sobretudo por antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K) (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Algumas das linhagens de *E. coli* citadas anteriormente têm sido envolvidas, com frequência, em doenças entéricas que acometem humanos e animais. A capacidade de causar enfermidade é devido à aquisição dos chamados fatores de virulência (FV), estruturas ou produtos que contribuem para que a bactéria consiga se instalar no organismo do hospedeiro e provocar alterações. Tais fatores são codificados geneticamente e podem ser transferidos entre diferentes estirpes, surgindo novas potenciais combinações, identificadas por técnicas moleculares, como a PCR, amplificando-se genes característicos para cada patótipo (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Considerando-se, portanto, caracteres genéticos, a aquisição e a perda de elementos móveis, como plasmídeos e transposons, têm papel crucial na formação do genoma de bactérias patogênicas. Por meio da transferência horizontal de genes, novas características, como padrões de resistência, por exemplo, se disseminam para micro-organismos receptores (SHAMES; AUWETER; FINLAY, 2009). Sabe-se, também, que ilhas de patogenicidade, definidas como grandes aglomerados de genes de virulência, podem ser encontradas em plasmídeos ou integradas no cromossomo bacteriano, mas não são observadas em bactérias não patogênicas. No entanto, elementos genéticos móveis as tornam capazes de se adaptar a vários hospedeiros, tornando-os virulentos, colonizando, multiplicando e provocando diversos danos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Na superfície bacteriana, é possível observar estruturas antigênicas fundamentais para a classificação dos mais variados grupos de *E. coli*. Em alguns casos, os patótipos são caracterizados por compartilharem antígenos que definem sorogrupos, baseados no antígeno O (TRABULSI et al., 2005). O antígeno somático

“O” é termoestável e corresponde a uma das frações do principal componente da parede celular das bactérias Gram negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

Durante anos, os mecanismos pelos quais *E. coli* patogênicas causavam diarreia eram desconhecidos e, devido a isso, os patótipos só poderiam ser identificados através da sorologia. Verificando-se a presença dos antígenos, foi possível estabelecer a sorotipagem de amostras de *E. coli* e associá-las com diversos surtos entéricos (ORSKOV; ORSKOV, 1992). A diversidade dos sorotipos que esses micro-organismos apresentam é vasta, os mais conhecidos são, de forma geral, O157 (alto potencial virulento) e não-O157 (CDC, 2006). Banatvala et al. (2001) observaram, por meio de estudos sorológicos e consulta literária, que sorotipos não-O157 vem sendo isolados com maior frequência a partir de amostras fecais de pacientes hospitalares por exemplo.

Com os avanços científicos desenvolvidos no intuito de compreender a patogênese dos patótipos de *E. coli*, em conjunto com os estudos em biologia molecular sobre os fatores de virulência, sabe-se que os produtos gênicos estão mais diretamente associados à patogenicidade que os antígenos de superfície. Neste contexto, portanto, observar somente a sorotipagem não é suficiente para caracterizar um isolado de *E. coli* como patogênico, embora existam diversas associações entre sorotipos e virulência, bem como entre sorotipos e doenças (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

### **2.3.1 *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC)**

Os exemplos principais de fatores de virulência em *E. coli* são enterotoxinas e adesinas fimbriais (adesão aos enterócitos do intestino delgado). Bactérias capazes de produzir enterotoxinas ocasionam o desequilíbrio da homeostase fluída intestinal, além de hipersecreção, resultando em síndromes diarreicas (ZHANG et al., 2007).

Bactérias caracterizadas como enterotoxigênicas (ETEC) possuem como meio de patogenicidade a adesão à mucosa do intestino, multiplicando-se, mais frequentemente na luz do delgado, e produzindo uma enterotoxina que desencadeia a formação de abundante secreção de fluídos. A perda de líquidos na luz intestinal é

a causa de casos de diarreia, desidratação e mesmo morte posterior (MAGALHÃES et al., 1991).

A produção de enterotoxinas é mediada por plasmídeos. De forma geral, quando secretadas, não ocasionam lesões do epitélio mucoso intestinal. Comumente, este patótipo envolve sorogrupos de *E. coli* O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O92, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159 e O167 (KONEMAN et al., 2008).

São conhecidos dois tipos de enterotoxinas, as chamadas termoestáveis (ST – proteína pouco imunogênica e resistente a 100°C por 15 minutos) e aquelas termolábeis (LT – proteína altamente imunogênica, grande, sendo inativada a 60°C em 15 minutos). Entre as primeiras, relatam-se dois subtipos clássicos STa e STb, entretanto, somente STa tem sido encontrada em amostras de origem bovina (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2002).

A STa é uma pequena molécula, seu receptor é um guanilato ciclase ligado à membrana. Quando ocorre a ligação, incita-se a produção de guanosina-monofosfato cíclico (GMPc) e o seu consequente aumento intracelular culmina na abertura dos canais de cloreto, perdendo-se cloreto e água para o lúmen intestinal. Em seguida, nas células do topo das vilosidades ocorre bloqueio de absorção de íons sódio e cloreto e, também, de água, e subsequente eliminação de íons cloreto nas células da cripta (DRUMMOND, 2011).

São relatados dois subtipos entre as enterotoxinas classificadas como termolábeis, sendo eles LT-I e LT-II (BLANCO et al., 1993). Em amostras de origem bovina, somente há descrição científica para a produção de LT-II (BLANCO et al., 1991; SERIWATANA et al., 1988). Os genes que codificam para a síntese desta toxina já foram clonados, sequenciados e conhecidos iniciadores para a detecção por reações de PCR (PICKETT; WEINSTEIN; HOLMES, 1987; SCHULTSZ et al., 1994; AIDAR-UGRINOVICH et al., 2002).

Em situações descritas habitualmente, patótipos ETEC, após a promoção da diarreia neonatal, podem levar a bacteremia terminal na inexistência de uma intervenção rápida, com fluídos, eletrólitos e/ou antimicrobianos (DRUMMOND, 2011). Estas estirpes causam diarreia aquosa, líquida, variando de branda e auto limitante a severa e profusa, semelhantemente à cólera. Nos casos típicos, o início é

abrupto, com curto período de incubação. As fezes, na maior parte das observações, não apresentam muco, sangue e/ou pus. A enfermidade não decorre em febre ou vômito, porém, com frequência, é acompanhada de cólicas abdominais leves (PUENTE; FINLAY, 2001). Como exemplo, Akihama et al. (2015) observaram isolados ETEC em gado bovino no Japão, sendo detectados os genes ST e LT.

### 2.3.2 *Escherichia coli* enteropatogênicas (EPEC)

*E. coli* enteropatogênicas (EPEC) são uma das mais evidentes e importantes categorias de estirpes capazes de promover casos clínicos diarreicos. Em relatos, tem sido associada, com frequência, à diarreia infantil nos países em desenvolvimento econômico e social. Os primeiros relatos associados a isolados EPEC são de surtos em neonatos no Reino Unido e Estados Unidos (NATARO; KAPER, 1998). No Brasil, segundo dados publicados, é um dos principais micro-organismos responsáveis por quadros de diarreia em crianças de até 1 (um) ano (GOMES et al., 1991).

Estas estirpes estão principalmente associadas aos sorogrupos O111 e O119, mas aqueles O55, O86, O126, O127, O128 e O142 também podem estar comumente envolvidos. O sintoma característico é marcado por um quadro de diarreia aquosa, com abundante presença de muco e menor quantidade de sangue (KONEMAN et al., 2001).

Tais bactérias patogênicas aderem às células de forma localizada e causam lesões de aderência destrutiva (KONEMAN et al., 2001). Inicialmente, fixam-se às células epiteliais do intestino delgado através de fímbrias, expressas na superfície bacteriana, denominadas *BFP* (*bundle forming pili*). Os genes que codificam para *BFP* estão localizados em plasmídeo denominado *EAF* (*EPEC-adherence fator*). Essa ligação desencadeia vários eventos que culminam em danos às microvilosidades (SILVA; DA SILVA, 2005). Em seguida, a intimina, proteína expressa no exterior da bactéria, medeia à aderência do micro-organismo ao receptor (receptor Tir). Estes fatores são codificados por genes localizados numa região cromossômica específica, denominada LEE (*Locus of enterocyte effacement*); neste caso, especificamente, o gene *eae*. A interação intimina-Tir permite a

ancoragem bacteriana à superfície da célula hospedeira, produzindo rearranjos da estrutura do citoesqueleto (KENSCH; ACHECON, 2002; STELLA et al., 2008; SILVA; DA SILVA, 2005).

Portanto, de forma geral, as principais características que definem EPEC são promover a lesão A/E (“*attaching and effacing*”) e a ausência de produção de toxina Shiga. No entanto, a habilidade de produzir a lesão não se restringe somente a EPEC, sendo observada, também, em *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) (NATARO; KAPER, 1998; STELLA et al., 2008).

As EPEC podem ser divididas em típicas e atípicas devido à presença ou à ausência, respectivamente, do plasmídeo EAF, que codifica o gene *bfp* (NATARO; KAPER, 1998). Akihama et al. (2015) relataram estirpes EPEC atípicas em bovinos no Japão, sendo observado somente o gene *eae*.

### **2.3.3 *Escherichia coli* shigatoxigênicas (STEC)**

Entre as estirpes de *E. coli* capazes de provocar doença em seres humanos e animais, estão as *E. coli* shigatoxigênicas (STEC). A patogenicidade destas estirpes, em especial, está associada principalmente a fatores de virulência como a produção de toxinas e a capacidade de aderência à mucosa intestinal (BARRET et al., 1994).

Dessa forma, devido ao seu potencial virulento, tais linhagens, além de produtoras da toxina shiga (*stx*), também podem apresentar a ilha de patogenicidade LEE, que codifica proteínas homólogas àquelas características do patótipo EPEC, podendo albergar conjuntamente, portanto, o gene *eae*. Esta peculiaridade incita alguns autores a descreverem o termo STEC para qualquer isolado de *E. coli* produtor de toxina *stx* e EHEC (enterohemorrágica) para linhagens *Stx*-positivos que apresentem o gene *eae* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). No entanto, esta denominação não é universal e, especificamente, neste trabalho, é utilizado o termo STEC para designar estirpes que apresentem *stx*, independente da presença de *eae* (CARDOZO, 2014).

Uma das toxinas produzidas por este patótipo é a Shiga-like toxina 1 (*stx*<sub>1</sub>), semelhante a potente toxina produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae*. Esta semelhança é devido à sua reação e neutralização por anticorpos contra Shiga



toxina. Muitos representantes também produzem uma segunda toxina, a Shiga-like toxina 2 (stx<sub>2</sub>), não neutralizada por anticorpos contra Shiga toxina (LEVINE, 1987).

Entre os mais de 200 sorotipos de *E. coli* que produzem Shiga toxina (STEC), o sorotipo O157:H7 destaca-se pelo alto potencial virulento, sendo o mais frequentemente associado a surtos de toxinfecção de origem alimentar (VOLD et al., 2000). Em humanos, há forte incriminação da *E. coli* O157:H7 como causa da síndrome hemolítica urêmica, enfermidade definida por início súbito de anemia hemolítica e posterior falência renal aguda após o aparecimento dos sintomas (PRATA, 1999). Em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, a mesma é comumente conhecida por também causar diarreia sanguinolenta (STELLA et al., 2008).

Para casos de acometimento por STEC, a síndrome clínica é observável, caracterizada por intensas cólicas abdominais e diarreia abundante, inicialmente aquosa, mas que de maneira rápida evolui para sanguinolenta, com presença de coágulos, não acompanhada de leucócitos nas fezes e afebril (RILEY et al., 1983). Estas características a distinguem da disenteria clássica ocasionada por *Shigella* sp., representada por febre alta, toxemia, fezes com pouco sangue e muco, contendo muitos leucócitos (PRATA, 1999).

Os ruminantes, especialmente bovinos leiteiros, são considerados como os principais reservatórios de STEC, potenciais estirpes causadoras de infecções em seres humanos. No entanto, outros ruminantes também podem representar a mesma função de albergar tais patógenos, como búfalos, ovinos e caprinos. A transmissão pode ocorrer por meio do consumo de alimentos malcozidos e produtos lácteos não pasteurizados, contendo estirpes STEC, parte integrante da microbiota intestinal dos animais. Em relatos, infecções por STEC foram atribuídas ao consumo de carne bovina, ou de produtos lácteos, contaminados com fezes de bovinos (HUSSEIN; SAKUMA, 2005).

O controle de qualidade na indústria láctea é de fundamental importância, pois *E. coli* O157:H7, como agravante, possuem a habilidade de sobreviverem ou multiplicarem-se no leite sob condições hostis de temperatura e pH (MASSA et al., 1999).

Os pesquisadores Oliveira et al. (2007) isolaram STEC oriundas de búfalos no Estado de Minas Gerais, Brasil, enfatizando esses animais como reservatórios da bactéria e possíveis fontes de infecção para humanos. De 109 isolados, 38,5% carreavam o gene *stx*<sub>2</sub>, 39,5% os genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> e 22% o gene *stx*<sub>1</sub>. No mesmo trabalho, mais de 70% das estirpes foram sorotipadas e caracterizadas como pertencentes a 20 sorotipos diferentes. Mais de 50% dos sorotipos de cepas associadas a antígenos identificados já haviam sido previamente descritos como relacionados a doenças humanas.

Já, Irino et al. (2005), no Estado de São Paulo, Brasil, constataram a ocorrência de STEC em amostras fecais de bovinos não acometidos, sendo detectadas 220 estirpes STEC por PCR, 56,4% portadoras de ambos os genes, *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>. Leomil et al. (2003), também em São Paulo, comprovaram a presença de STEC em amostras fecais provenientes de bovinos não diarreicos e diarreicos, sendo analisadas 44 estirpes por PCR, 50% positivas para o gene *stx*<sub>1</sub>, 16,7% para o gene *stx*<sub>2</sub> e 33,3% para ambos os genes.

## **2.4 Susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos**

Inúmeras bactérias, em especial, *E. coli*, podem ser responsáveis por prejuízos econômicos à pecuária leiteira e, ainda mais, apresentarem resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento de doenças, como a diarreia neonatal. Assim, é de extrema importância o isolamento e a identificação de agentes patogênicos em laboratórios e a análise *in vitro* da sensibilidade destes micro-organismos para melhor controle de enfermidades por meio de terapêutica adequada (ANDRADE et al., 2009).

O teste laboratorial conhecido como antibiograma oferece como resultado padrões de resistência ou sensibilidade de uma determinada bactéria a antimicrobianos preconizados (antibióticos ou quimioterápicos). Os resultados obtidos por meio dessa técnica são valiosos para diversas análises posteriores e aplicados na triagem dos fármacos. Assim, há o direcionamento do profissional quanto ao tratamento, podendo optar, com certeza, por um antibiótico de alto poder bactericida, que promova o estresse sub-letal do micro-organismo e atue no maior

número possível de agentes causadores da doença. A aferição da sensibilidade, e consequente descoberta de bactérias resistentes, são fundamentais para enfatizar a utilização do produto certo e que melhor se aplica aos resultados, no combate aos agentes em cada propriedade especificamente (FERNANDES, 1992).

A susceptibilidade a antimicrobianos também pode ser determinada por meio da avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), mínima concentração do produto que será capaz de afetar o agente causador da enfermidade de maneira efetiva, inibindo seu crescimento. Este método, já padronizado, possui detalhamento técnico bem definido e fornece resultados quantitativos, em valores numéricos em escala graduada. A interpretação dos dados obtidos por meio dessa técnica considera características farmacológicas e farmacocinéticas dos antimicrobianos, avaliando a concentração mínima a ser alcançada no animal para combater a doença e evitando o uso indiscriminado de antibióticos ou quimioterápicos no tratamento (CLSI, 2013).

O estudo da susceptibilidade bacteriana ante os diferentes antimicrobianos comercializados e utilizados no tratamento medicamentoso das enfermidades animais é importante, pois oferece direção correta às ações profissionais, fornecendo subsídios à terapia animal e melhoras a todos os animais do rebanho submetidos às mesmas condições de manejo e higiene e, portanto, sob os mesmos riscos de infecção e disseminação de patógenos (NADER FILHO et al., 2007).

#### **2.4.1 Resistência bacteriana**

A resistência aos antimicrobianos é a capacidade das bactérias em permanecerem viáveis, passíveis de crescimento e propagação, mesmo frente aos efeitos de um antibiótico. Ou seja, multiplicação ou persistência na presença de níveis terapêuticos do antimicrobiano testado (ÁVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011). Aqueles micro-organismos resistentes não se inibem pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano (MIGUEL et al., 2012). Este fenômeno é decorrente de mutações ou produção de enzimas que provocam a eliminação da eficiência dos medicamentos utilizados para combater agentes patogênicos (ÁVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011).

O processo pode ser codificado pelo cromossomo bacteriano ou por plasmídeos, o que facilita a difusão de genes. A disseminação pode ser vertical ou horizontal. A transmissão vertical, ou clonal, ocorre quando uma bactéria se divide e tem todo seu genoma duplicado, originando uma nova célula idêntica. A transmissão horizontal é quando bactérias de mesma espécie ou de espécies diferentes trocam genes de resistência por transferência de material genético através de processos de reprodução como conjugação, transdução e transformação (FROST et al., 2005). Na maioria dos casos, tais bactérias são oriundas, principalmente, do uso amplo, inadequado e/ou indiscriminado de antibióticos no tratamento animal, fornecidos em subdosagens ou em níveis além dos necessários para o combate (NASCIMENTO; MAESTRO; CAMPOS, 2001).

Com o surgimento dos antimicrobianos e das vacinas, as pessoas passaram a acreditar que as doenças infecciosas não mais ofereciam perigo iminente aos animais e aos seres humanos. Entretanto, a rápida expansão global de micro-organismos resistentes mostrou que a situação não era tão favorável e tranquila quanto aparentava (MACCORMICK, 1998). A descoberta de novos recursos terapêuticos não é capaz de acompanhar a evolução e a variedade dos diferentes mecanismos de resistência bacterianos (GRACE; WANG; DAVIES, 2006; PATERSON, 2006).

Dessa maneira, é possível afirmar que o desenvolvimento de resistência por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas (NASCIMENTO; MAESTRO; CAMPOS, 2001). Também, é comum a verificação de casos em que o micro-organismo é resistente a uma ampla variedade de antimicrobianos concomitantemente, tornando o tratamento de uma infecção difícil ou, até mesmo, inviável (ÁVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011). A resistência a determinado agente antibacteriano, frequentemente, resulta em resistência cruzada com outros agentes da mesma classe, como por exemplo, sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e macrolídeos. Plasmídeos e transposons geralmente são mediadores de múltipla resistência (QUINN et al., 2005).

Como alternativa à preocupação constante com o aparecimento destas linhagens, trabalhos científicos investigam novas possibilidades de combate e

reconhecimento de princípios ativos químicos eficazes contra bactérias patogênicas resistentes. Plantas, já utilizadas comumente na medicina popular, representam vasto campo de estudos nesta área (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

#### **2.4.2 Extratos vegetais: alternativa à resistência**

Os primeiros relatos da utilização de plantas para a terapia datam do ano de 460 a.c., no entanto, investigações sobre o seu uso sistemático como medicamento remetem à Índia Antiga, ao Egito e à China (WANZALA et al., 2005). Este uso no tratamento e na cura de enfermidades é tão antiga quanto à espécie humana, tendo o conhecimento popular grande contribuição para a divulgação das virtudes terapêuticas obtidas a partir das plantas. Muitas vezes, este é o único recurso para muitas comunidades e grupos étnicos que não dispõem de acesso a outros tratamentos disponíveis pela medicina ou que a preferem em relação à medicina tradicional por questões culturais (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

O desenvolvimento desses saberes está em expansão e acompanha a aprendizagem do homem nos cuidados da saúde humana e animal (WANZALA et al., 2005). Trabalhos empíricos têm trazido base científica ao uso popular de plantas medicinais. De maneira indireta, a medicina popular desperta o interesse de pesquisadores em estudos multidisciplinares que enriquecem o inesgotável conhecimento a respeito do uso terapêutico de plantas medicinais (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

No Brasil, bem como em outros países da América Latina, a fitoterapia, por exemplo, constitui alternativa econômica em relação aos medicamentos alopáticos uma vez que se caracteriza pela utilização direta de plantas no tratamento de doenças humanas (CARVALHO et al., 2002). De acordo com Gregório (2006), estima-se que em alguns continentes como a África, até 80% da população faz uso de medicamentos de origem vegetal. Na Alemanha e França são 75%, no Canadá 70% e nos EUA 42% (LUBIAN et al., 2010). Além disso, extratos vegetais ou substâncias ativas vêm sendo utilizados, também, na Medicina Veterinária para o tratamento de parasitoses e enfermidades infecciosas (COSTA, 1998).

O tratamento da diarreia neonatal em bezerros, por exemplo, é convencionalmente realizado por antibioticoterapia. Entretanto, o uso ostensivo e inadequado proporciona resistência bacteriana a diversos princípios ativos. Agentes patogênicos como, por exemplo, *E. coli*, apresentam casos de resistência comprovados frente aos antimicrobianos disponíveis no mercado. Para reduzir ou eliminar esse problema, a busca por meios alternativos, como o uso de compostos naturais, vem sendo estimulada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Como exemplos de vegetais estudados, há assa peixe (*Vernonia polyanthes*), sálvia (*Salvia officinalis*), alho (*Allium sativum*), macela (*Achyrocline satureoides*), sete sangrias (*Cupheae carthagenensis*) e picão preto (*Bidens pilosa*). O uso medicinal do alho (*A. sativum*) como antimicrobiano vem sendo documentado por diferentes autores, sendo possuidor de conhecido uso antibacteriano, também consagrado pela medicina popular. Nas condições de experimento de Carvalho, Cruz e Wiest (2005), com exceção das espécies alho porró e nirá (alhos folhies), o alho cultivado ou bulboso não apresentou ação antibacteriana contra *E. coli*. No trabalho de Packer e Luz (2007), o óleo da mesma planta, contra *E. coli* ATCC 25922, também não apresentou halos de inibição. Na Índia, em contraste, pesquisadores encontraram excelente atividade do extrato aquoso de alho contra bactérias *E. coli* previamente caracterizadas como ETEC e EPEC (INDU et al., 2006).

Extratos metanólicos e acetanólicos da raiz de *B. pilosa* (picão preto) foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram negativas, como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* com concentrações inibitórias mínimas variando de 5,0 a 10,0 mg/mL, já o extrato aquoso não demonstrou atividade (ASHAFA; AFOLAYAN, 2009). De acordo com relatos anteriores, os extratos de folhas de *B. pilosa* foram ativos contra bactérias Gram-positivas, mas não foram contra Gram-negativas, especificamente *E. coli* (RABE; VAN STADEN, 1997). Outros estudos, de origem fitoquímica, demonstraram que esta planta contém compostos como flavonóides, alcalóides, esteróis e taninos (KHAN; KIHARA; OMOLOSO, 2001; ASHAF; AFOLAYAN, 2009), possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana da espécie.

No trabalho de Duarte et al. (2007), encontraram-se altos valores para concentrações de inibição de *A. saturooides* (macela) contra *E. coli* STEC. A espécie *A. minus*, conhecida popularmente como bardana, representa uma das espécies vegetais com vasta utilização na medicina fitoterápica (KIRICI; KAYA; INAN et al., 2004). No estudo de Lubian et al. (2010), constataram-se efeitos fungistático e fungicida frente a linhagens de *Candida* sp testadas.

Em pesquisa, utilizando-se linhagens padrão conhecidas de *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella Typhimurium*, foi possível demonstrar a presença de halos de inibição destes micro-organismos quando expostos ao extrato de *V. polyantes* Less (assa-peixe). Contudo, efeitos bacteriostáticos e concentrações inibitórias mínimas foram observados somente em *B. cereus* (180,1 mg/mL), *E. coli* (72,04 mg/mL) e *P. mirabilis* (144,08 mg/mL) (JORGETTO et al., 2011).

O gênero *Salvia* possui em torno de 900 espécies, sendo destas, cerca de 60 encontradas em solo brasileiro. Algumas apresentam interesse científico para pesquisas clínicas em geral, como *Salvia officinalis* L., da família Lamiaceae, originária do Mediterrâneo Oriental e adaptada às regiões sul e sudeste do Brasil (GARCIA, 2014). É uma planta com coloração violeta, herbácea, com flores melíferas e medição entre 20 e 80 cm em altura, desenvolvendo-se bem em locais de intensa luz solar e solos drenados. Além de conhecida pelo nome sálvia, também é popularmente mencionada como salva-das-boticas, erva-santa e salvamansa. Em sua composição química, apresenta óleo essencial, compostos fenólicos, terpenos, taninos, saponinas e proteínas (GARCIA, 2014). É considerada aromática e com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, hipoglicemiante e antitumoral. É comum seu uso como condimento e na medicina popular (MARTINS et al., 1998; RADÜNZ et al., 2010). Trata-se de uma planta medicinal muito popular, que há décadas vem sendo estudada, além de amplamente usada para o tratamento de vários grupos de doenças, preparação de alimentos, fabricação de cosméticos, perfumes e produtos de higiene (CUVELIER; RICHARD; BERSET, 1996; RADÜNZ et al., 2010). Inúmeros trabalhos têm estudado o poder antimicrobiano desta planta ((LIXANDRU et al., 2010; BOZIN et al., 2007; STOJANOVIĆ et al., 2016; SOOKTO et al., 2013; WECKESSER et al., 2007).

### 3 JUSTIFICATIVA

A realização do trabalho, tendo em vista o que já foi apresentado, justifica-se:

- *E. coli* patogênicas são frequentemente associadas a surtos de toxinfecção alimentar em humanos, podendo ser isoladas, também, de outros animais, caracterizando-se como zoonose.
  
- A diarreia neonatal em bovinos é sério agravante nos sistemas de produção leiteira, responsável por perdas econômicas consideráveis no contexto das cadeias produtivas.
  
- Os ruminantes são importantes reservatórios de STEC, sendo cabível o estudo epidemiológico também em bezerros sem diarreia.
  
- Com os anos, o surgimento de bactérias multirresistentes a fármacos comerciais tem dificultado o tratamento animal.
  
- O estudo do potencial antibacteriano de extratos vegetais é importante alternativa para a descoberta de possíveis novos princípios ativos, substâncias multialvos eficazes contra micro-organismos resistentes.



#### 4 OBJETIVOS

- Investigar a presença de estirpes *E. coli* em amostras de fezes provenientes de bezerros neonatos acometidos e não acometidos por síndrome diarreica;
- Caracterizar os isolados ETEC, STEC e EPEC através da pesquisa de genes relacionados a seus fatores de virulência;
- Determinar o perfil de resistência dos isolados frente a diferentes drogas antimicrobianas;
- Avaliar possível potencial antimicrobiano de extratos vegetais contra as bactérias isoladas.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Localização do estudo

As amostras fecais foram colhidas de bezerros neonatos (de 1 a 90 dias) provenientes de fazendas produtoras de leite situadas em cidades pertencentes à região Centro-Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2013 a agosto de 2014, na ocorrência da enfermidade. Foi permitida a colheita em quatro propriedades. Observando-se a extensão, a quantidade de representantes animais e os índices de produção, a fazenda 4 foi a mais representativa quanto à amostragem, com 900 hectares, rebanho de 3.500 fêmeas e produtividade média de 12.500 kg leite/hectare/ano.

Um dos locais de colheita, juntamente com a exemplificação dos animais e sistema de manejo, encontram-se na imagem a seguir (Figura 1).



Figura 1. Uma das propriedades leiteiras de colheita, exemplos de animais e de sistema de manejo.

### 5.2 Caracterização das amostras

De um total de 200 amostras, 100 foram oriundas de animais diarreicos e 100 de animais sem diarreia alojados próximos aos acometidos. Como ressalve, todos os bezerros estavam em sistemas de criação individualizados e alimentados manualmente por tratadores, sendo todos pertencentes ao sexo feminino visto que

os machos, após o nascimento, eram vendidos ou abatidos. As principais raças visualizadas foram Holandesas, Jersey, Gir e mestiços entre as mesmas.

As quantidades referentes à amostragem seguiram os números de 10, 14, 12 e 64 exemplares para as fazendas de 1 a 4 respectivamente, sendo os mesmos valores para animais acometidos e não acometidos.

As amostras fecais foram colhidas diretamente do reto animal, utilizando-se suabe estéril, e inseridas em tubos contendo 1 mL de tampão fosfato salino (PBS). A colheita foi realizada antes de qualquer administração medicamentosa nos bezerros. Portanto, enquanto ainda diarreicos, visando análise posterior “*in vitro*” dos isolados frente a antibióticos. Depois de colhidas, todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas até o Laboratório de Biologia, Genética e Fisiologia de Micro-organismos, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG.

### **5.3 Isolamento e identificação microbiológica**

Após chegada ao laboratório, de forma asséptica e após diluição, 50  $\mu$ L do tampão PBS contendo a amostra foi transferido para placas de Agar Hicrome *E.coli* (Himedia, Índia) pelo método em superfície, com o auxílio de alças *Drigalsky* estéreis descartáveis, e incubadas a 37°C por 24 horas.

Foram realizados testes bioquímicos tradicionais para a identificação da espécie, sendo os isolados submetidos a uma bateria de provas bioquímicas de acordo com Mac Faddin (1976) e testados para a fermentação da lactose, produção de indol, reações vermelho de metila e Voges-Proskauer, utilização de citrato, produção de urease e semeados em ágar “*Triple Sugar Iron*” (TSI, Oxoid – Inglaterra).

De cada placa, foram selecionados até oito isolados (UFCs) representantes para posterior pesquisa de genes de virulência, transferidos para tubos contendo 20 mL de caldo “*Brain Heart Infusion*” (BHI – Himedia, Índia) e incubados a 37°C por 24 horas.

Logo após, alíquotas de 750  $\mu$ L da cultura foram adicionadas a 750  $\mu$ L de glicerol e armazenadas em freezer -80°C para análises futuras.

## 5.4 Extração de DNA

Após o período de incubação das culturas multiplicadas em caldo BHI, procedeu-se a lavagem celular com TE pH 8,0 [10 mM Tris (hidroximetil) aminometano –  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  – e 1 mM EDTA dissódico –  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] e centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos a 10°C. Foi realizada a extração do DNA através de protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001).

Em seguida, o “*pellet*” foi ressuscitado em tampão de lise (Tris-HCl 100mM pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0, NaCl 100mM, SDS 10%, sarcosil 1% e proteinase K) e incubado em Banho-maria à 56°C “overnight”. Posteriormente, aos tubos foram adicionados 200 µL de Fenol equilibrado pH 8,0, agitados em vortex e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Após, foi adicionado às amostras 200 µL de clorofórmio-isopropanol gelado (24:1), seguido de agitação em vortex.

Para a separação das fases e limpeza do DNA, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para tubos novos, cuidadosamente para não tocar na interface inferior. Visando a precipitação do DNA, foi acrescentado 1 mL de isopropanol gelado, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C.

A fase líquida foi descartada e o “*pellet*” lavado com 200 µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o “*pellet*” colocado para secar em temperatura ambiente,  $\pm 25^\circ\text{C}$ , por 60 minutos. Posteriormente, o mesmo foi ressuscitado em 50 µL de água ultrapura Milli-Q estéril (Millipore Corporation, EUA). A solução foi estocada em freezer ( $-20^\circ\text{C}$ ).

A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-2000/2000c (Thermo Scientific, EUA), medindo-se a absorvância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação da absorvância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que estando no intervalo de 1,8 a 2,0 é considerado um DNA de boa qualidade (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

## 5.5 Detecção dos genes de virulência por PCR

Para a detecção de ETEC, EPEC e STEC foram realizadas amplificações por PCR. Para tal, um total de 5  $\mu\text{L}$  de amostras de DNA foi adicionado em 45  $\mu\text{L}$  da mistura de PCR, consistindo de 200  $\mu\text{M}$  DNTPs (1  $\mu\text{L}$ ) (*for each deoxynucleoside triphosphates – dATP, dCTP, dGTP and dTTP*) (Promega Corporation, USA), 10 pmol de cada “*primer*” (0,8  $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen, USA), 25 mM  $\text{MgCl}_2$  (6  $\mu\text{L}$ ) (Promega Corporation, USA), 5 $\times$  Green GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer (10  $\mu\text{L}$ ) (Promega Corporation, USA), 5U. $\mu\text{L}^{-1}$  GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polymerase (0,25  $\mu\text{L}$ ) (Promega Corporation, Madison WI, USA). Água MilliQ foi adicionada até completar o volume total.

Amplificações dos genes específicos foram conduzidas em Termociclador Veriti 96 “*Well Thermal Cycler*,” mod. 9902 (Applied Biosystems, USA). Os ciclos consistiram de um estágio inicial a 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos, cada um contendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos (56°C para o gene *bfp*), e extensão a 72°C por 30 segundos. O ciclo de extensão final foi a 72°C por 7 minutos. A descrição dos “*primers*” encontra-se na Tabela 1.

Produtos amplificados pela reação de PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose a 1,8% (GIBCO BRL – Life Technologies, EUA) em TBE 0,5x (para 5 X, 54,0 g Tris; 3,72 g EDTA [Na<sub>2</sub>], 27,5 ácido g bórico, 800 mL de água MilliQ, pH 8,1). A eletroforese foi realizada em cuba eletroforética Pharmacia Biotech (max submarine unit HE 99 X), com fonte Pharmacia Biotech (EPS 300) nas condições de 150 V por 1 hora e 30 minutos. O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, EUA). Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e visualizados em transiluminador UV (Major Science, USA), fotografados (Sistema de Documentação Digital Digidoc-BA c/camera digital colorida, BIOAGENCY INT) e analisados.

Tabela 1. Lista de “primers” utilizados nas reações de PCR

<i>Primers</i>	Sequência de oligonucleotídeos (Primer) (5'→3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>STa</i> – F	TCCGTGAAACAACATGACGG	244	SALVADORI et al. (2003)
<i>STa</i> – R	ATAACATCCAGCACAGGCAG		
<i>LT II</i> - F	AGATATAATGATGGATATGTATC	300	SALVADORI et al. (2003)
<i>LT II</i> –R	TAACCCTCGAAATAAATCTC		
<i>stx<sub>1</sub></i> – F	AGAGCGATGTTACGGTTTG	388	CHINA, PIRSON e MAINIL (1996)
<i>stx<sub>1</sub></i> –R	TTGCCCCAGAGTGGATG		
<i>stx<sub>2</sub></i> – F	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807	CHINA, PIRSON e MAINIL (1996)
<i>stx<sub>2</sub></i> – R	GACATTCTGGTTGACTCTCTT		
<i>eae</i> – F	AGGCTTCGTCACAGTTG	570	CHINA, PIRSON e MAINIL (1996)
<i>eae</i> – R	CCATCGTCACCAGAGGA		
<i>bfp</i> – F	GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT	300	VIDAL et al. (2004)
<i>bfp</i> – R	GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT		

## 5.6 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

As estirpes isoladas foram repicadas em tubo contendo 3 mL de caldo BHI (Himedia, Índia), incubadas a 37°C por 24 horas, transferidas para tubos contendo solução salina (NaCl 150 mM) e padronizadas em 0,5 da escala de MacFarland. Após a incubação, a suspensão foi semeada com o auxílio de suabe estéril em placa contendo ágar Mueller-Hinton (Himedia, Índia) e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio de cultura, foram colocados os discos contendo os antimicrobianos (BAUER et al., 1966).

Os antimicrobianos testados foram selecionados pela utilização na bovinocultura, sendo eles: ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), sulfametoxazol+trimetoprim (25 µg) e ácido nalidíxico (30 µg).

Realizou-se a leitura por meio da medida dos halos de inibição, com o auxílio de paquímetro. Os diâmetros foram comparados com o guia estabelecido pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2013). Como controle de qualidade, foram realizados, também, testes utilizando-se a cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922.

Pensando-se na determinação do fator multirresistência, foi utilizado o índice MAR (múltipla resistência a antimicrobianos), que é definido pelo exemplo “a/b”, em que “a” é o número de antimicrobianos aos quais o isolado apresentou resistência e “b” equivale ao número de antimicrobianos aos quais o isolado foi testado (KRUMPERMAN, 1983).

### **5.6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) - Antimicrobianos**

Para determinação da CIM, foi utilizada a técnica do Etest (Epsilometer test, Biomérieux Ltda.), em que fitas finas e inertes contendo os antimicrobianos gentamicina (10 µg) e sulfametoxazol+trimetoprim (25 µg), em escalas calibradas indicando a concentração das drogas, foram colocadas sobre o inóculo. As estirpes isoladas foram preparadas conforme o antibiograma descrito no item anterior (CLSI, 2013). Após incubação e crescimento microbiano, os halos de inibição foram inspecionados, observando-se o ponto de intersecção da elipse (CLSI, 2013).

### **5.7 Identificação sorológica**

As amostras de *E. coli* foram identificadas através da pesquisa do antígeno O (sorogrupo). A sorologia foi realizada por meio da técnica de aglutinação em lâmina. Os antissoros testados foram os polivalentes da Probac (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda), como segue:

Polivalente A: anticorpos para os sorogrupos de *E. coli* O26, O55, O111 e O119.

Polivalente B: anticorpos para os sorogrupos de *E. coli* O114, O125, O142 e O158.

Polivalente C: anticorpos para os sorogrupos de *E. coli* O86, O126, O127 e O128.

Estas mesmas estirpes foram também testadas com antissoro específico O157. A fim de se evitar reações cruzadas, inicialmente foram utilizados os soros polivalentes A e B, e não ocorrendo aglutinação, foi utilizado o soro polivalente C.

### **5.8 Obtenção dos extratos hidro alcoólicos vegetais**

Os extratos fluídos hidro alcoólicos testados foram os de assa peixe (*Vernonia polyanthes*), sálvia (*Salvia officinalis*), alho (*Allium sativum*), macela (*Achyrocline satureoides*), sete sangrias (*Cupheae carthagenensis*) e picão preto (*Bidens pilosa*). Os mesmos foram obtidos comercialmente (Bio Tae, Indústria e Comércio de Insumos Farmacêuticos, Cosméticos e Alimentícios Ltda, Tatuí, SP, Brasil e Aksy Comercial Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e armazenados de acordo com as recomendações do fabricante.

Para o processo de rotaevaporação do solvente, em aparelho de evaporação rotativa (Evaporador Rotativo – modelo 802 – marca Fisatom Equipamentos Científicos Ltda – São Paulo/SP – Brasil), 500 mL do extrato foi colocado em um balão de vidro acoplado ao suporte de levantamento rápido e submetido a banho-maria em temperatura controlada entre 50-60°C, com rotação e pressão constante de 40 rpm e 500 mmHg respectivamente. O extrato foi mantido nas condições citadas até a total remoção do solvente, evidenciada pela interrupção da liberação de álcool no balão de recolhimento do condensador. Após o término, o extrato foi transferido para um frasco de polietileno, devidamente identificado, e armazenado à temperatura de -20°C para avaliar a eficácia do método por meio do congelamento (BRASIL, 2010).



Posteriormente, seguiu-se a liofilização, na qual os extratos submetidos à evaporação rotativa foram distribuídos em frascos de vidro, tipo penicilina (50 mL), previamente identificados e pesados em balança analítica. Os frascos destampados foram dispostos no liofilizador (Liofilizador Christ – modelo Beta 2-16) por sete dias para total retirada da água, obtendo como resultado alíquotas em pó. Após o término da liofilização, os frascos foram rapidamente tampados e lacrados, evitando-se ao máximo a absorção de umidade. Em seguida, foram pesados em balança analítica para o cálculo da massa obtida.

### **5.8.1 Triagem – Extrato vegetal**

Em busca da inicial comprovação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais frente aos isolados, realizou-se a técnica de triagem. Para cada frasco tipo penicilina (50 mL), após pesagem final e confirmação da massa obtida, preparou-se diluição específica, com água estéril, para obtenção da concentração desejada. As concentrações utilizadas foram as de 150, 100 e 50 mg/mL, sendo o limiar máximo decidido após verificação literária da inviabilidade de concentrações maiores para estudo, pois a procura científica pretende sempre englobar valores mínimos eficazes, diminuindo riscos toxicológicos para hospedeiros.

Os isolados foram repicados em tubo contendo 3 mL de caldo BHI, incubadas a 37°C por 24 horas, transferidas para tubos contendo solução salina (NaCl 150 mM) e padronizadas em 0,5 da escala de MacFarland. Após, a suspensão foi semeada com o auxílio de suabe estéril nas respectivas placas.

Em placas descartáveis estéreis, contendo ágar Mueller Hinton (Himedia, Índia), foram perfurados poços com o auxílio de perfuradores metálicos. Em cada exemplar, cinco poços, sendo eles para as seguintes finalidades: três contendo as concentrações de pesquisa (150 mg/mL, 100 mg/mL e 50 mg/mL), um controle positivo (clorexidina 0,12%) e um controle negativo (água estéril). As soluções de extratos vegetais foram depositadas até a borda dos poços, totalizando 200 µL em cada, para total contato com a bactéria inoculada. Esperaram-se alguns minutos, até a absorção dos líquidos pelo ágar, seguido de incubação a 37°C por 24 horas.

Resultados positivos caracterizaram-se por meio da formação de halos de inibição de crescimento (CLSI, 2013).

### **5.8.2 Determinação da CIM – Extrato vegetal**

Previamente aos ensaios, os isolados foram repicados em tubo contendo 3 mL de caldo BHI, incubadas a 37°C por 24 horas, transferidas para tubos contendo solução salina (NaCl 150 mM), padronizadas em 0,5 da escala de MacFarland e diluídas em 1:10. Os extratos, mediante preparação de solução padrão com concentração inicial (50 mg/mL), foram esterilizados por filtração (filtros Millipore 0,22 µm) e armazenados em microtubos de 2 mL estéreis à temperatura de -70°C.

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos frente às estirpes bacterianas foi investigada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo-se diretrizes da CLSI (2013). As concentrações testadas abrangeram a escala de 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78; 0,39; 0,195; 0,097; 0,05; 0,025 e 0,012 mg.mL<sup>-1</sup>. Para os testes, empregaram-se placas de microdiluição com múltiplos poços.

Durante os ensaios, alíquotas de 10 µL dos inóculos foram dispensadas nos poços, estes já contendo 100 µL/poço de caldo Mueller Hinton (Himedia, Índia), 2x concentrado, e diferentes concentrações do extrato a ser testado (Figura 2). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A interpretação dos resultados foi realizada por meio da leitura visual das placas de ensaio, considerando-se a presença ou a ausência de turvação, comparativamente aos controles positivo e negativo. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que impediu o crescimento bacteriano, caracterizado pela turvação no poço (CLSI, 2013).

Os poços de A até F e de G até L correspondem ao Controle de Crescimento I [10 $\mu$ L de suspensão-padrão (inóculo de trabalho) + 100 $\mu$ L de caldo Mueller Hinton estéril, isento de extrato] e Controle de Esterilidade (Caldo Mueller Hinton estéril), respectivamente.

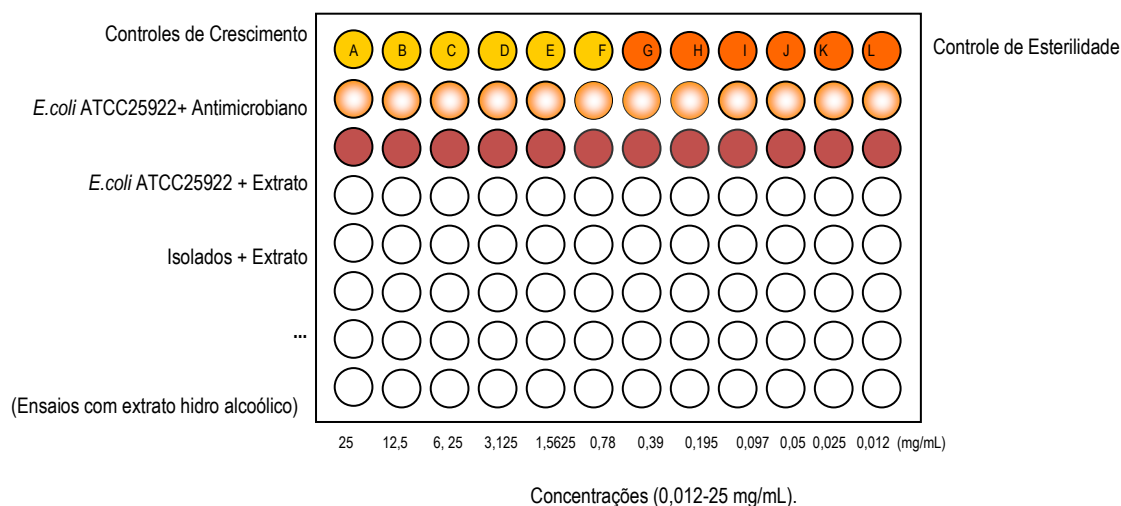


Figura 2. Metodologia de Microdiluição em caldo - CIM para extratos vegetais em placas de 96 poços.

### 5.8.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) – Extrato vegetal

A CBM foi determinada a partir de poços em que, após incubação não apresentaram nenhuma turbidez, ou seja, concentrações maiores que a CIM. Destes, foi transferido uma alíquota de 10  $\mu$ L para a superfície de placas de Petri contendo ágar Hicrome *E. coli* (Himedia, Índia), as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, a menor concentração do extrato que não proporcionou o crescimento bacteriano característico foi considerada como sendo a concentração bactericida mínima (CBM) (CLSI, 2013). Todos os ensaios relacionados aos extratos foram realizados em triplicata.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Detecção dos patótipos de *E. coli*

Do total de 100 amostras analisadas, pertencentes aos animais diarreicos, foram isoladas 36 estirpes virulentas, positivas para pelo menos um dos genes procurados. Referente aos animais sem diarreia, identificou-se 9 isolados positivos. A tabela abaixo relaciona as fazendas de origem amostral aos perfis genéticos dos isolados (Tabela 2 e Tabela 3). O gene LT-II não foi encontrado na presente análise.

Tabela 2. Perfil genético associado aos patótipos de *E. coli* STEC, ETEC e EPEC em amostras fecais oriundas de bezerros diarreicos

Animais com diarreia				
Isolados	Amostra	Propriedade	Patótipo	Fatores virulência
1	25 C	4	EPEC	<i>eae</i>
2	25 C	4	EPEC	<i>eae</i>
3	26 C	4	EPEC	<i>eae</i>
4	26 C	4	EPEC	<i>eae</i>
5	28 C	4	EPEC	<i>eae</i>
6	28 C	4	EPEC	<i>eae</i>
7	33 C	4	EPEC	<i>eae</i>
8	33 C	4	EPEC	<i>eae</i>
9	11 C	4	EPEC	<i>bfp</i>
10	14 C	4	EPEC	<i>eae + bfp</i>
11	88 C	4	ETEC	<i>Stx</i>
12	10 C	4	STEC	<i>stx1</i>
13	22 C	4	STEC	<i>stx1</i>
14	24 C	4	STEC	<i>stx1</i>
15	32 C	4	STEC	<i>stx1</i>
16	43 C	4	STEC	<i>stx1</i>
17	72 C	4	STEC	<i>stx2</i>
18	5 C	1	STEC	<i>stx2</i>
19	61 C	1	STEC	<i>stx2</i>
20	12 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
21	13 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
22	23 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
23	30 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
24	18 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
25	19 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
26	20 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
27	34 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
28	35 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
29	44 C	4	STEC	<i>stx1 + eae</i>
30	56 C	4	STEC	<i>stx1 + eae</i>
31	57 C	4	STEC	<i>stx2 + eae</i>
32	4 C	2	STEC	<i>stx2 + eae</i>
33	36 C	3	STEC	<i>stx1 + stx2 + eae</i>
34	58 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2 + eae</i>
35	60 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2 + eae</i>
36	74 C	4	STEC	<i>stx1 + stx2 + eae</i>

\*C: com diarreia.

Tabela 3. Perfil genético associado ao patótipo STEC em animais sem diarreia.

Animais sem diarreia				
Isolados	Amostra	Propriedade	Patótipo	Fatores virulência
1	10 S*	4	STEC	<i>stx1</i>
2	22 S	4	STEC	<i>stx1</i>
3	43 S	4	STEC	<i>stx1</i>
4	47 S	4	STEC	<i>stx2</i>
5	58 S	4	STEC	<i>stx2</i>
6	59 S	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
7	63 S	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
8	69 S	4	STEC	<i>stx1 + stx2</i>
9	99 S	2	STEC	<i>stx1 + stx2</i>

\*S: sem diarreia

## 6.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados relacionados à susceptibilidade revelaram alta porcentagem de estirpes resistentes frente aos antimicrobianos testados. Os dados referentes ao perfil de resistência dos isolados oriundos de animais acometidos e não acometidos encontram-se nas Tabela 4 e Tabela 5 respectivamente. A demonstração dos valores em porcentagens pode ser observada nas Figuras 3 e 4.

Tabela 4. Perfil de resistência aos antimicrobianos - isolados animais diarreicos

Animais com diarreia		
Isolados	Propriedade	Perfil de Resistência
1	4	GEN, EST, TET, AMP, SUT, NIT, CFL
2	4	GEN, EST, TET, NAL, CIP, AMP, SUT, NIT, CFL
3	4	**
4	4	GEN, EST, TET, NAL, CIP, AMP, SUT, NIT, CFL
5	4	**
6	4	**
7	4	EST, TET, AMP, SUT, NIT, CFL
8	4	GEN, EST, TET, NAL, CIP, AMP, SUT, NIT, CFL
9	4	GEN, EST, TET, NAL, AMP, CIP, SUT, CFL
10	4	TET, AMP, SUT, NIT, CFL
11	4	**
12	4	EST, TET, NAL, AMP, CIP, SUT, NIT, CFL
13	4	GEN, EST, TET, AMP, CLO, SUT, NIT, CFL
14	4	**
15	4	EST, TET, NAL, CIP, SUT, CFL
16	4	**
17	4	EST, TET, NAL, AMP, CLO, SUT, CFL
18	1	EST, TET, AMP
19	1	GEN, EST, TET, AMP
20	4	GEN, EST, TET, NAL, CLO, AMP, CIP, SUT
21	4	EST, TET, AMP, CLO, SUT, CFL
22	4	GEN, EST, TET, NAL, CLO, AMP, SUT, NIT, CFL
23	4	GEN, EST, TET, NAL, AMP, CIP, SUT, NIT, CFL
24	4	EST, TET, AMP, CLO, SUT, NIT, CFL
25	4	EST, TET, NAL, NIT
26	4	GEN, EST, TET, AMP, SUT, NIT, CFL
27	4	**
28	4	**
29	4	GEN, EST, TET, NAL, AMP, CIP, NIT, CFL
30	4	EST, TET, NAL, AMP, CLO, CIP, SUT, CFL
31	4	EST, TET, NAL, CLO, AMP, CIP, SUT, CFL
32	2	EST, CFL, AMP, NIT
33	2	EST, GEN, TET, CLO, AMP, SUT, NIT, CFL
34	4	GEN, EST, TET, NAL, CLO, AMP, CIP, SUT, CFL
35	4	EST, TET, NAL, CLO, AMP, CIP, SUT, NIT, CFL
36	4	**

\*(GEN – gentamicina, EST – estreptomicina, TET – tetraciclina, NAL – ácido nalídixico, CLO – cloranfenicol, AMP – ampicilina, CIP – ciprofloxacina, SUT - sulfametoxazol+trimetoprim, NIT – nitrofurantoína, CFL – cefalotina). \*\* Resistência a todos os antimicrobianos testados.

Tabela 5. Perfil de resistência aos antimicrobianos - isolados animais sem diarreia

Isolados - Animais sem diarreia		
Isolados	Propriedade	Perfil de Resistência
1	4	EST, TET, CFL
2	4	GEN, EST, TET, CFL
3	4	EST, TET, AMP, CFL
4	4	EST, TET, AMP, CFL
5	4	GEN, EST, TET, CFL
6	4	GEN, EST, TET, AMP
7	4	EST, TET, AMP
8	4	**
9	2	**

\*(GEN – gentamicina, EST – estreptomicina, TET – tetraciclina, NAL – ácido nalídixico, CLO – cloranfenicol, AMP – ampicilina, CIP – ciprofloxacina, SUT - sulfametoxazol+trimetoprim, NIT – nitrofurantoína, CFL – cefalotina). \*\* Resistência a todos os antimicrobianos testados.

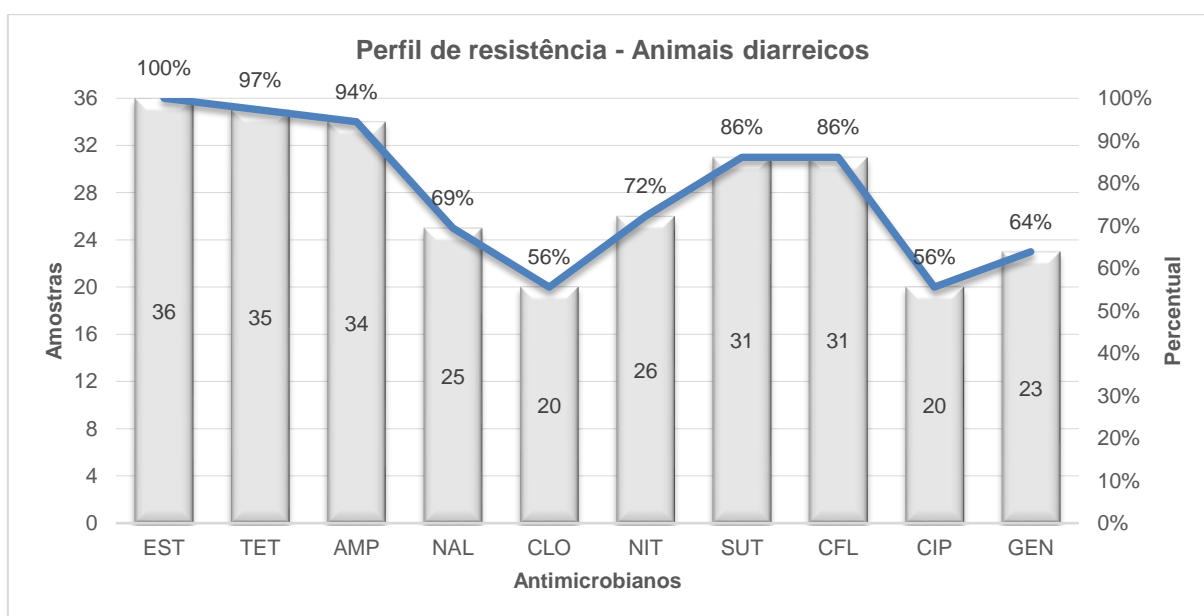


Figura 3. Gráfico de porcentagem de isolados oriundos de animais diarreicos resistentes aos antimicrobianos testados (GEN – gentamicina, EST – estreptomicina, TET – tetraciclina, NAL – ácido nalídixico, CLO – cloranfenicol, AMP – ampicilina, CIP – ciprofloxacina, SUT - sulfametoxazol+trimetoprim, NIT – nitrofurantoína, CFL – cefalotina).



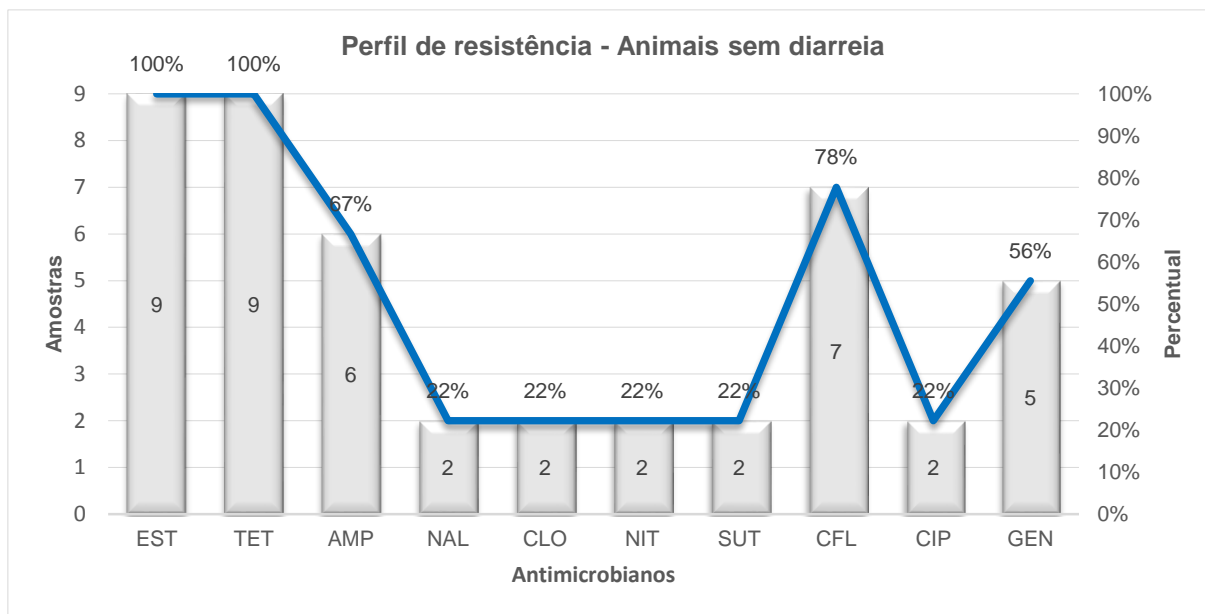


Figura 4. Gráfico de porcentagem de isolados oriundos de animais sem diarreia resistentes aos antimicrobianos testados (GEN – gentamicina, EST – estreptomicina, TET – tetraciclina, NAL – ácido nalídixico, CLO – cloranfenicol, AMP – ampicilina, CIP – ciprofloxacina, SUT - sulfametoxazol+trimetoprim, NIT – nitrofurantoína, CFL – cefalotina).

Com relação ao índice MAR (múltipla resistência a antimicrobianos), observou-se que dos 45 isolados analisados, 3 (6,7%) apresentaram índice MAR 0,3 (resistência a três antimicrobianos), 8 (17,8%) apresentaram MAR 0,4 (resistência a quatro antimicrobianos), 1 (2,2%) apresentou MAR 0,5 (resistência a cinco antimicrobianos), 3 (6,7%) apresentaram MAR 0,6 (resistência a seis antimicrobianos), 4 (8,9%) apresentaram MAR 0,7 (resistência a sete antimicrobianos), 8 (17,8%) apresentaram MAR 0,8 (resistência a oito antimicrobianos), 7 (15,5%) apresentaram MAR 0,9 (resistência a nove antimicrobianos) e 11 (24,4%) apresentaram MAR 1 (resistência a dez antimicrobianos, ou seja, a todos aos quais foram expostos).

### **6.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) - Antimicrobianos**

Para aqueles isolados classificados como resistentes no antibiograma, foi realizado o Etest para mensurar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), valor mínimo capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para gentamicina (10 µg), foram encontrados os seguintes valores: 24 µg/mL, 38 µg/mL, 48 µg/mL e 64 µg/mL. Para sulfametoxazol+trimetoprim (25 µg), todos foram resistentes à escala de graduação da droga presente na fita; não havendo, portanto, formação de elipse de inibição.

### **6.4 Determinação de sorogrupos O dos isolados de *E.coli***

Do total de isolados analisados, houve reagentes positivos para os antissoros polivalentes A, B e C. O antissoro específico O157 não foi detectado (Tabela 6).

Tabela 6. Relação de isolados e respectivos dados sorológicos

<b>Animais com diarreia</b>		
Isolados	Propriedade	Sorogrupo
1	4	A*
2	4	A
3	4	A
4	4	A
5	4	A
6	4	A
7	4	C
8	4	C
9	4	B
10	4	B
11	4	NT
12	4	C
13	4	NT
14	4	NT
15	4	NT
16	4	NT
17	4	NT
18	1	NT
19	1	C
20	4	A
21	4	A
22	4	B
23	4	B
24	4	C
25	4	C
26	4	NT
27	4	NT
28	4	NT
29	4	C
30	4	C
31	4	B
32	2	B
33	2	A
34	4	B
35	4	C
36	4	C
<b>Animais sadios</b>		
1	4	A
2	4	C
3	4	NT
4	4	A
5	4	A
6	4	A
7	4	A
8	4	C
9	2	NT

\*Antissoros polivalentes (A-O26, O55, O111, O119; B-O114, O125, O142, O158; C-O86, O126, O127, O128) / NT: não tipável.

## 6.5 Atividade antimicrobiana – Extratos vegetais

Nos testes de susceptibilidade utilizando-se extratos vegetais, os 45 isolados positivos aos testes moleculares anteriores mostraram-se sensíveis (presença de halos de inibição, conforme figura 5) somente frente ao extrato hidro alcólico de *Salvia officinalis* L. (sálvia), com medições dos halos entre 13 e 22 mm. Sendo, com este, realizados demais testes para confirmar possíveis concentrações inibitórias e microbicidas. Na triagem, verificação qualitativa, foi possível observar halos para todas as concentrações testadas.

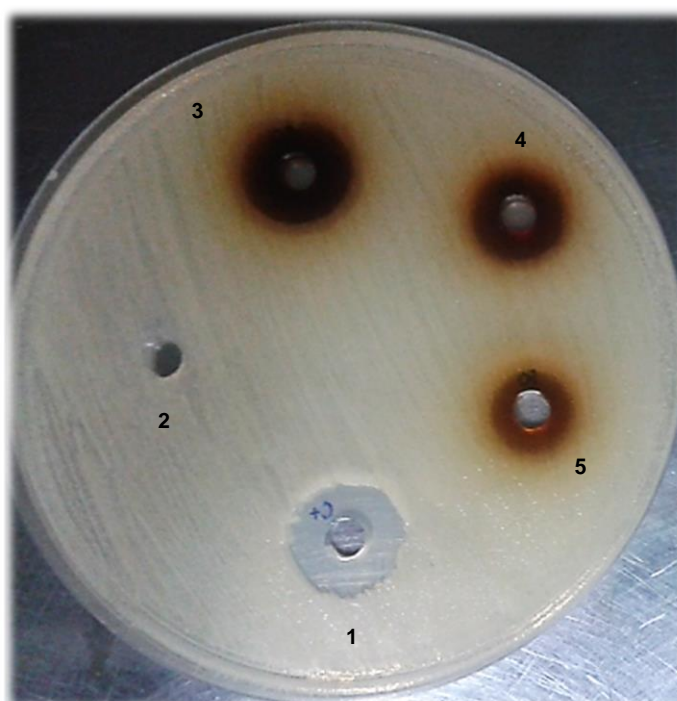


Figura 5 – Triagem. 1- Controle positivo (clorexidina 0,12%), 2 – Controle negativo (água estéril), 3 – Concentração 150 mg/mL, 4 - Concentração 100 mg/mL e 5 - Concentração 50 mg/mL.

Para o teste de microdiluição em caldo em placas de múltiplos poços, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para isolados pertencentes a animais acometidos e, também, a animais não acometidos. Houve inibição do crescimento bacteriano a partir da concentração 3,125 mg/mL (mínima capaz de

inibição), seguidas das demais concentrações em ordem crescente (6,25 mg/mL; 12,5 mg/mL e 25 mg/mL).

Na determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), alíquotas das concentrações em que houve ausência de turbidez no teste anterior foram inoculadas em placas contendo ágar. Após incubação, houve crescimento bacteriano para todas as concentrações testadas.

## 7 DISCUSSÃO

A diarreia é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade de bezerros neonatos em diferentes localidades no mundo e vários autores têm relatado a ocorrência de *E. coli* patogênicas em rebanhos bovinos (BONARDI et al., 2015; SHAHRANI; DEHKORDI; MOMTAZ, 2014; MOURA et al., 2012). No presente trabalho, foram identificados isolados positivos, após análise por PCR, aos fatores de virulência relacionados aos patótipos ETEC, EPEC e STEC. Em trabalho realizado por Gregory et al. (2014), verificando a ocorrência de agentes bacterianos em fezes diarreicas de bezerros búfalos nos Estados de São Paulo e Paraná, constatou-se alta incidência de *E. coli*, em 97,8% (45/46) das amostras. Após análise genética, dois isolamentos apresentaram STEC. Mostrando-se, assim, a importância da identificação genética confirmatória de estirpes virulentas visto que a bactéria em questão é habitante natural da microbiota intestinal de ruminantes e sendo, portanto, comensal e comumente encontrada nas fezes.

Referente às amostras obtidas de animais sem diarreia, também foram identificadas estirpes patogênicas. Neste contexto, vale ressaltar a relevância de também estudar microbiológica e geneticamente isolados bacterianos de animais não acometidos visto que ruminantes são importantes reservatórios e possíveis fontes de infecção do patótipo STEC (KONEMAN et al., 2001). Moura et al. (2012) identificaram bactérias patogênicas classificadas como STEC em seu estudo, tanto em bezerros neonatos não diarreicos quanto em diarreicos. Porcentagens positivas acima de 40% de detecção foram constatadas para ambos os casos. Diferentemente, no estudo desenvolvido por Ok et al. (2009), de 18 isolados de *E. coli* oriundos de bezerros sem diarreia, nenhum foi positivo para genes associados às toxinas *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>.

Quanto aos resultados encontrados por Moura et al. (2012), também foram reportados isolados portadores positivos para os genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *eae* concomitantemente, revelando o agravamento pela verificação de mais de um fator de virulência. É sabido que isolados STEC podem albergar a ilha de patogenicidade homóloga à LEE (“*Locus of Enterocyte Effacement*”) de EPEC e provocarem lesões

tipo “*attaching and effacing*”, codificadas pelo gene *eae* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Pereira et al. (2014) coletaram amostras fecais de vacas leiteiras de propriedades rurais do Estado de São Paulo. Por meio da extração de DNA e amplificação de genes, constataram-se estirpes carreadoras dos genes *stx*<sub>1</sub> somente (11,2%), *stx*<sub>2</sub> somente (12,1%), *eae* somente (5,6%), *stx*<sub>1</sub>+*stx*<sub>2</sub> (4,6%), *stx*<sub>1</sub>+*eae* (13,7%) e *stx*<sub>2</sub>+*eae* (8,4%). Altas taxas de resistência foram encontradas para os antimicrobianos penicilina e estreptomicina. Na pesquisa desenvolvida por Carvalho et al. (2012), foram isoladas 163 estirpes de *E. coli* a partir de suabes retais de bovinos em matadouros do Estado de São Paulo. Foi analisada a presença dos genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> por PCR, obtendo-se confirmação em 42,3% dos casos. Já Costa (2013), nos Estados do Rio de Janeiro e Rondônia, analisou amostras fecais de origem bovina e foram encontrados 167 isolados caracterizados molecularmente como STEC, carreadores do gene *stx*.

Assumpção et al. (2015) estudaram a ocorrência dos genes de virulência *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> em bactérias *E. coli* isoladas de bovinos adultos, especificamente vacas em lactação. Do total de amostras obtidas, 16% carregavam *stx*<sub>1</sub>, 17,3% *stx*<sub>2</sub> e 6,6% ambos. Na África do Sul, estirpes STEC foram isoladas de fazendas leiteiras, sendo observados 44% dos isolados carreadores de *stx*<sub>1</sub>, 45,3% de *stx*<sub>2</sub> e 10,7% de *stx*<sub>1</sub>+*stx*<sub>2</sub> (IWERIEBOR et al., 2015).

Noll et al. (2015), após análise de amostras fecais de bovinos em confinamento, detectaram aquelas classificadas como STEC, sendo destas, 94,1% positivas para o gene *stx*<sub>2</sub> e 64,4% para *stx*<sub>1</sub>. Em semelhança, na Itália, também a partir de fezes bovinas, identificou-se a predominância de genes relacionados às toxinas produzidas por STEC, em especial *stx*<sub>2</sub> (BONARDI et al., 2015). No Iran, oriundos de bezerros diarreicos, também foi evidenciada a constatação de estirpes STEC, possuidoras de genes *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>, isoladamente ou em concomitância (SHAHRANI; DEHKORDI; MOMTAZ, 2014).

Akihama et al. (2015) também observaram isolados STEC, como também os patótipos ETEC e EPEC, sendo detectados os genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, ST, LT e *eae* respectivamente. Tais patógenos estão associados a doenças de caráter zoonótico e consistem em um problema de saúde pública. STEC estão relacionadas à colite

hemorrágica e a síndrome hemolítico urêmica em humanos. Já EPEC e ETEC, a diarreicas em crianças em países em desenvolvimento, como também a casos de gastroenterites e surtos alimentares. O contato entre homem e animal pode ocorrer por meio de alimentos manipulados inadequadamente e até mesmo irrigados com água contaminada por resíduos fecais (BONARDI et al., 2015).

No presente trabalho, em semelhança a Carvalho et al. (2012), não foram detectadas estirpes O157. Porém, Stella et al. (2012) identificaram dois isolados provenientes de amostras fecais bovinas pertencentes ao sorotipo O157:H7. É confirmado que infecções por estirpes não O157 são cada vez mais prevalentes, inclusive os sorogrupos O26 e O111, que já foram envolvidos com graves surtos e enfermidades em humanos (RIGOBELLO et al., 2006; BONARDI et al., 2015).

Existe frequente preocupação científica quanto ao aparecimento de isolados resistentes a várias classes de antimicrobianos. Com relação ao índice MAR, foram verificadas altas taxas de resistência, analisando-se numericamente a quantidade de estirpes e a de antimicrobianos aos quais foram expostas. Na Turquia, Güler, Gündüz e Ok (2008) identificaram, entre bactérias *E. coli* oriundas de amostras de bezerros diarreicos, estirpes carreadoras dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *eae*, de forma isolada ou concomitante. Ainda, constataram a presença do gene *Stx* em alguns exemplares. Além disso, foi realizada a determinação da susceptibilidade bacteriana a 14 agentes antimicrobianos. Em 77,3% dos isolados, a multirresistência foi detectada. Altas taxas de resistência foram identificadas para cefalotina (72%), tetraciclina (69,3%), ampicilina (65,3%), ácido nalídixico (53,3%) e sulfametoxazol+trimetropim (52%). Os resultados, assim como os presentes, evidenciam a relevância de estudar a multirresistência e caminhos para o seu controle.

Verdier et al. (2012) isolaram *E. coli* enteropatogênicas de bezerros neonatos diarreicos. De 95 estirpes testadas frente a antimicrobianos, 61% foi resistente a um ou mais e 28% apresentou resistência a classes variadas, principalmente na concomitância de estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina. Gow et al. (2008), no Canadá, obtiveram isolados de *E. coli* provenientes de bezerros de corte. Após testes de susceptibilidade, as bactérias foram mais comumente resistentes à



tetraciclina, sulfametoxazol e estreptomicina. A resistência a pelo menos um antimicrobiano foi identificada em 48,8% dos casos.

Shahrani, Dehkordi e Momtaz (2014), após avaliação do perfil de resistência de STEC provenientes de bezerros com diarreia, identificaram considerável percentual de resistência à penicilina (100%), estreptomicina (98,25%), tetraciclina (98,09%), cloranfenicol (73,8%), ampicilina (71,11%), trimetoprim (62,22%) e ciprofloxacina (60,31%). Já na pesquisa desenvolvida por Aslam, Standford e McAllister (2010), estirpes *E. coli* O157:H7 isoladas de bovinos em confinamento apresentaram, em evidência, resistência à tetraciclina (69%). No trabalho realizado por Amézquita-López et al. (2016), após a investigação de STEC O157 e não-O157 isoladas de bovinos, ovinos e aves, observou-se uma predominante resistência aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina e cloranfenicol.

Assumpção et al. (2015) também analisaram isolados STEC, estes provenientes de vacas leiteiras, e relataram elevado nível de resistência aos antimicrobianos testados (ampicilina, tetraciclina, trimetoprim, eritromicina, ácido nalidíxico, estreptomicina, novobiocina, lincomicina, penicilina e neomicina), além de perfis de multirresistência. Portanto, pesquisas na área são importantes visto que a disseminação de estirpes resistentes pode dificultar o tratamento animal ou até alcançar e promover doenças humanas.

Antimicrobianos como ampicilina, tetraciclina, cefalotina, ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina e sulfametoxazol+trimetoprim, assim como no presente estudo, foram testados contra STEC advindas de amostras fecais bovinas, sendo encontrada elevada prevalência de isolados multirresistentes (IWERIEBOR et al., 2015). Esses dados podem ser justificados, pois inúmeras classes de antibióticos são usadas na produção animal, como betalactâmicos, sulfonamidas, estreptomicinas, macrolídeos e quinolonas. No entanto, sabe-se que muitas destas intervenções não são realizadas para fins terapêuticos, e sim na tentativa de promoção do crescimento. Além da administração em excesso, tal manejo pode acarretar o surgimento de estirpes resistentes também pela excreção dos compostos no meio ambiente, gerando pressões seletivas em populações microbianas e influenciando a aquisição de genes de virulência e de resistência (WYRSCH et al., 2016).

Como alternativa ao tratamento, no decorrer das últimas décadas, tem se intensificado o interesse na utilização de substâncias naturais para a promoção da saúde humana e animal. Isto ocorre devido à crescente resistência aos antibióticos, reforçada pelo uso excessivo dos mesmos, o que tem incentivado as autoridades a considerar outras abordagens para combater micro-organismos (GOLESTANI et al., 2015). Como opção em casos de multirresistência, destaca-se o estudo do potencial antimicrobiano de vegetais, em suas mais variadas espécies e partes anatômicas. Este interesse tem seu fundamento na medicina popular, largamente conhecida e utilizada. Sabe-se que, no Brasil, cerca de 80% da população encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, sua prioritária fonte de recursos terapêuticos (DI STASI, 1996; RADÜNZ et al., 2010).

Neste trabalho, como resultado positivo quanto à ação antibacteriana por extratos vegetais, evidenciou-se os testes com a planta *Salvia officinalis* L. (sálvia). Os relatos científicos quanto à ação antimicrobiana desta planta ainda são mais evidentes na clínica médica humana, provavelmente, devido às suas atividades já conhecidas como antioxidante e anti-inflamatória. Atualmente, muitos dados a enfatizam, também, como antitumoral (GARCIA, 2014). Dessa forma, trabalhos referentes à área animal tornam-se, também, relevantes visto a existência de preocupantes zoonoses.

A atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais foi avaliada em estirpes bacterianas derivadas a partir de amostras de urina provenientes de indivíduos diagnosticados com infecção do trato urinário. *Salvia officinalis* L. apresentou ação inibitória superior quando comparada às demais, com 96% de eficácia contra *E. coli* (PEREIRA et al., 2004). Em contrapartida, Santurio et al. (2011), utilizando óleo essencial de sálvia em suas análises, não evidenciaram atividade antibacteriana frente aos micro-organismos avaliados, sendo estes, bactérias *E. coli* oriundas de amostras fecais provenientes de aves e bezerros sem diarreia. No trabalho de Delamare et al. (2007), o óleo essencial de sálvia foi efetivo contra os micro-organismos *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* e *Klebsiella oxytoca*.

Golestani et al. (2015) ressaltaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de sálvia contra linhagens padrão de *E. coli* O157:H7. Ainda, os autores

relataram, em especial, a importância do dado para a indústria avícola no combate à colibacilose, evidenciando a necessidade de mais ensaios experimentais e testes clínicos prévios ao uso vegetal. Na Grécia, contra isolados clínicos de *E. coli* resistentes a múltiplos fármacos, foi testado o óleo essencial de sálvia, obtendo-se CIM de 125 mg / mL (FOURNOMITI et al., 2015). Em outro trabalho, verificou-se ação inibitória do óleo de sálvia contra *E. coli* ATCC 25922 e dois isolados clínicos de *E. coli*, mostrando-se atividade eficaz suportada pelo aparecimento de diâmetros de escasso crescimento microbiano em placa (LIXANDRU et al., 2010). Entre todos os micro-organismos testados na pesquisa de Bozin et al. (2007), a atividade antibacteriana mais importante do óleo essencial de sálvia foi expressa em *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Enteritidis* e *Shigella sonnei*.

Pesquisadores verificaram redução na produção de biofilme por *P. aeruginosa* após incubação com o óleo essencial de sálvia (STOJANOVIĆ et al., 2016). Sookto et al. (2013), em seus testes, demonstraram a eficácia deste óleo essencial frente a linhagens padrões e clínicas de *Candida albicans*, com zona de inibição variando de 40,5 mm a 19,5 mm.

Como pode ser observado, existem inúmeras pesquisas referentes ao óleo essencial da planta, o que agrega valor a testes que utilizam outros tipos de extração, como a hidro alcóolica, pois existe variação na quantidade de compostos químicos dependentes da forma de obtenção do produto. Weckesser et al. (2007) avaliaram diferentes extratos hidro alcólicos, incluindo *Salvia officinalis L.*, frente a bactérias aeróbias, anaeróbias e leveduras e verificaram, especificamente, ação antimicrobiana deste vegetal, apresentando ação inibitória contra as bactérias *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Actinomyces viscosus* (KERMANS SHAH et al., 2014). Em outro estudo, com o objetivo de avaliar os efeitos clínicos do enxague bucal com o extrato de sálvia, relatou-se diminuição significativa de colônias de *S. mutans* (BEHESHTI-ROUY et al., 2015). Igualmente, isolados de *S. aureus* foram sensíveis aos extratos etanólico e metanólico da planta (KOZŁOWSKA et al., 2015; SNOWDEN et al., 2014).

Em fracionamento do extrato etanólico de sálvia, resultou-se no isolamento do composto antibacteriano mais ativo, o qual, a partir de dados químicos, foi classificado como um diterpeno, metabólito secundário da classe dos terpenos

(CLIMATI et al., 2013). Os efeitos sinérgicos antibacterianos entre extratos de *Salvia officinalis* L. e antibióticos, como amoxicilina e cloranfenicol, também foram estudados. Na presença do extrato, os valores de CIM dos antibióticos foram reduzidos em 2 a 10 vezes (STEFANOVIĆ; STANOJEVIĆ; COMIĆ, 2012). Em outra pesquisa, um extrato obtido a partir das folhas de sálvia apresentou atividade antimicrobiana contra enterococos resistentes à vancomicina, *Streptococcus pneumoniae* e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e, após isolamento químico, identificou-se o composto eficaz, o ácido oleanólico, um triterpeno (HORIUCHI et al., 2007).

Intensificando-se relatos sobre a atividade antimicrobiana vegetal e tomando-se *E. coli* (ATCC 11229) como exemplo, extratos de *Salvia officinalis* L. (talos e folhas), inibiram o crescimento destes micro-organismos (CARVALHO; CRUZ; WIEST, 2005). Os autores também ressaltaram o evidente potencial deste vegetal como antimicrobiano, o que também foi demonstrado na atual pesquisa. Ao contrário, em outro estudo, para testes com cepas padrão *E. coli* ATCC 25922, maior quantidade de extrato de folha, flor e talo de sálvia foi necessário para conseguir efeitos antimicrobianos e concentração inibitória mínima satisfatória. Neste caso, na triagem, para as concentrações testadas pelos pesquisadores, não houve formação de halos de inibição (VELICKOVIC et al., 2003).

Para os resultados obtidos na atual pesquisa, quanto à Concentração Bactericida Mínima (CBM), houve crescimento bacteriano para todas as concentrações testadas. Lembrando-se que a CBM é definida como a menor concentração capaz de causar a morte microbiana. Este resultado pode indicar que o extrato estudado tenha a potencialidade de inibir o crescimento bacteriano em nível bacteriostático, causando estresse sub-letal do agente. Vale ressaltar, também, que os dados entre trabalhos podem variar de acordo com o método escolhido para a extração vegetal, bem como as concentrações de estudo, sendo todos os resultados válidos para o conhecimento científico visto ser uma avaliação qualitativa. Além, diferentes testes em busca de compostos com atividade antibacteriana são importantes devido à origem amostral dos isolados, representantes da diversidade genética microbiana, sendo todos os dados de extrema relevância.

## 8 CONCLUSÕES

- Estirpes de *E. coli* isoladas de bezerros diarreicos e sem diarreia apresentaram combinações de genes de virulência, caracterizando-as em patótipos STEC, EPEC e ETEC.
- A maior parte das estirpes isoladas possuíam mais de um fator de virulência, aumentando seu potencial de patogenicidade.
- Estirpes isoladas de animais sem diarreia também apresentaram genes de virulência para STEC, confirmando serem os bovinos importantes reservatórios deste patótipo.
- A elevada resistência dos isolados encontrados, provenientes de bezerros, sugere o uso indiscriminado de antimicrobianos em animais neonatos.
- Entre os extratos hidro alcóolicos fluídos vegetais testados, *Salvia officinalis* L. (sálvia) apresentou ação antibacteriana bacteriostática frente às estirpes isoladas, sendo estas já classificadas anteriormente como resistentes aos antimicrobianos avaliados.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados expostos neste trabalho, considerações importantes quanto à prática veterinária podem ser relatadas. Em relação à amostragem oriunda de animais neonatos e à resistência de isolados aos antimicrobianos verificada em altas taxas, sendo estes últimos de diferentes classes e mecanismos de ação, sugere-se a administração indiscriminada de medicamentos, talvez não focada somente no tratamento e sim, na prevenção errônea de enfermidades visando promover o crescimento animal.

Embora um assunto já abordado em inúmeros relatos científicos anteriores, ainda se vê a necessidade de os resultados laboratoriais atingirem os produtores de maneira efetiva para que a multirresistência microbiana a fármacos seja tratada com a relevância merecida e realmente como um problema de saúde pública. Os estudos podem ganhar ênfase por meio de palestras a campo, correlacionando o embasamento teórico por parte dos cientistas e o conhecimento prático dos trabalhadores rurais, adquirido diariamente durante o manejo. Assim, a prática rotineira nas propriedades pode ser passível de correções necessárias.

*E. coli* mostrou-se como um dos principais micro-organismos envolvidos em síndromes diarreicas na região de colheita e confirmações moleculares ressaltaram patótipos da bactéria em questão como causadores deste quadro. Assim, o isolamento microbiano é imprescindível para a escolha da melhor intervenção veterinária. Almejando, também, a não disseminação de estirpes resistentes. Além, bovinos não acometidos podem ser fontes de infecção e devem ser avaliados visto o potencial zoonótico de *E. coli*.

Com relação aos estudos com extratos de plantas, diferentes substâncias químicas com ação antimicrobiana podem ser identificadas, sendo prováveis novas drogas de combate aos patógenos no futuro. Avaliações microbiológicas preliminares são importantes para a constatação de dados visando outras análises fisiológicas, toxicológicas e químicas. Assim, novas e intermitentes pesquisas nesta área podem ainda ser realizadas.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR-UGRINOVICH, L. A.; ÁVILA, F. A.; OLIVEIRA, M. N.; CASTRO, A. F. P. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. **Revista Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 289-291, 2002.

AKIYAMA, Y.; SAITO, E.; FUTAI, H.; OGITA, K.; SAKAE, H.; FUKUNAGA, M.; TSUJI, H.; CHIKAHIRA, M.; MIMURA, M. Comprehensive study of pathogenic genes distributed in *Escherichia coli* isolated from cattle. **Food Hygiene and Safety Science**, v. 56, n. 3, p. 118-122, 2015.

ALMEIDA, A. K.; MICHELS, I. L. O Brasil e a economia-mundo: o caso da carne bovina. **Ensaio FEE**, v. 33, n. 1, p. 207-230, 2012.

AMÉZQUITA-LÓPEZ, B. A.; QUIÑONES, B.; SOTO-BELTRÁN, M.; LEE, B. G.; YAMBAO, J. C.; LUGO-MELCHOR, O. U.; CHAIDEZ, C. Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 e non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. **Antimicrobial Resistance and Infection Control** v. 1, n. 5, p.1-6, 2016.

ANDRADE, G. I.; SANTOS, E. L. S.; COURA, F.M.; CUNHA, A. A. S.; BARBOSA, A. F.; FALCÃO, M. M.; MOL, J. P. S.; FERREIRA, M. G.; FREITAS, M. D.; FILHO, E. F.; CARVALHO, A. U.; FERREIRA, P. M.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, M. P. PCR *multiplex* para determinação de marcadores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de bovinos com diarreia em Minas Gerais. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8, Suplemento 1, 2009, Belo Horizonte, Minas Gerais. **Anais...Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira**, 2009. p. 436-441.

ASHAFA, A. O. T.; AFOLAYAN, A. J. Screening the root extracts from *Bidens pilosa* L. var. *radiata* (Asteraceae) for antimicrobial potentials. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 8, p. 568-572, 2009.

ASLAM, M.; STANDFORD, K.; McALLISTER, T. A. Characterization of antimicrobial resistance and seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 recovered from commercial feedlots in Alberta, Canada. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 320-326, 2010.

ASSUMPÇÃO, G. L.H.; CARDOZO, M. V.; BERALDO, L. G.; MALUTA, R. P.; SILVA, J. T.; AVILA, F. A.; McINTOSH, D.; RIGOBELLO, E. C. Antimicrobials resistance patterns and the presence of *stx1*, *stx2* and *eae* in *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 2, p.308-316, 2015.

ÁVILA, F. A.; RIGOBELLO, E. C.; MALUTA, R. **Antibióticos, quimioterápicos e probiótico**. Jaboticabal: Funep, 2011, p. 5-6.

BANATVALA, N.; GRIFFIN, P. M.; BARRETT, T. J.; GREENE, K. D.; BIBB, W. F.; GREEN, J. H.; WELLS, J. G. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiologic findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 7, p. 1063-1070, 2001.

BARRETT, T. J.; LIOR, H.; GREEN, J. H.; KHAKHRIA, R.; WELLS, J. G.; BELL, B. P.; GREENE, K. D.; LEWIS, J.; GRIFFIN, P. M. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and phage typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, p. 303-317, 1994.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, abr. 1966.

BEHESHTI-ROUY, M.; AZARSINA, M.; REZAIIE-SOUFI, L.; ALIKHANI, M. Y.; ROSHANAIE, G.; KOMAKI, S. The antibacterial effect of sage extract (*Salvia officinalis*) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: a randomized clinical trial. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 173-177, 2015.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; GARABAL, J. I.; GONZÁLEZ, E. A. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. **Microbiologia SEM**, v. 7, n. 2, p. 57-73, 1991.

BLANCO, M., BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 9, p. 1446-1451, 1993.

BONARDI, S.; ALPIGIANI, I.; TOZZOLI, R.; VISMARRA, A.; ZECCA, V.; GREPPI, C.; BACCI, C.; BRUINI, I.; BRINDANI, F. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157, O26 and O111 in cattle faeces and hides in Italy. **Veterinary Record Open**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2015.



BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7879-7885, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed., v. 2, Brasília: Anvisa, 2010. 546p.

CARDOZO, M. V. **Detecção de *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em peixes de pisciculturas e de vida livre**. 2014. 77 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2014.

CARVALHO, A. F.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A. F. C, A.; NODA, A.; GABRIEL, D.T.; BALDASSI, L. Caracterização molecular e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de shiga-toxina (STEC) não-O157 de fezes e carcaças bovinas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 881-886, 2012.

CARVALHO, A. A. T.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; de MELO, A. F. M.; de SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; HIGINO, J. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-Negativas. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.25-32, 2005.

CDC, 2006. Centers for Disease Control and Prevention. **FoodNet surveillance report for 2004 (Final Report)**. 2006. 33p.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3462–3465, 1996.

CLIMATI, E.; MASTROGIOVANNI, F.; VALERI, M.; SALVINI, L.; BONECHI, C.; MAMADALIEVA, N. Z.; EGAMBERDIEVA, D.; TADDEI, A. R.; TIEZZI, A. Methyl carnosate, an antibacterial diterpene isolated from *Salvia officinalis* leaves. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 4, p. 429-430, 2013.

CLSI, 2013. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI Document M100-S23, Twenty-Third Informational Supplement**, v. 33, n. 1. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2013.

CNA - CONFEDERAÇÃO NACIONAL DE AGRICULTURA. **Análise do PIB das cadeias produtivas de algodão, cana-de-açúcar, soja, pecuária de corte e de leite no Brasil: desenvolvimento metodológico e cálculo do PIB das cadeias produtivas do algodão, cana-de-açúcar, soja, pecuária de corte e de leite no Brasil**. Brasília: CNA, 2012. 68 p. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/pib-cadeias-produtivas-web.pdf>>. Acesso em: 05 out. 2015.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada da CRMV-SP**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1998.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.

COSTA, C. M. S. **Caracterização molecular de amostras de *Escherichia coli* carreadoras dos genes stx isoladas de bovinos nos estados de Rondônia e do Rio de Janeiro**. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 5, p. 645-652, 1996.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Review**, v. 1, n. 2, p. 129-140, 2001.

DELAMARE, A. P. L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais, arte e ciência: Um guia prático de estudo interdisciplinar**. 1ª ed., São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

DRUMMOND, V. O. **Deteção de genes de enterotoxinas, caracterização bioquímica e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos do Distrito Federal**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M. SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, 2007.

ESCRIVÃO, S.C.; BASTIANETTO, E.; NASCIMENTO, E.F.; GHELLER, V.A.; AMARAL, F.R.; SERRANO, A.L. Primeiros cuidados na criação de bezerros bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 1, p. 46-48, 2005.

FERNANDES, J. C. T. Agentes etiológicos de mastite bovina no RS no período de 1972 – 1989. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS**, v. 20, n. 1, p. 150-163, 1992.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR A.; SILVA, E. N.; Di FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doença das aves**. 2ª ed. Campinas: FACTA, 2009. cap. 4.2, p. 457-471.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 11 ed., St. Louis: Mosby, 2002.

FOURNOMITI, M.; KIMBARIS, A.; MANTZOURANI, I.; PLESSAS, S.; THEODORIDOU I.; PAPAEMMANOUIL, V.; KAPSIOTIS, I.; PANOPOULOU, M.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. E.; ALEXOPOULOS, A. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, p. 1-7, 2015.

FROST, L.S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 722-732, 2005.

GAMEZ, H. A. J.; RIGOBELLO, E. C.; FERNANDES, S. A.; MARIN, J. M.; ÁVILA, F. A. Diarreia bovina: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados de bezerros da região de Ribeirão Preto – SP, Brasil. **ARS Veterinária**, v. 22, n.1, p.22-30, 2006.

GARCIA, C. S. C. **Salvia officinalis (Lamiaceae) Lin.: caracterização química, atividade citotóxica e apoptótica em células de mamíferos**. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

GOLESTANI, M. R.; RAD, M.; BASSAMI, M.; AFKHAMI-GOLI, A. Analysis and evaluation of antibacterial effects of new herbal formulas, AP-001 and AP-002, against *Escherichia coli* O157:H7. **Life Sciences**, v. 135, p. 22-26, 2015.

GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; WACHSMUTH, I. K.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Enteropathogens associated with acute diarrheal, diseases in urban infants in São Paulo, Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 2, p. 331-337, 1991.

GOW, S. P.; WALDNER, C. L.; RAJI'C, A.; MCFALL, M. E.; REID-SMITH, R. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* isolated in western Canadian cow-calf herds. Part I — Beef calves. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n.2, p. 82–90, 2008.

GRACE, Y.; WANG, H. H.; DAVIES, J. The truth about antibiotics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 163-170, 2006.

GREGÓRIO, G. Nova legislação de fitomedicamentos inclui plantas brasileiras. **Phytomédica**, v. 1, n. 1, p. 5, 2006.

GREGORY, L.; ROSSI, R. S.; MENDES, J. P. G.; NEUWIRT, N.; MARQUES, E. C.; MELVILLE, P. A.; MONTEIRO, B. M. Ocorrência dos principais agentes bacterianos e parasitários em fezes diarreicas de bezerros búfalos nos estados de São Paulo e Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 180-185, 2014.

GÜLER, L.; GÜNDÜZ, K.; OK, Ü. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. **Zoonoses Public Health**, v. 55, n. 5, p. 249-257, 2008.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4ed. New York: Wiley-Blackwell, 2010. p. 267-308.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1147-1149, 2007.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 450-465, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 63 p. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default.shtm>>. Acesso em: 05 out. 2015.

INDU, M. N.; HATHA, A. A. M.; ABIROSH, C.; HARSHA, U.; VIVEKANANDAN, G. Antimicrobial activity of some of the south-indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 153-158, 2006.

IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State. **Brazilian Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 29-36, 2005.

IWERIEBOR, B. C.; IWU, C. J.; OBI, L. C.; NWODO, U. U.; OKOH, A. I. Multiple antibiotic resistances among Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 in feces of dairy cattle farms in Eastern Cape of South Africa. **BMC Microbiology**, v. 213, n.15, p. 2-9, 2015.

JORGETTO, G. V.; BORIOLO, M. F. G.; SILVA, L. M.; NOGUEIRA, D. A.; JOSÉ, T. D. S.; RIBEIRO, G. E.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Analysis on the *in vitro* antimicrobial activity and *in vivo* mutagenicity by using extract from *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 53-61, 2011.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KENSCH, G. T.; ACHECON, D. W. K. Patógenos bacterianos entéricos invasivos e causadores de dano tecidual: Diarreia sanguinolenta e desinteria. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C. EINSESTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 161-171.

KERMANS SHAH, H.; KAMANGAR, S. S.; ARAMI, S.; KAMALINEGAD, M.; KARIMI, M.; MIRSALEHIAN, A.; JABALAMELI, F.; FARD, M. J. The effect of hydro alcoholic extract of seven plants on cariogenic bacteria - an *in vitro* evaluation. **Journal of Oral Health and Dental Management**, v. 13, n. 2, p. 395-401, 2014.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Anti-microbial activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerillia papuana* and *Sigesbekia orientalis*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 662-665, 2001.

KIRICI, S.; KAYA, D.A.; INAN, M. Effect of the different row arrangements on the bioagronomic properties and dye stuff content of *Arctium minus* (Hill) Bernh. subsp. pubens. "**Ovidius**" **University Annals of Medical Science - Pharmacy**, v. 2, n.2, p. 56-59, 2004.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 177-261.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2008. 1465p.

KOZŁOWSKA, M.; LAUDY, A. E.; PRZYBYL, J.; ZIARNO, M.; MAJEWSKA, E. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 72, n. 4, p. 757-767, 2015.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environment Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.

LANGONI, H.; LINHARES, A.C.; AVILA, F.A.; DA SILVA, A. V.; ELIAS, A. O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p.313-319, 2004.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L. A.; GUTH, E. E. C.; IRINO, K.; VETTORATO, M. P.; ONUMA, D. L.; CASTRO, A. F. P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and nondiarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 97, p. 103-109, 2003.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 3, p. 377-389, 1987.

LIXANDRU, B. E.; DRĂCEA, N. O.; DRAGOMIRESCU, C. C.; DRĂGULESCU, E. C.; COLDEA, I. L.; ANTON, L.; DOBRE, E.; ROVINARU, C.; CODITĂ, I. Antimicrobial activity of plant essential oils against bacterial and fungal species involved in food poisoning and/or food decay. **Roumanian Archives of Microbiology and Immunology**, v. 69, n. 4, p. 224-230, 2010.

LUBIAN, C.T.; TEIXEIRA, J.M.; LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; DEL PINO, F.A.B. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 157-162, 2010.

MACCORMICK, J. B. Epidemiology of emerging/rememerging antimicrobial resistant bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 125-129, 1998.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 312 p.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 278-282, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, C. A.; VEIGA, J. V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-38, 2002.

MAGALHÃES, H.; FREITAS, M. A. Q.; GONÇALVES, W. M.; SANTOS, J. A.; MEDEIROS, M. I. M.; COSTA, C. H. C.; VOLLÚ, E. W. Ocorrência, aspectos bacteriológicos e histopatológicos na colibacilose de bezerros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 555-564, abr. 1991.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. 220p.

MASSA, S.; GOFFREDO, E.; ALTIERI, K.; NATOLA, K. Fate of *Escherichia coli* O157 : H7 in unpasteurized milk stored at 8 °C. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 89-92, 1999.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp*. **Revista Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.

MIGUEL, P. R. R.; POZZA, M. S. S.; CARON, L. F.; ZAMBOM, M. A.; POZZA, P. C. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 403-416, 2012.

MOURA, C.; LUDOVICO, M.; VALADARES, G. F.; GATTI, M. S. V.; LEITE, D. S. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy feces of dairy calves in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 273-276, 2012.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1316-1318, 2007.

NASCIMENTO, G. G.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v. 14, n.2, p. 119-124, 2001.



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

NOLL, L. W.; SHRIDHAR, P. B; DEWSBURY, D. M; SHI, X.; CERNICCHIARO, N.; RENTER, D. G.; NAGARAJA, T. G. A comparison of culture and PCR based methods to detect six major non-O157 serogroups of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle feces. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1-12, 2015.

OK, M.; GÜLER, L.; TURGUT, K.; OK, U.; SEM, I.; GÜNDÜZ, I. K.; BIRDANE, M. F.; GÜZELBEKTEŞ, H. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **Zoonoses Public Health**, v. 56, n. 2, p. 94-101, 2009.

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

OLIVEIRA, M. G.; FEITOSA BRITO, J. R.; CARVALHO, R. R.; GUTH, B. E. C.; GOMES, T. A. T; VIEIRA, M. A. M.; KATO, M. A. M. F.; RAMOS, I. I.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of shiga toxin producing *Escherichia coli* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 5945-5948, 2007.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* serotyping and in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 699-704, 1992.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PATERSON, D.L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6A, p. S20-S28, 2006.

PEREIRA, M. C. S.; RIGUEIRO, A. L. N.; ONO, R. K.; RIGOBELLO, E. C. Avaliação dos padrões de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* portadoras e não portadoras dos genes stx1, stx2 e eae. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambientais**, v. 12, n. 4, p. 270-276, 2014.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PICKETT, C.L.; WEINSTEIN, D.L., HOLMES, R.K. Genetics of type IIa heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: operon fusions, nucleotide sequence and hybridization studies. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 11, p. 5180-5187, 1987.

PRATA, L. F. **Manual de Enfermidades Transmitidas por Alimentos** (Tradução e complementação editorial - "Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins"). Jaboticabal: Funep, 1999, p. 27-29.

PUENTE, J. L.; FINLAY, B. B. **Pathogenic *Escherichia coli***. In: Principles of bacterial pathogenesis. San Diego: Academic Press, 2001. p. 826.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 512.

RABE, T.; VAN STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 1, p. 81-87, 1997.

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

RADÜNZ, L. L.; MOSSI, A. J.; ZAKRZEWSKI, C. A.; AMARAL, A. S.; GRASSMANN, L. Análise da cinética de secagem de folhas de sálvia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 979-986, 2010.

RIGOBELLO, E. C.; GAMEZ, H. J.; MARIN, J. M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J. A.; de ÁVILA, F. A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 305-310, 2006.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; McGee, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; CHOEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia*

*coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

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

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed., Londres: CSHL Press, 2001, p.1448.

SANTURIO, D. F.; COSTA, M. M.; MABONI, G.; CAVALHEIRO, C. P.; SÁ, M. F.; DAL POZZO, M.; ALVES, S. H.; FRIES, L. L. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Revista Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

SCHULTSZ, C.; POOL, G. J.; van KETEL, R.; de WEVER, B.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stools samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2393-2397, 1994.

SERIWATANA, J.; ECHEVERRIA, P.; TAYLOR, D.N.; RASRINAUL, L.; BROWN, J. E.; PEIRIS, J. S.; CLAYTON, C. L. Type II enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1158-1161, 1988.

SHAHRANI, M; DEHKORDI, FS; MOMTAZ, H. Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. **Biological Research**, v. 28, n. 47, p. 1-13, 2014.

SHAMES, S. R.; AUWETER, S. D.; FINLAY, B. B. Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, p. 380-389, 2009.

SILVA, J. A; DA SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 3, p. 175-196, 2005.

SNOWDEN, R.; HARRINGTON, H.; MORRILL, K.; JEANE, L.; GARRITY, J.; ORIAN, M.; LOPEZ, E.; REZAIE, S.; HASSBERGER, K.; FAMILONI, D.; MOORE, J.; VIRDEE, K.; ALBORNOZ-SANCHEZ, L.; WALKER, M.; CAVINS, J.; RUSSELL, T.; GUSE, E.; REKER, M.; TSCHUDY, O.; WOLF, J.; TRUE, T.; UKAEGBU, O.; AHAGHOTU, E.; JONES, A.; POLANCO, S.; ROCHON, Y.; WATERS, R.; LANGLAND, J. A comparison of the anti-*Staphylococcus aureus* activity of extracts from commonly used medicinal plants. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 20, n. 5, p. 375-382, 2014.

SOOKTO, T.; SRITHAVAJ, T.; THAWEBON, S.; THAWEBON, B.; SHRESTHA, B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 5, p. 376-380, 2013.

STEFANOVIĆ, O. D.; STANOJEVIĆ, D. D.; COMIĆ, L. R. Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 69, n. 3, p. 457-463, 2012.

STELLA, A. E.; RIGOBELLO, E. C.; OLIVEIRA, A. C.; MALUTA, R. P.; MARIN, J. M.; ÁVILA, F. A. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 1, p. 66-74, 2008.

STELLA, A. E.; MALUTA, R. P.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; de ÁVILA, F. A. Virulence genes in isolates of *Escherichia coli* from samples of milk and feces from dairy cattle. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1698–1700, 2012.

STOJANOVIĆ, Z.; PEJČIĆ, M.; STOJANOVIĆ, N.; SHARIFI-RAD, J.; STANKOVIĆ, N. Potential of *Ocimum basilicum* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against biofilms of *P. aeruginosa* clinical isolates. **Cellular and Molecular Biology**, v. 62, n. 9, p. 27-33, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: DA SILVA, A. M. 10 ed., Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 280-751.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4th ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 35, p. 269-275.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production, supply and distribution online - Dairy**. Washington: USDA, 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: 05 out. 2015.

VELICKOVIC, D. T.; RANDJECOVIC, N. V.; RISTIC, M. S.; VELICKOVIC, A. S.; SMELCEROVIC, A. A. Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 68, n. 1, p. 17–24, 2003.

VERDIER, K.; NYMAN, A.; GREKO, C.; BENGTSSON. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 2, p. 1-10, 2012.

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1787-1789, 2004.

VOLD, L.; HOLCK, A.; WASTESON, Y.; NISSEN H. High levels of background flora inhibits growth *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 2–3, p. 219-225, 2000.

WANZALA, W.; ZESSIN, K. H.; KYULE, N. M.; BAUMANN, M. P. O.; MATHIAS, E.; HASSANALI, A. Ethnoveterinary medicine: a critical review of its evolution, perception, understanding and the way forward. **Livestock Research for Rural Development**, v. 17, n. 5, p. 20-26, 2005.

WECKESSER, S.; ENGEL, K, SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A., PELZ, K.; SCHEMPP, C. M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, n. 7-8, p. 508-516, 2007.

WYRSCH, E. R.; ROY CHOWDHURY, P.; CHAPMAN, T. A.; CHARLES, I. G.; HAMMOND, J. M.; DJORDJEVIC, S. P. Genomic microbial epidemiology is needed to comprehend the global problem of antibiotic resistance and to improve pathogen diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 843, p. 1-21, 2016.

ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 1-3, p. 145 – 152, 2007.