

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO CLÍNICO E ETIOLÓGICO DA DIARREIA EM POTROS

GIOVANE OLIVO

Botucatu, SP

Julho 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO CLÍNICO E ETIOLÓGICO DA DIARREIA EM POTROS

GIOVANE OLIVO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Adj. Alexandre
Secorun Borges.

Botucatu, SP

Julho 2013

Nome do autor: Giovane Olivo

Título: Estudo clínico e etiológico da diarreia em potros

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Alexandre Secorun Borges

Presidente e orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Marcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof^a. Dr^a. Carla Bargi Belli

Membro

Departamento de Clínica Médica

FMVZ – USP – São Paulo, SP.

Data da Defesa: 01 de julho de 2013.

Dedicatória

*Aos meus pais, **Nerio Olivo e Maria Adriana da Silva**, pelo amor e compreensão, por me apoiarem e orientarem em todas as decisões e caminhos tomados por mim.*

*Ao meu irmão **Leandro Olivo**, por toda amizade e bons momentos vividos ao seu lado.*

“In Memoriam”,

*Ao meu avô e grande amigo **Angelo Olivo**, por me incentivar na profissão de Médico Veterinário e por fazer de minha infância algo bom em se recordar.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus**, que sempre me deu forças, levando-me a crer em dias melhores.*

Em especial:

- *Ao Professor Dr. **Alexandre Secorun Borges**, pela amizade e orientações durante a residência e pela oportunidade concedida para realizar o curso de mestrado sob sua orientação;*
- *Ao Professor Dr. **Marcio Garcia Ribeiro**, pela “co-orientação”, amizade e por nunca medir esforços para que este projeto fosse realizado;*
- *Ao então Professor Dr. **José Paes de Oliveira Filho** (ex-integrante da salinha), pela convivência e colaboração técnica de grande importância ao projeto;*
- *Aos meus amigos da “salinha”: Aline Angela, Cesar Irineudo Araújo, Diego José Zanzarini Delfiol, Didier Cagnini, Juliana Almeida, Mariana Isa Poci Palumbo e Peres Ramos Badial, pela amizade, pela convivência salutar e por me ajudarem durante a pós-graduação;*
- *Aos meus amigos, Carlos Ramires Neto, Dietrich Pizzigatti, Emiliano Cisneros, Leandro Américo e Rodrigo Cavalcanti por todo apoio e ajuda durante a residência e pós-graduação;*
- *Aos meus amigos e funcionários da Clínica de Grandes Animais, Cesar Leme e Marco Antônio Simão pela ajuda durante a residência e pelos momentos de prosa.*

Agradeço com simples palavras aos que tornaram este trabalho possível de ser realizado.

- ✓ *Aos Médicos Veterinários que permitiram a nossa pesquisa e coleta de dados nos haras, sendo essencial para que este trabalho se tornasse realidade;*
- ✓ *Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão e equipe, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de São Paulo, pela realização do diagnóstico de Coronavírus;*
- ✓ *Ao Prof. Dr. Fábio Gregory e equipe, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade de São Paulo, pela realização do diagnóstico de Rotavírus;*
- ✓ *Ao prof. Dr. Shinji Takay e equipe, do Departamento de Higiene Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Kitasato, Japão, pela realização do diagnóstico molecular do perfil de virulência dos isolados de Rhodococcus equi;*
- ✓ *Ao prof. Dr. Domingos da Silva Leite e Pós-doutoranda Amanda Keller Ciqueira, do Departamento de Genética, evolução e Bioagentes da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), realização do diagnóstico e identificação do perfil de virulência dos isolados de Escherichia coli;*
- ✓ *Ao prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato, pós-doutorando Rodrigo Otávio Silveira Silva do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela realização do diagnóstico e detecção de toxinas de Clostridium difficile e Clostridium perfringens;*
- ✓ *Ao técnico Fernando José Paganini Listoni e a mestrande Thays Mizuki Lucas do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pelo profissionalismo ao isolar e estocarem as linhagens bacterianas e pela amizade e disponibilidade em elucidar qualquer dúvida apresentada;*
- ✓ *Ao prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), MG, por disponibilizar amostras positivas de Lawsonia intracellularis, permitindo a padronização da técnica de diagnóstico molecular (PCR) e possibilitando o desenvolvimento deste trabalho;*
- ✓ *A prof^a. Dr^a Andrea Micke Moreno, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de São Paulo (USP), SP, por disponibilizar amostras positivas de Lawsonia intracellularis, permitindo a padronização da técnica de diagnóstico molecular (PCR) e possibilitando o desenvolvimento deste trabalho;*

- ✓ *Ao Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, do Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Araçatuba (UNESP), por disponibilizar amostras positivas de Giardia sp., permitindo a padronização da técnica de diagnóstico molecular (PCR) e possibilitando o desenvolvimento deste trabalho;*
- ✓ *Ao Prof. Dr. João Pessoa de Araújo Júnior, do Depto de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), pela disponibilidade em nos atender e colaborar com o projeto;*
- ✓ *Ao Dr. Flávio Medeiros Paz e Silva por estar disponível em elucidar as dúvidas com a extração de DNA das amostras de fezes;*
- ✓ *A Doutoranda Érica Boarato David, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências (Unesp, Campus de Botucatu), por sempre estar sempre disposta a colaborar, esclarecendo as dúvidas sobre o diagnóstico de Giardia sp. (“todo pós graduando poderia ser assim...”).*
- ✓ ***Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo auxílio à pesquisa (processo: 478293/2012-7) e pela concessão da bolsa (processo: 130591/2011-4), sem a qual a dedicação exclusiva ao projeto não seria possível.***

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de potros com (n = 56) ou sem (n = 60) diarreia, distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).....	34
Tabela 2. Média, mediana e desvio padrão dos valores referentes ao exame físico e tempo de evolução da diarreia em 56 potros, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	35
Tabela 3. Média, mediana e desvio padrão dos valores referentes ao exame físico dos potros sem (n = 60) diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	35
Tabela 4. Média, mediana e desvio padrão dos valores hematimétricos referente aos 56 potros com diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	37
Tabela 5. Média e desvio padrão dos valores hemogasométricos referente aos 56 potros com diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo.	37
Tabela 6. Avaliação do escore fecal em 116 potros com e sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	38
Tabela 7. Característica da coloração das fezes e a presença ou não da diarreia em 116 potros, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	38
Tabela 8. Característica das fezes avaliando-se a relação do odor e a presença ou não da diarreia em 116 potros, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	39
Tabela 9. Avaliação da frequência de defecação de 116 potros (56 com diarreia e 60 sem diarreia), provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	39
Tabela 10. Detecção de enteropatógenos em amostras de fezes de potros com e ou sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	40
Tabela 11. Frequência de monoinfecção e coinfecção de enteropatógenos em potros com e sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	40
Tabela 12. Frequência de enteropatógenos isolados em amostras de fezes diarreicas de 56 potros distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	41

Tabela 13. Frequência de enteropatógenos isolados em amostras de fezes não diarreicas de 60 potros distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	41
Tabela 14. Frequência de sorotipos em isolados do gênero <i>Salmonella</i> em 56 potros com diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).....	42
Tabela 15. Frequência de sorotipos do gênero <i>Salmonella</i> spp. e suas subespécies em 60 potros sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).....	43
Tabela 16. Detecção de enteropatógenos em monoinfecções e em coinfecções de amostras de fezes diarreicas de 56 potros, distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012)....	44
Tabela 17. Detecção de enteropatógenos em monoinfecções e em coinfecções de amostras de fezes não diarreicas de 60 potros distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012)....	45
Tabela 18. Identificação dos endoparasitas e o total da contagem de ovos por grama de fezes de 20 potros* com diarreia, divididos em três faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).	46
Tabela 19. Identificação dos endoparasitas e o total da contagem de ovos por grama de fezes de 25 potros* sem diarreia, divididos em três faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo.	47
Tabela 20. Micro-organismos, entéricos menos comuns em potros, isolados de 5 animais com diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).....	48
Tabela 21. Micro-organismos, menos comuns em potros, isolados de 6 animais sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012). .	49
Tabela 22. Frequência de mortalidade em 56 potros com diarreia e 60 sem sinais entéricos em criatórios de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012)..	50
Tabela 23. Relação entre o número de potros com (n = 56) e sem diarreia (n = 60), raças acometidas e taxa de mortalidade dos animais, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).....	50
Tabela 24. Número de potros com (6) e sem (2) diarreia que vieram a óbito e os respectivos enteropatógenos isolados, em diferentes propriedades do interior do Estado de São Paulo (2011 – 2012).....	51

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- = negativo

% = porcentagem

® = marca registrada

µg = micrograma

< = menor

> = maior

µL = microlitro

°C = graus Celsius

A = nucleotídeo adenina

afa = gene codificador de adesina fimbrial

ag 43 = antígeno 43

APEC = *Escherichia coli* patogênica para aves

ATP = adenosina trifosfato

BHI = caldo cérebro-coração

bpm = batimentos por minuto

C = nucleotídeo citosina

cnf = fator necrosante citotóxico

DAEC = *Escherichia coli* de aderência difusa

DEC = *Escherichia coli* diarreiogênica

DNA = ácido desoxirribonucleico

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EHEC = *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC = *Escherichia coli* enteroinvasora

ELISA = *Enzyme linked immunosorbment assay*

EPEC = *Escherichia coli* enteropatogênico

ETEC = *Escherichia coli* enterotoxigênica

F = fatores de colonização

FC = frequência cardíaca

fimH = gene codificador da fímbria H/pili tipo I

FR = frequência respiratória

FV = fator de virulência

G = nucleotídeo guanina

GI, GII, GIII = variantes da papG
H = antígeno flagelar
hly = gene codificador de hemolisina
hlyA = alfa-hemolisina
iuc = gene codificador de aerobactina
g = grama
K = antígeno capsular
kDa = quilo dálton
Kb = quilo base
LEE = Locus of enterocyte effacement
LT = termolábil
mg/kg = miligramas por quilo
MLI = Motilidade, Indol e Lisina
mL = mililitros
mm = milímetros
mpm = movimentos por minuto
NaCL = cloreto de sódio
NetB = toxina necrótica B-like
O = antígeno somático
P = pili
PAI = ilha de patogenicidade
papC = subunidade C de fímbria P
papG = subunidade G de fímbria P
pb = pares de base
PCR = reação em cadeia pela polimerase
pH = potencial de hidrogênio
rpm = rotações por minuto
RTX = Repeat Toxin
sfa = gene codificador de fímbria S
SS = ágar *Salmonella Shigella*
Stx = toxina de Shiga
T = nucleotídio timina
TA = temperatura de anelamento

TPC = tempo de preenchimento capilar

TT = tetracionato

TSA = ágar tríplice de soja

UV = Ultra violeta

Vero = células de linhagem do rim de macaco

VTEC/STEC = linhagens verotoxigênicas

vt = verotoxina/verocitotoxina

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.2. <i>Salmonella</i> sp.	5
2.3. <i>Clostridium difficile</i>	7
2.4. <i>Clostridium perfringens</i>	8
2.5. <i>Rhodococcus equi</i>	9
2.6. <i>Lawsonia intracellularis</i>	10
2.7. Coronavírus	12
2.8. Rotavírus	13
2.9. <i>Cryptosporidium</i> spp.	15
2.10. <i>Giardia</i> sp.	17
2.11. Helmintos.....	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Geral.....	19
3.2. Específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Seleção dos animais.....	20
4.2. Avaliação clínica dos animais	20
4.3. Colheita das amostras	21
4.4. Exames microbiológicos e detecção molecular	23
4.4.1. Diagnóstico de <i>E. coli</i>	23
4.4.1.1. Caracterização microbiológica	23
4.4.1.2. Detecção fenotípica de hemolisinas em <i>E. coli</i> no meio de ágar sangue	23
4.4.1.3. Detecção molecular dos fatores de virulência de <i>E. coli</i> pela reação em cadeia pela polimerase (PCR)	24
4.4.2. Diagnóstico de <i>Salmonella</i> spp.	25
4.4.2.1. Caracterização microbiológica	25
4.4.3. Diagnóstico de <i>Clostridium</i> spp.	26
4.4.3.1. Caracterização microbiológica	26
4.4.3.1.1. Detecção molecular de toxinas de <i>C. difficile</i>	26

4.4.3.1.2. Isolamento microbiano e detecção molecular de <i>C. perfringens</i>	26
4.4.4. Diagnóstico de <i>Rhodococcus equi</i>	27
4.4.4.1. Caracterização microbiológica de <i>Rhodococcus equi</i>	27
4.4.4.2. Determinação de linhagens virulentas (VapA)	27
4.4.2.1. Extração de DNA plasmidial.....	28
4.4.2.2. Reação em cadeia pela polimerase	28
4.5. Exames para identificação de Rotavírus e Coronavírus	29
4.5.1. Detecção de Coronavírus	29
4.5.2. Detecção de Rotavírus	29
4.6. Diagnóstico de <i>Lawsonia intracellularis</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> e <i>Giardia duodenalis</i>	30
4.6.1. Diagnóstico de <i>Lawsonia intracellularis</i>	30
4.6.2. Detecção de Protozoários	31
4.6.2.1. Detecção molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.	31
4.6.2.2. Detecção molecular de <i>Giardia duodenalis</i>	31
4.6.3. Amplificação do DNA de <i>Lawsonia intracellularis</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	32
4.6.4. Eletroforese em gel de agarose.....	33
4.7. Exames parasitológicos	33
4.8. Análise dos resultados	33
5. RESULTADOS	34
6. Discussão.....	52
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO I	80

OLIVO, G. **Estudo clínico e etiológico da diarreia em potros**. Botucatu, 2013. 98p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A diarreia é um grave problema em potros até seis meses de vida, acarretando em prejuízos na equideocultura. Sendo assim os objetivos desta pesquisa foram realizar o estudo clínico e a identificação dos principais enteropatógenos e fatores de virulência, responsáveis pela diarreia em potros. Foram avaliados 56 potros com diarreia (GD) e 60 sem diarreia (GC) até 90 dias de vida. Foram realizados hemogasometria e hemograma dos animais do GD. Amostras fecais dos potros do GD e GC foram utilizadas para a identificação dos enteropatógenos. As principais alterações clínicas nos animais GD foram aumento da peristalse e da frequência de defecação (100,0%) e desidratação (67,8%). A hiperfibrinogenemia (26,8%), leucocitose (12,5%), linfocitose (37,5%) e neutrofilia (17,8), acidose metabólica (16%) e diminuição de bicarbonato (16%) foram os principais achados hematológicos. Ao menos um dos enteropatógenos pesquisados foi detectado no GD (50/56) e GC (48/60). Em 32% (16/50) das amostras positivas foi identificado um único enteropatógeno, enquanto que dois ou mais enteropatógenos foram detectados em 68% (34/50) das amostras. *E. coli* apresentou a maior frequência nos isolamentos dos potros com diarreia (62,5%), seguida da *Salmonella* spp. (25%); *Strongyloides* (25%); *estrongilídeos* (10,7%); *Clostridium perfringens* (10,7%); *Rhodococcus equi* (7,1%); *Cryptosporidium* spp. (5,4%); *Clostridium difficile* (1,8%); coronavírus (1,8%); *Giardia* sp. (1,8%). Conclui-se que a identificação dos animais desidratados e com graves alterações hidroeletrólíticas, bem como a necessidade de se detectar os agentes etiológicos e seus fatores de virulência, são importantes para direcionar o médico veterinário a definir medidas de controle e terapêutica adequados.

Palavras chave: diarreia, etiologia, enteropatógenos, fatores de virulência, potros.

OLIVO, G. **Clinical and etiological study of diarrhea in foals**. Botucatu, 2013. 98p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Diarrhea is a serious problem in foals up to six months old, resulting in losses in equine business. The aims of this research were to perform the clinical study and the identification of main pathogens and virulence factors responsible for diarrhea in foals. A total of 56 foals with diarrhea (DG) and 60 without diarrhea (CG) up to 90 days old were evaluated. Fecal samples of DG and 60 without diarrhea (GC) up to 90 days old were evaluated. Hemogram and hemogasometry were performed in the animals of DG. Fecal samples of DG and GC were used to identify the enteropathogens. The main clinical findings in animals of GD were increased peristalsis and defecation frequency (100,%) and dehydration (67.8%). Hyperfibrinogenemia (26.8%), leukocytosis (12.5%), lymphocytosis (37.5%) and neutrophilia (17.8%), metabolic acidosis (16%) and decreased bicarbonate (16%) were the main hematologic findings. At least one of the enteropathogens studied was detected in DG (50/56) and in CG (48/60). In 32% (16/50) of positive samples was identified a single enteropathogen, while two or more enteropathogens were detected in 68% (34/50) of samples. *E. coli* showed the highest frequency in the isolations of foals with diarrhea (62.5%), followed by *Salmonella spp.* (25%); *Strongyloides* (25%); *Strongyles* (10.7%); *C. perfringens* (10.7%), *Rhodococcus equi* (7.1%); *Cryptosporidium spp.* (5.4%); *C. difficile* (1.8%), coronavirus (1.8), *Giardia sp.* (1.8%). In conclusion the identification of dehydrated animals and animals with severe electrolyte alterations as well as the need to detect the etiologic agents and their virulence factors are important to conduct the veterinarian to define control measures and appropriate therapy.

Key words: diarrhea, etiology, enteropathogens, foal, virulence factors.

1. INTRODUÇÃO

A criação de equinos se expande cada vez mais no território nacional, fazendo com que o Brasil se destaque entre os maiores criadores de equídeos do mundo (IBGE, 2010). Apesar do desenvolvimento técnico das criações, problemas relacionados a doenças dos equinos ainda persistem ocasionando perdas econômicas significativas. Dentre as doenças, a diarreia tem grande relevância, acometendo animais de diferentes idades, porém, com maior gravidade nos animais jovens.

As causas de diarreia podem ter origem infecciosa, parasitária e não infecciosa. As causas infecciosas são representadas principalmente pela ação dos vírus e bactérias, enquanto as parasitárias pelos helmintos, coccídeos e protozoários como principais agentes. As causas não infecciosas da doença como a intolerância por lactose e altas concentrações de carboidratos, uso irracional de antimicrobianos, ulcerações gástricas, síndrome da asfixia perinatal (PAS) e adaptações à dieta culminando em mudanças da microbiota intestinal (“diarreia do cio do potro”). As alterações clínicas do potro com diarreia tais como a desidratação grave, acidose metabólica, distúrbios eletrolíticos, hipoproteinemia e bacteremia, podem levá-lo a morte curto espaço de tempo.

Na diarreia, a grande perda de líquido, eletrólitos e alterações ácido-base estão associadas diretamente à severidade das lesões intestinais e à ingestão inadequada de leite ou água pelo paciente durante o curso da doença. No entanto, a acidose metabólica é dentre as alteração ácido-bases, a mais comum em cavalos acometidos pela diarreia (MAIR et al., 2002). Dentre os exames complementares, a hemogasometria possibilita a caracterização e avaliação da intensidade dos desequilíbrios hidro-eletrolíticos e ácido-base (RIBEIRO FILHO et al., 2007), e quando realizada logo no início dos sinais clínicos, permite uma rápida e adequada intervenção, aumentando as chances de sobrevivência do potro (PEIRÓ et al., 2010).

A necessidade de identificar o paciente de risco e decidir qual o melhor momento para intervir no plano terapêutico depende dos exames complementares a serem realizados e do diagnóstico etiológico. O isolamento de um agente das amostras fecais pode não ser indicativo direto de sua

participação na diarreia, pois este pode ser integrante da microbiota ou, ainda, outros agentes podem estar presentes nos casos de coinfeções dificultando a interpretação de resultados laboratoriais isolados. Entre os diversos patógenos entéricos, os principais agentes causadores de diarreia são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Rhodococcus equi*, *Clostridium difficile* e *perfringens*, *Lawsonia intracellularis*; Rotavírus, Coronavírus; *Strongyloides westeri*, *Strongylus vulgaris*, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp. (MEIRELLES et al., 2008; SLOVIS et al., 2010).

O presente estudo investigou os principais enteropatógenos relacionados a casuística da diarreia em potros, assim como as principais alterações clínicas decorrente da perda excessiva de líquido e bacteremia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) é agente causal de enterite em diversas espécies, como equinos, bezerros, cordeiros, leitões, e humanos. Este micro-organismo provoca diarreia aquosa e profusa, acometendo potros com menos de um mês de vida (HOLLAND et al., 1996). A desidratação grave e o desequilíbrio eletrolítico são as principais consequências que contribuem para a alta mortalidade de neonatos com colibacilose (HOLLAND et al., 1989).

O diagnóstico presuntivo da infecção por *E. coli* é baseado no histórico e sinais clínicos, e confirmado pela presença da bactéria nas fezes após cultivo, (KRIEG & HOLT, 1994). Esta bactéria é comumente isolada nas fezes de cavalos normais e potros diarreicos. No entanto, para determinar a participação de micro-organismos como causa da diarreia, se faz necessário a realização de técnicas diagnósticas que comprovem a patogenicidade e identifique os fatores de virulência, tais como identificação das fímbrias, hibridização em colônia e a identificação do gene pelo método da PCR (HOLLAND et al., 1996).

2.2. *Salmonella* sp.

A salmonelose é uma doença que gera distúrbios entéricos e/ou sistêmicos, ocasionada por bactéria do gênero *Salmonella*, Gram negativa, anaeróbica facultativa (CARTER et al., 2007; SLOVIS, 2007; SLOVIS, 2009). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* possui seis subespécies com mais de 2.000 sorovares que são potencialmente patogênicas. Porém a maioria dos casos clínicos está associada a uma única subespécie, *S. enterica* subsp. *enterica* (TRAUB-DARGATZ & BESSER, 2007). Durante 1990 e 1991, 380 amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal ou durante a necropsia de cavalos de diferentes idades, com queixa de diarreia. Destas amostras, 18% (69/380) foram positivas para *Salmonella* spp., e grande parte das linhagens identificadas como *Salmonella* Typhimurium (43/69). Outros sorotipos menos encontrados foram: *S. hadar* (3/69), *S. arizona* (2/69), *S.*

enteritidis (2/69), *S. virchow* (1/69), *S. blockey* (1/69) e *S. bareilly* (1/69) (VAN DUIJKEREN et al., 1994).

Infecções por *Salmonella* sp. podem ser a etiologia primária em equinos doentes, principalmente em potros com menos de seis meses de idade (12 horas a quatro meses), os quais sucumbem a uma septicemia aguda (MORSE et al., 1976; SLOVIS, 2007; SLOVIS, 2009). A provável via de infecção é a oral, existindo várias vias de transmissão para equinos, incluindo o consumo de água ou alimento contaminado, contato com animais e ambiente infectados, como também mãos e equipamentos utilizados pelo tratador (SLOVIS, 2007). Os fatores estressantes como excesso de treinamento, desmame precoce, privação de água ou alimento e cirurgias de grande porte com anestesia geral, contribuem para a infecção (MORSE et al., 1976; CARTER et al., 2007).

A bactéria invade as células do epitélio intestinal por um processo de endocitose, fazendo com que ocorra a reorganização do citoesqueleto das células epiteliais (SLOVIS, 2009). As enterotoxinas e citotoxinas da *Salmonella* juntamente com a inflamação generalizada, causam o aumento da secreção pelo epitélio intestinal (SLOVIS, 2007; SLOVIS, 2009). Os cavalos infectados podem apresentar desde enterite leve até choque septicêmico (SLOVIS, 2007). Em potros mais jovens, os sinais da enfermidade são mais graves do que em potros acima de quatro meses de idade, causando severa diarreia, febre, cólica, anorexia e hipertermia (MORSE et al., 1976; WALKER et al., 1991).

As culturas bacterianas seriadas em placas contendo ágar em meio de cultura seletivo é o método de eleição para estabelecer a presença de *Salmonella* (TRAUB-DARGATZ & BESSER, 2007). A cultura sanguínea é um método particularmente utilizado em potros com menos de um mês de idade, por apresentarem maiores chances após a infecção de desenvolverem uma bacteremia (ZIMMEL, 2008; SLOVIS, 2009). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada técnica altamente sensível e os resultados positivos podem apresentar maior importância em potros do que em cavalos adultos com diarreia (ZIMMEL, 2008).

2.3. *Clostridium difficile*

Clostridium difficile (*C. difficile*) é uma bactéria anaeróbica, Gram-positiva e importante causa de doenças entéricas em humanos e animais (WEESE & PRESCOTT, 2001; RADOSTITS et al., 2007; WEESE, 2007). O isolamento do *C. difficile* foi relatado pela primeira vez em potros com diarreia, por Jones et al. (1987), onde 62,7% (27/43) dos animais foram diagnosticados com a doença.

C. difficile produz ao menos cinco toxinas (BORRIELO, 1998), entretanto somente o efeito das toxinas A e B são melhor compreendidas (WEESE & PRESCOTT, 2001). A toxina A é uma potente enterotoxina com rápida atividade citotóxica (LYERLY et al., 1998), que ao contrário da toxina B, causa ainda acúmulo de fluido no intestino (BORRIELO, 1998). A toxina B possui até 100 vezes mais citotoxicidade quando comparada a toxina A (GUERRANT et al., 1999), mas não causa qualquer alteração da permeabilidade intestinal, migração de neutrófilos para o lúmen ou alteração da morfologia intestinal (LIMA et al., 1988).

Os sinais clínicos de *C. difficile* podem variar de enterite leve a colite fulminante com hemorragia e necrose do epitélio intestinal (RADOSTITS et al., 2007; SLOVIS, 2009). A apresentação clínica pode não ser diferente das outras causas de enterocolite ocasionando diarreia aquosa e profusa, cólica, fraqueza e desidratação. Ainda pode ser observado aumento da frequência cardíaca e respiratória, bem como acidemia atribuída à acidose metabólica (RADOSTITS et al., 2007).

O diagnóstico é realizado em meios de cultura seletivos. Comercialmente, o teste de ensaio imunoenzimático em placa (ELISA) está se tornando padrão para o diagnóstico devido ao baixo custo, resultado rápido, e por se constituir em uma técnica padronizada, de boa sensibilidade e especificidade para detecção da toxina (WHITTIER et al., 1993; LYERLY et al., 1998). A diferenciação de estirpes toxigênicas e não toxigênicas podem ser realizadas por reprodução da toxina “*in vitro*” ou pela análise da PCR, que identifica a presença dos genes que regulam a produção das toxinas (KATO, et al., 1991; ZIMMEL, 2008).

2.4. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) é uma bactéria anaeróbica, Gram-positiva, que tem sido associada à enterocolite em cavalos, cães, bezerros, cordeiros, coelhos, suínos e humano (SONGER, 1996). Os tipos de *C. perfringens* são diferenciados com base na produção de quatro principais toxinas. As toxinas alpha, beta e épsilon são produzidas por *C. perfringens* tipo B. As toxinas alpha e beta pelo *C. perfringens* tipo C, enquanto as toxinas alpha e iota pelo *C. perfringens* tipo E (RADOSTITS et al., 2002). Em humanos a enterotoxina de *C. perfringens* tem sido associado a diarreias esporádicas, intoxicação alimentar e diarreias associadas ao uso indevido de antimicrobianos (BRETT et al., 1992). Em equinos a enterocolite tem sido associada ao *C. perfringens* toxina A (BUESCHEL et al., 1998; EAST et al., 1998) e C (SIMS et al., 1985; HOWARD-MARTIN et al., 1986; EAST et al., 1998). Radostits et al. (2002), relataram ainda *C. perfringens* produtores de toxina B e C como causadores de enterotoxemia em potros.

Alguns fatores levam ao desenvolvimento da doença, incluindo a mudança da dieta, antibioticoterapia, estresse, ou infecções concomitantes. Outros estão, ligados diretamente ao hospedeiro e podem ser determinantes, como idade, estado imune e a presença ou ausência de receptores para as toxinas de *C. perfringens* (SLOVIS, 2009).

A doença geralmente é observada em animais com menos de cinco dias de idade (SLOVIS, 2009). Os potros com enterotoxemia associada ao *C. perfringens* toxina B ou C apresentam evidências de depressão acentuada, pronunciada toxemia, intensa dor abdominal, fezes sanguinolentas, frequência respiratória e pulso acelerado (RADOSTITS et al., 2007). O curso clínico é muito curto, sendo que a diarreia pode não ser observada em alguns casos (RADOSTITS et al., 2007; WEESE, 2007).

Os exames laboratoriais revelam acidose na maioria dos animais, azotemia e, ocasionalmente, hipoglicemia. O leucograma indica leucopenia com desvio a esquerda regenerativo (SLOVIS, 2009).

Doenças entéricas associadas ao *C. perfringens* são de difícil diagnóstico, já que o micro-organismo pode ser facilmente encontrado nas

fezes de animais sadios (PRINCEWEL & AGBA, 1982; MIWA et al., 1997). A cultura quantitativa tem sido sugerida como uma forma de diagnóstico de doenças entéricas em equinos por *C. perfringens* (WIERUP & DIPIETRO, 1981). A detecção de toxinas específicas nas fezes é o método de diagnóstico de escolha (WEESE, 2007; SLOVIS, 2009). Com o uso da PCR, é possível ampliar e separar os genes que codificam as toxinas (ZIMMEL, 2008; SLOVIS, 2009). A hemocultura é altamente recomendada em potros neonatos, que comumente apresentam bacteremia por *C. perfringens* e raramente por *C. difficile* (ZIMMEL, 2008). Os testes comerciais são uma opção para o diagnóstico, identificando enterotoxinas do *C. perfringens* (*C. perfringens* enterotoxin test e ELISA) [SLOVIS, 2009].

2.5. *Rhodococcus equi*

A infecção por *Rhodococcus equi* (*R. equi*) apresenta distribuição mundial refletindo em grandes perdas econômicas nos haras de criação (HEIDMANN et al., 2006; MUSCATELLO et al., 2007). As infecções ocorrem logo após o parto até o sexto mês de vida, porém com maior frequência entre 45 e 60 dias (COHEN et al., 2001), sendo atribuída ao período de transição de imunidade passiva e o início da imunidade ativa (COHEN, 2008). As vias inalatória e/ou digestória são as principais vias de infecção nestes animais, embora a maioria dos animais torna-se imune ao longo da vida (HEIDMANN, 2006; COHEN, 2008). A viabilidade do micro-organismo no trato gastrointestinal de animais jovens e adultos favorece a sua disseminação nos criatórios (RADOSTITS et al., 2007).

Embora o micro-organismo tenha distribuição mundial, o impacto está relacionado a grandes fazendas de criação, devido ao aumento da prevalência, resultando em altas taxas de mortalidade. Ribas et al. (2009) afirmaram que *R. equi* apresenta 17% de frequência de isolados em propriedades e possui taxa de letalidade de 50% dos animais acometidos.

Os sinais entéricos são menos frequentes, ocorrendo isoladamente ou em conjunto com os respiratórios, representados por diarreia, desidratação,

cólica, perda de peso e retardo no crescimento, decorrentes de grave colite e linfadenite mesentérica (RIBEIRO et al., 2007). Heidmann (2006) citou ainda manifestações menos comuns como uveíte séptica, enterocolite ulcerativa, osteomielite, fisite séptica ou artrite. Na prática clínica, o diagnóstico da rodococose nos animais fundamenta-se na associação de dados clínico-epidemiológicos, aliados aos resultados de exames complementares como radiografia, ultrassonografia, citologia e cultivo a partir do lavado traqueobronquico (RADOSTITS et al., 2007).

O isolamento de *R. equi* do ambiente é determinado com o emprego de meios especiais, que contenham fármacos com a capacidade de impedir o crescimento de micro-organismos ambientais e fecais, como o meio NANAT (TAKAI et al., 1996; MUSCATELLO et al., 2007).

O sorodiagnóstico da rodococose tem sido utilizado no plano diagnóstico, apoiado nas técnicas de imunodifusão em gel de ágar, inibição de hemólise sinérgica, imunodifusão radial e ELISA. Essas técnicas são de alta sensibilidade e permitem o diagnóstico mais preciso nos estágios mais avançados de evolução, mas como inconveniente podem apresentar reações falso-positivas (anticorpos de origem materna) e falso-negativas (potros com infecção precoce), não sendo útil para diagnóstico definitivo da rodococose (RIBEIRO, 2007).

A padronização da técnica da PCR possibilitou o avanço no diagnóstico da doença (SELLON et al., 2000). Possui a capacidade de identificar a doença na sua fase inicial e a presença de linhagens patogênicas em diferentes espécimes clínicas (FORTIER et al., 2006).

2.6. *Lawsonia intracellularis*

Lawsonia intracellularis (*L. intracellularis*) é uma bactéria Gram negativa, intracelular obrigatória que afeta principalmente potros desmamados, causando doença crônica, caracterizada principalmente por uma enteropatia proliferativa equina (EPE), acometendo também espécies de animais domésticos e selvagens (PUSTERLA & GEBHART, 2009). Nos últimos anos observou-se aumento no número de potros acometidos pela doença, apresentando idade

inferior a um ano de vida (DUHAMEL & WHEELDON, 1982; FRANK et al., 1998; SCHUMACHER et al., 2000; LAVOIE et al., 2000; BIHR, 2003; GUIMARÃES-LADEIRA et al., 2009). No Brasil, Guimarães-Ladeira et al. (2009) relataram a existência da *L. intracellularis* no estado de Minas Gerais, acometendo potros clinicamente saudáveis e com histórico de diarreia, ressaltando a importância deste agente no diagnóstico diferencial para as enterites nos equinos.

Os fatores predisponentes como o estresse do desmame e o parasitismo tem ocasionado o desenvolvimento de EPE em potros (PUSTERLA & GEBHART, 2009). A via de infecção é fecal-oral, atribuindo aos alimentos e a água a principal forma de disseminação deste micro-organismo (LAVOIE & DROLET, 2007; WILSON & GEBHART, 2008). A gravidade da doença depende do número de organismos ingeridos pelo hospedeiro e o grau de imunidade. Após a ingestão, a bactéria invade as vilosidades intestinais e através de vacúolos parasitam os enterócitos, multiplicando-se livremente no citoplasma. A EPE se desenvolve originando uma proliferação progressiva de células imaturas do epitélio, abrigando inúmeras bactérias, causando lesões extensas e com isso a incapacidade de digerir e absorver nutrientes, levando a quadros de diarreia e perda de peso (LAVOIE & DROLET, 2007). Em casos mais severos ocorrem ulcerações da mucosa intestinal, culminando em perda de sangue, ou até a formação de microabscessos intraepiteliais, causadores de gastrite e colite (BREES et al., 1999; WILSON & GEBHART, 2008).

Nas formas subclínicas da doença observa-se a diminuição do ganho de peso. Os sinais clinicopatológicos atribuídos a fase aguda incluem enteropatia hemorrágica e, na forma crônica, adenomatose intestinal, enterite necrótica e ileíte (LEMARCHAND et al. 1997).

Os sinais clínicos são atribuídos à quantidade de bactérias ingeridas, a idade do animal, estresse concomitante, resposta imune individual e outros fatores que influenciem alterações na microbiota intestinal, causando, quadros de apatia, hiporexia, diarreia, desidratação, cólica e perda de peso (WILSON & GEBHART, 2008).

A EPE é considerada um diagnóstico diferencial em qualquer potro com hipoalbuminemia, com idade igual ou superior a dois meses de vida. Para o

diagnóstico das infecções causadas por *L. intracellularis* é recomendado o exame sorológico (imunofluorescência de anticorpo ou ensaio de imunoperoxidase em camada) e a PCR das amostras fecais. Porém, resultados falsos negativos podem ocorrer em estágios iniciais da EPE. Dentre as duas técnicas mais utilizadas para o diagnóstico da doença, a PCR mostra maior sensibilidade, permitindo melhor entendimento epidemiológico da doença em diferentes espécies e regiões (SMITH & LAWSON, 2001).

Os diagnósticos diferenciais incluem enterites imunomediadas, úlceras gastrintestinais, parasitismo e neoplasia (BIHR, 2003). Outras causas de diarreia em equinos também devem ser investigadas como a salmonelose, clostridiose, rodococose equina e endoparasitas (WILSON & GEBHART, 2008).

2.7. Coronavírus

Coronavírus é um vírus RNA da família Coronaviridae, causador de doenças em humanos e animais domésticos, incluindo bovinos, suínos, gatos, coelhos, aves domésticas e camundongos (DAVIS et al., 2000). Acredita-se que a transmissão do vírus em equinos seja pela via fecal-oral. Contudo, outras formas de contágio também podem ser possíveis, como por via respiratória e por fômites. A infecção “*in vivo*” pode ser disseminada, causando infecções sistêmicas, ou restritas a alguns tipos de células, como células epiteliais do sistema respiratório ou entérico e macrófagos (ARGUEDAS, 2007). Partículas do vírus têm sido observadas por microscopia eletrônica de contraste negativo em amostras de fezes de cavalos adultos, potros sadios e com diarreia (GUY et al., 2000). Infecções concomitantes por coronavírus e *Cryptosporidium* spp. tem sido descritas (ARGUEDAS, 2007). O Coronavírus age como patógeno primário em potros jovens imunocompetentes (MEIRELLES et al., 2008; ZIMMEL, 2008). A patogenicidade deste agente resulta em danos as vilosidades da mucosa intestinal, levando a diminuição da capacidade absorptiva. A alteração no transporte eletrolítico e na secreção de enzimas intestinais ocorre secundariamente ao dano do epitélio contribuindo na má absorção dos nutrientes, agravando ainda mais o quadro de diarreia (DAVIS et al., 2000; MEIRELLES et al., 2008).

Os potros apresentam geralmente quadros febris, desidratação e anormalidades eletrolíticas, podendo estes sinais clínicos permanecer de 1 a 12 dias (MEIRELLES et al., 2008). As infecções entéricas geralmente são auto limitantes. Contudo, complicações secundárias podem ocorrer como dificuldade respiratória resultante de doenças pulmonares devido à hipóxia causada pela intensa anemia (DAVIS et al., 2000).

No Brasil, levantamentos epidemiológicos apontaram morbidade superior a 58% dos animais acometidos com enterite, onde a faixa etária mais susceptível era de 30 a 90 dias de vida, justificado pelo intervalo de queda da imunidade passiva e estabelecimento da imunidade ativa. Dentre as formas de infecção, práticas como a coprofagia ou ingestão de alimentos contaminados e a presença de potros doentes e/ou animais saudáveis eliminando o vírus, são fatores de risco para animais imunologicamente deficientes. O estresse intenso atua como fator predisponente para o desenvolvimento dos sinais clínicos em animais infectados (MEIRELLES et al., 2008).

O histórico de diarreia aquosa, hipoproteinemia e desidratação levam a diagnósticos diferenciais que incluem agentes virais e bacterianos, causadores de enterocolite (DAVIS et al., 2000). O método diagnóstico de escolha é a demonstração direta de antígenos de coronavírus em amostras biológicas (ARGUEDAS, 2007). O diagnóstico baseia-se nas técnicas de ELISA (identificação de antígeno), microscopia eletrônica das fezes de potros com diarreia (GUY et al., 2000; ZIMMEL, 2008) e teste de aglutinação para identificar se há presença de outros patógenos causadores de infecção (MEIRELLES et al., 2008).

2.8. Rotavírus

A enterite causada pelo rotavírus é uma preocupação para potros recém-nascidos, causada por um vírus RNA fita dupla, não envelopado, pertencente ao gênero *Rotavirus* (FLORES et al., 2007). Esta manifestação clínica ocasiona grandes alterações metabólicas, como rápida desidratação, desequilíbrio ácido

básico e hidroeletrolítico, podendo levar o potro a morte (MEIRELLES et al., 2008).

A transmissão do vírus ocorre pela via fecal-oral pelaas fezes ou fômites altamente contaminados. O período de incubação é de 12 a 24 horas. Cavalos adultos não são afetados clinicamente durante surtos de diarreia em potros, embora algumas éguas com potros infectados irão soroconverter, indicando infecção subclínica (DWYER, 2001). A idade média dos potros com diarreia por rotavírus é de 75 dias, ocorrendo diarreia por um período de 1 a 9 dias (DWYER, 2001). Comumente, vários potros são afetados em um espaço curto de tempo, sendo uma doença altamente contagiosa e que apresenta um período muito curto de incubação (1-2 dias) [SLOVIS, 2000]. Os animais infectados têm a capacidade de eliminar o micro-organismo por um período de 10 dias a 8 meses, podendo este persistir no ambiente por até nove meses (SLOVIS, 2000).

Após o vírus ingressar no trato gastrintestinal, invade e se replica rapidamente nas vilosidades intestinais, especificamente do duodeno e jejuno (DWYER, 2001). O resultado da infecção é a diminuição das vilosidades e do epitélio celular, resultando em ausência de dissacaridases, especialmente lactase, fazendo com que este alimento ingerido permaneça no lúmen intestinal, como uma solução hiperosmótica, levando a má digestão, deficiência na absorção dos nutrientes e diarreia aguda. As células intestinais da cripta não são afetadas, apenas as células do ápice das vilosidades (DWYER, 2001).

Os achados clínicos da infecção por rotavírus dependem da idade do potro, do estado imune, da virulência do vírus e da quantidade inoculada (ZIMMEL, 2008). Após 18 a 24 horas da ingestão do material infectado o animal apresenta sinais de letargia, diminuição do reflexo de sucção, e diarreia, podendo variar de fezes pastosas a aquosas. Slovis (2009) descreve o timpanismo também como achado clínico em potros infectados. A febre pode estar ou não presente. Potros jovens apresentam maior susceptibilidade a apresentar problemas graves devido a sua limitação em corrigir desequilíbrios hidroeletrolíticos mais graves. O diagnóstico é muitas vezes realizado com base nos achados epidemiológicos e exame físico. O envio de amostras fecais

para a microscopia eletrônica, ELISA, são também meios eficazes para estabelecer o diagnóstico (SLOVIS, 2000; ZIMMEL, 2008).

2.9. *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium parvum (*C. parvum*) é caracterizado como um coccídeo, parasita da subordem Eimeriorina. Infectam as células do epitélio intestinal de muitas espécies de animais domésticos e selvagens, incluindo cavalos e humanos (VERONESI et al., 2008; TOSCAN et al., 2010). O primeiro relato de infecção em equinos ocorreu em potros da raça Árabe, combinado a doenças imunodepressoras (XIAO & HERD, 1994). Os equinos tornam-se infectados com *C. parvum* após ingerirem oocistos com a forma infectante do parasita. O desenvolvimento ocorre na superfície apical das células epiteliais parasitadas, mas separado do citoplasma da célula hospedeira. Os danos nas microvilosidades intestinais resultam em má absorção, má digestão e diarreia (XIAO & HERD, 1994; COLE, 1997; TOSCAN et al., 2010). A infecção pelo micro-organismo torna-se cada vez mais reconhecida como causa de surtos de diarreia em potros (COLE, 1997), afetando animais de 3 a 15 semanas de vida, como também potros mais velhos com até dez meses de idade (XIAO & HERD, 1994). A infecção no hospedeiro ocorre tanto pelo contato direto (fecal-oral), quanto pela ingestão de alimentos e água contaminados (VERONESI et al., 2008).

No Brasil, foi descrita a prevalência de oocistos do parasita em 80,8% (42/52) das amostras fecais de equinos atletas, mostrando grande número de animais portadores e assintomáticos, capazes de excretarem o micro-organismo (TOSCAN et al., 2010). Gomes et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes em animais atletas. Neste estudo, os potros de até dois anos de idade apresentaram frequência de 83,3% (15/18) de *Cryptosporidium* spp. nas amostras fecais, mostrando ampla disseminação na população equina.

A infecção por *Cryptosporidium* spp. em potros apresentam prevalência mais baixa, ocorrendo mais tardiamente que em ruminantes, atingindo maior eliminação entre 5 a 8 semanas de vida. A diarreia é verificada mais facilmente em potros de cinco dias até seis semanas de idade (RADOSTITS et al., 2007).

A infecção também é atribuída a animais cujo sistema imune está comprometido (MAYER & PALMER, 1996). As éguas podem ser portadoras assintomáticas, capazes de infectar potros ao contaminarem o ambiente com oocistos. O período de incubação de *C. parvum* é de aproximadamente 3 a 7 dias. O primeiro sinal clínico associado à criptosporidiose é severo e inclui diarreia persistente levando a desidratação, fraqueza e morte quando não tratado. Em animais imunocompetentes as infecções tornam-se comuns, com a presença dos sinais clínicos entre 5 a 14 dias pós infecção (NETHERWOOD et al., 1996; SELLON, 2007).

A excreção dos oocistos do gênero *Cryptosporidium* por potros pode ser precoce se os animais forem infectados pelas éguas, pois o período pré-patente é considerado curto quando comparado a *Giardia* spp. (1-2 semanas) [XIAO & HERD, 1994].

O diagnóstico de infecção por *Cryptosporidium* spp. em animais suspeitos é realizada pela detecção dos oocistos diretamente das amostras fecais (XIAO & HERD, 1994). As técnicas de identificação de protozoários têm sido descritas incluindo a coloração de esfregaços de amostras fecais ou flutuação usando soluções saturadas de sacarose ou solução de sulfato de zinco (BROUSSARD, 2003). Também podem ser realizados métodos imunológicos incluindo ensaios de imunofluorescência (IFA) e a técnica ELISA (COLE, 1997; BROUSSARD, 2003).

A técnica de coloração rápida por ácido (“acid-fast stain”) é apontada como método de maior sensibilidade quando comparada a IFA, pois não requerer uma preparação especial do esfregaço das fezes e podendo ser facilmente empregada à rotina clínica devido ao baixo custo (COLE, 1997; ZIMMEL, 2008). Apesar de sensível, esta técnica apresenta baixa especificidade, diminuindo a possibilidade em detectar infecções por *Cryptosporidium* spp. (XIAO & HERD, 1994b). Outro método de triagem para oocistos de *Cryptosporidium* spp., é baseado no uso de metodologias moleculares, aplicadas com uso do PCR, representando uma ferramenta útil para a detecção de patógenos de amostras ambientais (MAYER & PALMER, 1996).

2.10. *Giardia* sp.

Giardia intestinalis (*G. intestinalis*) é um protozoário flagelado, intestinal, capaz de infectar uma série de vertebrados, como mamíferos, aves e répteis (BROUSSARD, 2003). *G. intestinalis* possui dois ciclos de vida, consistindo em trofozoíto e cisto. Os cistos são ingeridos pelo hospedeiro e transforma-se em trofozoítos, que se reproduzem por fissão binária, após parasitarem o epitélio intestinal (duodeno). Os trofozoítos tornam-se inativos e resistentes, e os cistos são eliminados no ambiente (SELLON, 2007).

A infecção não é relatada com frequência em equinos, mas algumas descrições indicam que animais infectados possuem sinais compatíveis à diarreia ou cólica, com eliminação de grande número de cistos nas fezes (NETHERWOOD et al., 1996; TRAUB et al., 2005). Animais clinicamente saudáveis, porém infectados, possuem também a capacidade de eliminar grande quantidade de cistos junto às fezes (SELLON, 2007).

No Brasil, Vargas & Rigolon (1998), relataram a ocorrência de *G. duodenalis* utilizando a técnica de centrifugação-flutuação de Faust com sulfato de zinco em 21,1% (26/123) dos equinos do Noroeste e Norte do estado do Paraná. Destes, 18,2% (8/44) eram animais com idade ≤ 1 um ano e não apresentavam sinais de diarreia.

A excreção de cistos de *Giardia* sp. começa quando o potro ainda tem duas semanas de vida, sendo maior antes da nona semana, onde a eliminação declina gradualmente (XIAO & HERD, 1994b). O diagnóstico se baseia na identificação dos cistos por flutuação em sulfato de zinco, considerado método diagnóstico de escolha. O método ELISA é utilizado para detectar o antígeno presente nas fezes. A mobilidade dos trofozoítos flagelados pode ser detectada por citologia de fezes frescas (<5 minutos) ou fluido duodenal (BROUSSARD, 2003). Entretanto, outro método de triagem para cistos de *Giardia* sp., é baseado em técnicas moleculares, aplicadas com uso da PCR, mostrando-se útil para a detecção de patógenos em amostras ambientais (MAYER & PALMER, 1996).

2.11. Helmintos

Os equinos apresentam uma grande variedade de parasitas e algumas espécies ou gêneros são de grande importância, como *Parascaris equorum* (*P. equorum*), *Strongylus vulgaris* (*S. vulgaris*) e *Strongyloides westeri* (*S. westeri*) (MOLENTO, 2005). Os potros até dois anos de idade são os mais acometidos com essas infecções requerendo preocupação constante quanto ao desenvolvimento e saúde geral (ALMEIDA, 2009). Infecções causadas por *S. vulgaris* são consideradas um fator negativo para o sucesso no manejo com equinos, causando debilidade e morte. Nos casos de cargas parasitárias leves, pode afetar o desenvolvimento e o desempenho animal. *S. vulgaris* está entre os principais parasitas, pois a larva se desenvolve no sistema arterial mesentérico, causando elevação da temperatura corpórea, diminuição na ingestão de alimentos, emagrecimento, apatia, diarreia profusa, cólica e até mesmo a morte entre 14 a 20 dias (FORTES, 2004).

A infecção causada por *S. westeri* (*Strongyloides*) ocorre através das larvas infectantes após sua liberação nas fezes, penetrando na pele e membranas da mucosa oral. Os ovos de *S. westeri* são encontrados quase que exclusivamente em potros lactentes e recém-desmamados infectados também pelo leite materno. A infecção em potros ocorre geralmente entre o 9º e 13º dia causando diarreia por até dez semanas (BOWMAN, 2010).

Parascaris equorum é um nematódeo. A ingestão dos ovos infectantes no ambiente é a principal via de infecção. Níveis moderados a altos de infecção causam sinais respiratórios, enterite, diminuição do apetite, fraqueza e emagrecimento (LINDGREN et al., 2008).

Os pequenos estrôngilos (Cyathostominae) são parasitas do intestino delgado, representando cerca de 75 a 100% dos ovos liberados nas fezes de equinos naturalmente infectados. Diferentemente dos *Strongylus* sp., as larvas de ciatostomíneos não migram pela membrana mucosa do ceco e do cólon, porém causa uma doença clínica distinta, caracterizada por diarreia aquosa associada à inflamação grave da mucosa do ceco e cólon (MARTINS et al., 2005, BOWMAN, 2010).

3. OBJETIVOS

Veterinários de campo e a rotina de hospitais veterinários no Brasil e no exterior ressaltam a diarreia como uma das principais enfermidades dos potros nos primeiros seis meses de vida, prejudicando o desenvolvimento do animal e dificultando que este expresse todo seu potencial genético na fase adulta (HOLLAND et al., 1989; MELO et al., 2007; FREDERICK et al., 2009). A literatura nacional apresenta trabalhos referentes à diarreia em equinos. Porém, estes estudos geralmente estão restritos a relatos de caso ou abordam o diagnóstico e a prevalência de surtos de um único agente (VARGAS & RIGOLON, 1998; MELO et al., 2007; GOMES et al., 2008; MEIRELES et al., 2008; GUIMARÃES-LADEIRA et al., 2009; TOSCAN et al., 2010). Em contraste, muitos destes agentes atuam sob a forma de coinfeções, podendo potencializar o efeito dos sinais entéricos. Assim, faz-se necessário abordar a diarreia infecciosa em potros sob a forma de síndrome, devido ao grande número de patógenos envolvido na gênese da doença.

O diagnóstico baseado em informações obtidas a partir das alterações clínicas e laboratoriais, associadas à identificação precoce do(s) agente(s) etiológico(s) da diarreia em potros, evitam gastos desnecessários com tratamentos inadequados, subdesenvolvimento e até a morte dos animais, além de permitir a implantação de medidas de controle e a prevenção da reincidência de surtos.

O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência da diarreia e suas principais causas em potros até três meses de vida, em animais provenientes do estado de São Paulo.

3.1. Geral

Determinar a ocorrência dos principais enteropatógenos, bem como avaliar as alterações clínicas em potros de até três meses de idade, com ou sem diarreia, provenientes de diversas regiões do estado de São Paulo.

3.2. Específicos

- Avaliar as alterações clínicas observadas no exame físico geral e específico (sistema gastrointestinal) dos potros com e sem diarreia;
- Avaliar as alterações físicas das fezes dos potros com e sem diarreia, tais como consistência, cor e odor;
- Detectar as alterações hemogasométricas e hematimétricas dos potros com diarreia;
- Verificar a ocorrência de enteropatógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Rhodococcus equi*, *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens*, *Lawsonia intracellularis*; Rotavírus, Coronavírus; *Strongyloides westeri*, *Strongylus vulgaris*, *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*) em animais com e sem diarreia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos animais

Foram colhidas 116 amostras de fezes de potros das raças Puro Sangue Inglês, Brasileiro de Hipismo, Quarto de Milha, Manga Larga Paulista, Paint Horse e mestiços, machos e fêmeas, provenientes de haras de criação da região centro-oeste do estado de São Paulo, em perímetro de até 200 Km do município de Botucatu, SP, entre julho de 2011 a outubro de 2012. As amostras foram colhidas de potros com até três meses de idade, foram obtidas de 56 potros com diarreia e 60 potros sem sinais de alterações entéricas até o momento da colheita (grupo controle), com idade equivalente a dos animais com diarreia.

4.2. Avaliação clínica dos animais

Os animais foram submetidos ao exame físico segundo Koterba et al. (1990), Feitosa (2004) e Lohmann & Barton (2007). Os dados clínicos foram anotados em fichas individuais com base nos seguintes aspectos: posicionamento (postura), tempo de preenchimento capilar (TPC), presença ou

não de halo endotoxêmico e grau de desidratação. Também foram avaliados parâmetros vitais, a saber: temperatura corpórea, frequência cardíaca, frequência respiratória e motilidade intestinal. Informações epidemiológicas foram colhidas durante a anamnese, tais como, idade, sexo, raça, número total de animais com e sem diarreia, e número de mortes por distúrbios entéricos.

O grau de desidratação foi avaliado em leve (6-8% de perda de água), moderado (8-10% de perda de água) e grave (10-12% de perda de água), segundo Feitosa (2004).

A diarreia foi definida naqueles animais que apresentaram anormalidades na consistência (aumento da porcentagem de água nas fezes) e na frequência de defecação (RIBEIRO et al., 2000).

O exame hemogasométrico e hemograma completo foram realizados apenas nos animais com diarreia (PEIRÓ et al., 2010).

Para um melhor entendimento das alterações encontradas nos exames físico e laboratorial, bem como o diagnóstico do agente etiológico e a frequência com que os enteropatógenos foram encontrados, os animais foram subdivididos em três faixas etárias, do nascimento ao primeiro mês de vida (0 – 30 dias), do trigésimo primeiro ao sexagésimo dia (31 – 60) e do sexagésimo primeiro ao nonagésimo dia de vida (61 – 90).

4.3. Colheita das amostras

As amostras de fezes dos animais com diarreia foram colhidas em no máximo 24 horas após o responsável da propriedade comunicar a equipe integrante do projeto. A condição para que os potros com diarreia fossem incluídos no projeto, era de não serem tratados previamente com nenhum antimicrobiano. A primeira amostra foi colhida com uso de suabe estéril friccionando-o na mucosa retal com três a quatro movimentos. O material colhido foi mantido em meio de transporte *Stuart*. Outra amostra foi colhida (aproximadamente 50 gramas), por estímulo da ampola retal, utilizando luvas de látex descartáveis, armazenada em pote plástico estéril, acondicionado em caixa térmica sob refrigeração (4 a 8°C) até a chegada, em no máximo cinco horas ao Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ –

Unesp/Botucatu-SP. No laboratório, as amostras colhidas da ampola retal foram separadas em alíquotas (duplicata) de aproximadamente 2 mL de fezes em criotubos, e mantidas em temperaturas de -20°C e -80°C para detecção bacteriana (*Lawsonia intracellularis*), viral (rotavírus e coronavírus) e parasitológica (*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp.). As demais amostras foram processadas imediatamente (coproparasitológico e cultivo bacteriano). A amostra colhida com suabe foi cultivada com vistas ao isolamento de *E. coli* e *Salmonella* spp.

Alíquotas de fezes foram enviadas sob refrigeração para o Laboratório de Anaerobiose da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, visando a realização do isolamento do gênero *Clostridium*, identificação de espécies e detecção de toxinas, sob a responsabilidade do professor Dr. Francisco Carlos Faria Lobato.

Os isolados caracterizados fenotipicamente como *R. equi* (QUINN et al., 1994, 2005) foram enviadas a Universidade de Kitasato, Japão, identificação dos fatores de virulência da bactéria.

O exame hemogasométrico foi realizado, na propriedade, com o aparelho portátil i-STAT 1[®]. O cartucho utilizado foi o i-STAT EG7⁺[®] que afere pH sanguíneo, pressão de CO₂ sanguíneo (PCO₂), pressão de O₂ sanguíneo (PO₂), sódio (Na), potássio (K), cálcio ionizado (iCa), hematócrito (Hct), bicarbonato (HCO₃), total de dióxido de carbono sanguíneo (tCO₂), excesso de base (BE), saturação do oxigênio (sO₂) e hemoglobina (Hb), a amostra foi colhida por venopunção da jugular externa com uma seringa de 1 ml heparinizada acoplada a uma agulha hipodérmica 21G. O sangue colhido por venopunção da veia jugular externa com uso de sistema a vácuo (BD, Vacutainer[®]) O material foi armazenado em recipiente contendo EDTA e encaminhado para o Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP, Botucatu-SP, para realização do hemograma completo avaliando-se o número de hemácia (He), hemoglobina, hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de plaquetas, proteína plasmática total (PT), distribuição de células vermelhas no sangue (RDW), fibrinogênio, leucócitos, metamielócitos, bastonetes, neutrófilos segmentados,

linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos, possibilitando identificar possíveis alterações nos pacientes com diarreia.

4.4. Exames microbiológicos e detecção molecular

4.4.1. Diagnóstico de *E. coli*

4.4.1.1. Caracterização microbiológica

Todas as amostras de fezes colhidas por suabe foram semeadas no meio de ágar acrescido de sangue ovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey, mantidas em condições de aerobiose a 37°C, por 72 horas, avaliadas a cada 24 horas, com vistas ao isolamento de *E. coli* e demais enteropatógenos bacterianos.

Colônias sugestivas de *E. coli* foram identificadas segundo características morfotintoriais, bioquímicas (Citrato EPM e Mili) e de cultivo (KRIEG & HOLT, 1994; TRABULSI, 2005), no laboratório de Doenças Infecciosas dos animais da FMVZ – UNESP, Botucatu-SP. Após a identificação fenotípica foi realizado o armazenamento das linhagens em meio de estoque Lignières, mantidas em temperatura ambiente (25°C) até o encaminhamento para o Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP, sob a responsabilidade do professor Dr. Domingos da Silva Leite, objetivando a detecção dos diferentes fatores de virulência.

4.4.1.2. Detecção fenotípica de hemolisinas em *E. coli* no meio de ágar sangue

A detecção foi realizada semeando todas as amostras de material no meio de ágar acrescido sangue ovino desfibrinado (5%), mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por três dias. As linhagens que apresentaram halo de hemólise total ao redor das colônias no meio de ágar sangue, com identificação concomitante de *E. coli* no ágar MacConkey e caracterizadas bioquimicamente, foram considerados como hemolíticas.

4.4.1.3. Detecção molecular dos fatores de virulência de *E. coli* pela reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A PCR foi realizada no Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da Unicamp, Campinas, SP, visando o diagnóstico dos seguintes fatores de virulência dos isolados de *E. coli*: FVL2 (*sfa*, *pap*, *iuc*, *hly*, *cnf-1*), FVL8 (*sfa*, *papGII*, *hly*, *iuc*, *usp*, *cnf-1*) e O157 (*vt1*, *vt2* e *eae*), além de k88, k99, CNF2, LT, *fimH*, *ag43*, *iuc* e *pap* (C, E).

O método para a detecção de DNA foi previamente descrito por Blanco et al. (1997) e consistiu inicialmente na inoculação das linhagens em caldo cérebro coração (BHI), a 37°C, “overnight”. Após este período, as estirpes foram semeadas em ágar TSA (Tryptic Soy Agar), a 37 °C, por 24 horas. Em seguida, duas ou três colônias típicas foram suspensas em 100 µL de água ultra pura estéril. Estas suspensões foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas (9676,8 g) por três minutos. Os sobrenadantes destes materiais foram utilizados para as reações de PCR.

As reações de PCR das soluções foram realizadas em termocicladores programados para pré-aquecimento a 94 °C/10 minutos e 30 ciclos de 94 °C/1 minuto, temperatura de anelamento de acordo com o gene pesquisado, temperatura de extensão de 72 °C/2 minutos. Após realizadas as amplificações do DNA bacteriano, foi adicionado às soluções 5 µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromoferol, 0,25% de xilenocianol e 25% de ficoll). O gel de agarose foi preparado em concentração 2% em TAE (tampão Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M e pH 8,0). Em cada poço do gel foram dispostos 10µL da mistura.

Em seguida foi realizada a eletroforese com 100mV por 40 minutos e amperagem variável. As bandas foram identificadas após incubação em solução de brometo de etídio (1,5 µg/mL), por 15 minutos, e visualizadas em transluminador de luz UV. Os géis foram fotografados e as imagens capturadas, respectivamente pelo sistema Image Master® VDS e programa LISCAP-Capture Application.

4.4.2. Diagnóstico de *Salmonella* spp.

As 116 amostras de fezes foram encaminhadas refrigeradas para o Laboratório de Microbiologia da FMVZ – UNESP, Botucatu-SP, sob responsabilidade técnica de Fernando José Pagnini Listoni (Técnico responsável pelo Laboratório) e Thays Mizuki Lucas (Mestranda do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública), onde foram realizados todos os procedimentos para o diagnóstico de *Salmonella* spp.

4.4.2.1. Caracterização microbiológica

Para o diagnóstico do gênero *Salmonella* as amostras de fezes colhidas nos suabes foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Tetrationato, e incubadas a 37 °C, “overnight”. Em seguida, as amostras foram cultivadas na superfície de placas contendo ágar *Salmonella-Shiguelia* (SS), com incubação a 37 °C por 18-24 horas. Colônias características do gênero *Salmonella* (de centro enegrecido no SS), foram submetidas a testes bioquímicos: produção de indol, utilização de citrato, lisina, H₂S, produção de urease, utilização de glicose e lactose, observação da motilidade e produção de fenilalanina desaminase, nos meios de MILI, EPM, e Citrato (TRABULSI et al., 1999). As linhagens de *Salmonella* sp. foram submetidas ao teste de aglutinação gênero-específica em lâmina, utilizando soro polivalente comercial anti-*Salmonella* flagelar e somático, de acordo com as recomendações do fabricante.

As linhagens caracterizadas como gênero *Salmonella* nos testes bioquímicos, e com aglutinação positiva em lâmina, foram acondicionadas em tubos de vidro vedados com tampa de borracha, no meio de Lignières, em temperatura ambiente (25°C), em duplicata, até o processamento para a classificação dos sorotipos. No momento do envio foram repicadas para o meio ágar nutriente (POPOFF & LE MINOR, 1992). Estas linhagens foram encaminhadas em refrigeração (4 - 8°C) para a caracterização dos sorotipos no Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro, RJ.

4.4.3. Diagnóstico de *Clostridium* spp.

As 116 amostras de fezes foram encaminhadas refrigeradas para o Laboratório de Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, para o diagnóstico de *Clostridium*, particularmente *C. perfringens* e *C. difficile*, e das toxinas A e/ou B de *C. difficile*.

4.4.3.1. Caracterização microbiológica

O diagnóstico microbiológico para *C. difficile* foi baseado na cultura anaeróbica das amostras fecais em ágar acrescido de sangue ovino (5%) desfibrinado, mantidas por três a cinco dias, a 37°C. Colônias sugestivas, com halo hemolítico, foram submetidas a coloração de Gram para confirmação a microscopia de bacilos Gram-positivos (QUINN et al., 1994).

4.4.3.1.1. Detecção molecular de toxinas de *C. difficile*

A detecção das toxinas A e/ou B de *C. difficile* foi realizada utilizando um kit comercial de ELISA e pela cultura de células Vero (DELMÉE, 2001). Para selecionar os esporos de *C. difficile*, volumes iguais de amostras de fezes e etanol a 96% foram misturados, e após a incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, alíquotas de 50µL foram inoculadas em placas contendo cicloserina-cefoxitina ágar frutose, suplementada com sangue de cavalo a 7% e taurocolato de sódio a 0,1%. Após a incubação anaeróbica, a 37°C durante 72 horas, todas as colônias sugestivas (FEDORKO & WILLIAMS, 1997) foram submetidas a um multiplex-PCR para um gene de limpeza (*tpi*) e detecção das toxinas A (TCDA), B (*tcdB*) e genes de toxinas binárias (gene *cdtB*) [SILVA et al., 2011].

4.4.3.1.2. Isolamento microbiano e detecção molecular de *C. perfringens*

Para o isolamento de *C. perfringens*, foi utilizado 0,08 a 0,12g de fezes. As amostras fecais foram diluídas em série utilizando fator 10 (10^{-1} a 10^{-6}).

Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram plaqueadas em ágar sulfito polimixina sulfadiazina, incubadas anaerobicamente a 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, as colônias características foram submetidas a PCR (VIEIRA et al., 2008).

Foram investigados os genes que codificam a toxina beta-2 (*cpb2*), enterotoxina (*cpe*) e as principais toxinas de *C. perfringens* (alfa, beta, épsolon e iota). A PCR foi anteriormente realizada para a detecção do gene de codificação NetB-(rede) (KEYBURN et al., 2008). Todas as reações de PCR, e amplificações foram realizadas em termociclador e os produtos foram visualizados sob luz UV em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (SILVA et al., 2011).

4.4.4. Diagnóstico de *Rhodococcus equi*

As 116 amostras de fezes foram encaminhadas refrigeradas para o Laboratório de Microbiologia da FMVZ – UNESP, Botucatu-SP, sob a responsabilidade técnica de Fernando José Pagnini Listoni e Thays Mizuki Lucas, onde foram realizados todos os procedimentos para o diagnóstico de *R. equi*.

4.4.4.1. Caracterização microbiológica de *Rhodococcus equi*

O diagnóstico de *R. equi*, foi realizado a partir do cultivo de amostras fecais em ágar sangue ovino (5%) desfibrinado (QUINN et al., 1994, 2005) e no meio seletivo CAZ-NB (ceftazidima, novobiocina e ciclohexamida), este último com vistas ao isolamento seletivo da bactéria.

4.4.4.2. Determinação de linhagens virulentas (VapA)

A totalidade das linhagens foi submetida à avaliação de virulência, mediante a detecção do perfil plasmidial, realizado pelo professor Shinji Takai do Departamento de Higiene Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da

Universidade de Kitasato, no Japão. Os isolados de *R. equi* foram enviados ao Japão no meio de Lignièris, em temperatura ambiente (25°C), em frascos estéreis, devidamente embalados, identificados e com autorização de exportação pelo Serviço de Defesa Animal do MAPA, Brasil, e permissão de importação do Ministério da Agricultura, Reflorestamento e Pesca do Japão.

4.4.2.1. Extração de DNA plasmidial

A obtenção de DNA plasmidial foi realizado pelo método de lise alcalina. O material gnético extraído foi analisado pela digestão com enzimas de restrição: *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI* e *EcoT22I*, visando a determinação dos plasmídios 85 a 90kb para as linhagens virulentas (VapA) e de 79 a 100kb para as linhagens de virulência intermediária (VapB) [BIRNBOIM & DOLY, 1979; TAKAI et al., 1993]

4.4.2.2. Reação em cadeia pela polimerase

A amplificação do material genético dos isolados foi realizada utilizando 10µL de DNA preparado em 50µL de volume contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50mM de KCl, 0,2mM de desoxinucleotídeos trifosfatos, 1,5mM de MgCl₂, 2,5U de *Taq* DNA polimerase e 1mM de cada primer. As linhagens foram submetidas a 30 ciclos de amplificação, nas seguintes condições: desnaturação por 90 segundos a 94°C, anelamento por um minuto a 55°C e extensão por 2 minutos a 72°C.

A detecção das sequências de genes de antígenos virulentos (15 – 17kDa) foi realizado utilizando os *primers* Forward 5'-GAC TCT TCA CAA GAC GGT-3' e Reverse 5'-TAG GCG TTG TGC CAG CTA-3', visando a amplificação de sequências entre 569 e 552 pares de base. Para as linhagens de virulência intermediária (20kDa) foram utilizados os *primers* Forward 5'-AAC GTA GTC GCG GTG AGAA-3' e Reverse 5'-ACC GAG ACT TGA GCG ACTA-3', para amplificação gênica entre 240 e 258 pares de base (Takai et al., 1995a,b). As linhagens que não apresentaram o perfil

plasmidial para VapA ou VapB foram consideradas avirulentas. Como controle foram utilizados cepas de referência para os diferentes tipos de plasmídios.

4.5. Exames para identificação de Rotavírus e Coronavírus

4.5.1. Detecção de Coronavírus

O diagnóstico de coronavírus foi realizado no Laboratório de Virologia, do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo – USP, sob responsabilidade do professor Dr. Paulo Eduardo Brandão, com intuito de identificação do vírus na totalidade das amostras fecais.

O método utilizado para extração do ácido nucleico viral seguido por reação em cadeia pela polimerase (nested RT-PCR), para a identificação e diagnóstico foi realizado conforme metodologia descrita por Brandão et al. (2005).

4.5.2. Detecção de Rotavírus

O diagnóstico de rotavírus foi realizado no Laboratório de Virologia, do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo – USP, sob responsabilidade do professor Dr. Fábio Gregori, com intuito de identificação do vírus na totalidade das amostras fecais.

O método utilizado para extração do ácido nucleico viral e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para a identificação e diagnóstico foi realizado conforme metodologia empregada com referência ao trabalho de Herring et al. (1982).

4.6. Diagnóstico de *Lawsonia intracellularis*, *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*

4.6.1. Diagnóstico de *Lawsonia intracellularis*

A extração do DNA foi realizada diretamente das fezes, utilizando-se de um *kit* comercial para extração de DNA de amostras fecais [Qiagen DNA Stool Mini kit (QIAGEN®)]. As modificações incluíram 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho maria após a adição do tampão de lise contido no *kit* (ASL Buffer). As amostras foram colocadas em nitrogênio líquido durante um minuto, seguido de banho maria a 90° C durante cinco minutos (nos primeiros dois ciclos). Em seguida, no terceiro e último ciclo, o material foi congelado em nitrogênio líquido por um minuto e em seguida descongelado e mantido em banho maria a 90° C por dez minutos. O DNA extraído a partir das amostras fecais foi armazenado a -20 °C até o uso nas análises moleculares. O DNA resultante deste protocolo de extração foi utilizado para a realização das demais técnicas de diagnóstico (*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp.).

O diagnóstico da *L. intracellularis* foi realizado através da reação em cadeia de polimerase (PCR), segundo metodologia descrita por Jones et al. (1993) e Guimarães-Ladeira et al. (2009).

Para o diagnóstico de *Lawsonia intracellularis* as amostras foram submetidas a amplificação do DNA da bactéria. O primeiro produto de PCR foi de aproximadamente 304 a 323 pares de base, amplificado usando os *primers* 5'-TGA AGG TAT TGG TAT TCT CC-3' (Forward) e 5'-TGA AGG TAT TGG TAT TCT CC-3' (Reverse). Para a segunda fase da reação (Nested) um produto de amplificação de aproximadamente 285 a 304 pares de base foi detectado pelos *primers* 5'-TTA CAG GTG AAG TTA TTG GG-3' (Forward) e 5'-CTT TCT CAT GTC CAT AAG C-3' (Reverse) (JONES, et al. 1993; GUIMARÃES-LADEIRA et al., 2009).

4.6.2. Detecção de Protozoários

O método diagnóstico empregado para a detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram com base na reação em cadeia de polimerase (PCR), segundo metodologia descrita por Hopkins et al. (1997), Xiao et al. (2001), Read et al. (2002).

4.6.2.1. Detecção molecular de *Cryptosporidium* spp.

Para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. As amostras foram submetidas ao isolamento e amplificação do DNA do parasita visando a detecção do gene 18S *small Subunit* (SSU) rRNA (XIAO et al., 2001; PAZ e SILVA, et al., 20013). O primeiro produto de PCR foi de aproximadamente 1.325 pares de base foi amplificado usando os *primers* 5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' (Forward) e 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3' (Reverse) para a reação inicial da PCR.

Para a segunda fase da reação (Nested) um produto de amplificação de aproximadamente 826 a 864 pares de base (dependendo da espécie/genótipo) foi detectado pelos *primers* 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3' (Forward) e 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' (Reverse) (XIAO et al., 2001; PAZ e SILVA et al., 2013).

4.6.2.2. Detecção molecular de *Giardia duodenalis*

Para o diagnóstico molecular de *G. duodenalis* foi utilizado um protocolo baseado em uma reação de Nested-PCR. Uma região de aproximadamente 292 pares de base do gene SSU r-DNA, amplificada inicialmente segundo a reação descrita por Hopkins et al., (1997) para uma reação única de PCR. Com o produto obtido da reação de PCR, foi realizado uma reação de Nested-PCR de acordo com o protocolo descrito por Read et al. (2002) e Macglade et al. (2003).

Foram utilizados inicialmente os *primers* 5'-CAT CCG GTC GAT CCT GCC-3' (Forward) e 5'-AGT CGA ACC CTG ATT CTC CGC CAG G-3'

(Reverse) (HOPKINS et al., 1997). Para a segunda fase da reação (nested) os *primers* utilizados foram GiarF 5'-GAC GCT CTC CCC AAG GAC-3' (Forward) e GiarR 5'-CTG CGT CAC GCT GCT CG-3' (Reverse) como descrito por Read et al. (2002).

4.6.3. Amplificação do DNA de *Lawsonia intracellularis*, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se uma solução de reagentes que já contém em seu interior o tampão de reação, DNTPS, MgCl₂ e a enzima DNA Polimerase (Go Taq[®] Green Master Mix), bastando apenas ao usuário acrescentar à reação os *primers* e o DNA da amostra. Neste caso, de forma semelhante as descrita acima, foram usados os *primers* específicos de *Lawsonia intracelullaris*, *Giardia duodenalis* (gene SSU) e *Cryptosporidium parvum* (gene SSU) para cada uma das reações com volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de GoTaq[®] Green Master Mix buffer, 10 pmol/µL de cada primer (1µL do primer) e 5µL do DNA da amostra. As condições de amplificação para cada um dos parasitas seguiram os seguintes protocolos: um ciclo de incubação inicial a 98°C por 30 segundos, para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos (*L. intracellularis*); um ciclo de incubação inicial a 96°C por 2 minutos, para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 35 ciclos de 96°C por 20 segundos, 59°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C (*G. duodenalis*). Para *C. parvum*, foi realizado um ciclo de incubação inicial a 98°C por 3 minutos, para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 39 ciclos de 94°C por 45 segundos, 59,1°C por 45 segundos, 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

4.6.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE (EDTA – tris bórico tamponado) e revelados com Syber safe. Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de 100 pares de base (bp), sendo analisadas e fotografados em analisador de imagem ImageQuant 300 (GE).

4.7. Exames parasitológicos

O diagnóstico dos parasitas intestinais (helmintos) foi realizado a partir da contagem e identificação dos ovos dos parasitas (OPG) pelo método de Gordon & Whitlock (1939) modificado, utilizando-se a câmara de McMaster.

4.8. Análise dos resultados

Os resultados obtidos após a realização das técnicas diagnósticas para identificação dos enteropatógenos e micro-organismos nas amostras fecais dos animais estudados, bem como a avaliação macroscópica das fezes e das respectivas alterações clinicopatológicas encontradas nos exames de hemogasometria e hemograma foram analisadas descritivamente.

5. RESULTADOS

Avaliando-se a distribuição dos potros com diarreia verificou-se que 33,93% (19/56) dos potros estavam distribuídos na primeira faixa etária (0-30 dias), 30,36% (17/56) se encontravam na segunda faixa etária (31-60 dias) e 35,71% (20/56) na terceira faixa etária (61-90 dias) [Tabela 1]. Os potros sem sinais entéricos, 16,67% (10/60) estavam dentro da primeira faixa etária, 21,67% (13/60) na segunda faixa etária e 61,67% (37/60) na terceira faixa etária (Tabela 1).

Tabela 1. Número de potros com (n = 56) ou sem (n = 60) diarreia, distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Faixas etárias (dias)		
	0 – 30	31 – 60	61 - 90
Potros com diarreia	19 (33,93%)	17 (30,36%)	20 (35,71%)
Potros sem diarreia	10 (16,67%)	13 (21,67%)	37 (61,67%)

n = número de amostras

O exame físico dos 56 potros com diarreia, cujo tempo de evolução dos sinais clínicos eram de 8,1 dias, revelaram em média, frequência cardíaca (FC) de 87,6 batimentos por minuto (bpm), frequência respiratória (FR) de 41,8 movimentos por minuto (mpm) e temperatura média de 38,5 graus Celsius (°C) (Tabela 2). O tempo de preenchimento capilar (TPC) do grupo dos animais com diarreia foi 67,9% (38/56) com o TPC de um segundo; 23,2% (13/56) com o TPC de dois segundos e 8,9% (5/56) com o TPC de três segundos. O grupo dos potros sem diarreia apresentou, 86,7% (52/60) animais com o TPC de um segundo e 13,33% (8/60) com o TPC de dois segundos. A avaliação do grau de desidratação foi realizada nos dois grupos, dos quais 68% (38/56) dos potros do grupo com diarreia apresentaram desidratação de leve a grave. O grau de desidratação dos 38 potros com alterações clínicas evidentes, mostrou que 48,2% (27/56) dos potros com grau leve, 16% (9/56) grau moderado e 3,6% (2/56) grau grave.

A avaliação dos parâmetros clínicos, durante exame físico geral e específico revelou que no grupo dos potros com (56) e sem diarreia (60), não foram visualizados, halo endotoxêmico, nem mesmo alteração na coloração das mucosas e postura. Portanto, todos os animais apresentavam coloração de mucosas (oculopalpebrais e bucal) róseas e posição quadrupedal (FEITOSA, 2004).

Tabela 2. Média, mediana e desvio padrão dos valores referentes ao exame físico e tempo de evolução da diarreia em 56 potros, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Tempo de evolução (dias)	FC (bpm)	FR (mpm)	Temperatura (°C)
Média	8,1	87,6	41,8	38,5
Mediana	2	84	36	38,7
Desvio padrão	20,4	24,1	20,3	1,5

bpm = batimentos por minuto
mpm = movimentos por minuto

O grupo sem (60) diarreia com idade média de 73,1 dias, apresentaram frequência cardíaca de 85,7 batimentos por minuto (bpm), frequência respiratória de 42 movimentos por minuto e temperatura média de 38,7 graus Celsius (°C) [Tabela 3].

Tabela 3. Média, mediana e desvio padrão dos valores referentes ao exame físico dos potros sem (n = 60) diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	FC (bpm)	FR (mpm)	Temperatura (°C)
Média	85,7	42,0	38,7
Mediana	80,0	36,0	38,7
Desvio padrão	30,6	18,8	0,6

bpm = batimentos por minuto
mpm = movimentos por minuto

A média dos valores hematimétricos obtidos, referente ao grupo dos 56 potros com diarreia, foram, $9,3 \times 10^6$ hemácia/ μ l, 10,0 hemoglobina g/dl, 35,2% hematócrito, 37,5 fL volume corpuscular médio (VCM), 34,3% concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), 6,8 g/dL proteína plasmática, 23,2 distribuição de células vermelhas no sangue (RDW), $58,6 \times 10^3$ plaquetas por

microlitro (μL) (5,4%, 4/56 com trombocitopenia), 492,1 gramas por decilitro (g/dL) de fibrinogênio (26,8%, 15/56 com hiperfibrinogenemia), 10148,1 leucócitos por microlitro (12,5%, 7/56 com leucocitose), 75,0 metamielócitos por microlitro, 199,8 bastonetes por microlitro, 4331,0 neutrófilos segmentados por microlitro (17,8%, 10/56 com leucocitose), 4.331 linfócitos por microlitro (37,5%, 21/56 com neutrofilia), 87,5 eosinófilos por microlitro, 64,0 basófilos por microlitro, 500 monócitos por microlitro (Tabela 4).

Os valores das médias, referente a hemogasometria realizada nos 56 potros com diarreia, apresentaram 7,3 de pH sanguíneo (16%, 9/56 com acidose); 41,4 mm Hg de pressão de CO_2 sanguíneo (PCO_2); 35,8 mmHg de pressão de O_2 sanguíneo (PO_2); 133,4 mmol/L de sódio (Na) (66%, 37/56 com hiponatremia), 3,1 mmol/L de potássio (K) (39,3%, 22/56 com hipocalemia); 1,3 mmol/L de cálcio ionizado (iCa) (5,3%, 3/56 com hipocalemia); 31,7% de hematócrito (Hct); 22,8 mmol/L de bicarbonato (HCO_3) (16%, 9/56 com diminuição do bicarbonato); 24,5 mmHg do total de dióxido de carbono sanguíneo (tCO_2), -2,1 mmol/L de excesso de base (BE), 59,4% de saturação do oxigênio (sO_2) e 10,8 g/dL de hemoglobina (Hb) (Tabela 5).

Tabela 4. Média, mediana e desvio padrão dos valores hematimétricos referente aos 56 potros com diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Hemácia/ μL	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	VCM (fL)	CHCM %	PT (plasma) g/dL	RDW	Plaquetas/ μL	Fibrinogenio (mg/dL)	Leucócitos/ μL	Metamielócitos/ μL	Bastonetes/ μL	Segmentados/ μL	Linfócitos/ μL	Eosinófilos/ μL	Basófilos/ μL	Monócitos/ μL
9,3x10 ⁶	10,0	35,2	37,5	34,3	6,8	23,2	58,6x10 ³	492,1	10,1x10 ³	75,0	199,8	4,3x10 ³	1,8x10 ³	87,5	64,0	0,5x10 ³
9,5x10 ⁶	12,2	35,5	36,2	34,5	6,7	23,0	17675,0	600,0	9,3x10 ³	76,0	110,5	1,6x10 ³	1,7x10 ³	19,0	42,5	288,0
1609641,7	4,8	5,9	4,8	2,1	0,9	1,8	100433,6	237,5	4973,1	69,1	237,2	4987,6	1728,9	148,1	77,8	633,4

Valores de referência:

Hemácia (x10 ⁶ / μL)	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	VCM (fL)	CHCM %	PT (plasma) g/dL	RDW	Plaquetas (x10 ³ / μL)	Fibrinogenio (mg/dL)	Leucócitos (x10 ³ / μL)	Metamielócitos/ μL	Bastonetes/ μL	Segmentados (x10 ³ / μL)	Linfócitos (x10 ³ / μL)	Eosinófilos (x10 ³ / μL)	Basófilos (x10 ³ / μL)	Monócitos (x10 ³ / μL)
7,9 – 12	10,9 – 15,3	33,0 – 48,0	33,0 – 38,0	34,0 - 40	4,3 – 7,0	-	38,0 – 53,0	200 - 500	6,2 – 15,0	-	-	4,1 – 5,4	1 – 4,9	0 – 0,55	0 – 0,07	0,07 – 0,76

Fonte: Koterba, A. M.; Drumond, W. H.; Koseh, P. C. Equine Clinical Neonatology, Philadelphia, 1990, Lea & Febier

Tabela 5. Média e desvio padrão dos valores hemogasométricos referente aos 56 potros com diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo.

pH	PCO2 (mm Hg)	PO2 (mm Hg)	BE (mmol/L)	HCO3 (mmol/L)	tCO2 (mm Hg)	SO2 (%)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	iCa (mmo/L)	Htc (%)	Hb (g/dL)
7,3 ± 0,1	41,4 ± 5,5	35,8 ± 9,1	-2,1 ± 7,5	22,8 ± 5,4	24,5 ± 6,4	59,4 ± 11,7	133,4 ± 7,3	3,1 ± 0,7	1,3 ± 0,3	31,7 ± 6,7	10,8 ± 2,3

Valores de referência:

pH	PCO2 (mm Hg)	PO2 (mmHg)	BE (mmol/L)	HCO3 (mmol/L)	tCO2 (mm Hg)	SO2 (%)	Na (mmol/l)	K (mmol/l)	iCa (mmol/L)	Hb (g/dL)
7,32 – 7,44	52,7 – 114,2	15 – 42	-7,33 – 3,9	19 – 27,4	31 - 33	-	148 ± 12	4,8 ± 1	0,68 ± 0,6	10,9 – 15,3

Fonte: Koterba, A. M.; Drumond, W. H.; Koseh, P. C. Equine Clinical Neonatology, Philadelphia, 1990, Lea & Febier

A avaliação macroscópica das fezes colhidas de 116 potros permitiu constatar que, dos 56 animais que apresentavam diarreia, 64,29% apresentavam fezes líquidas e 35,71% fezes pastosas amolecidas, com predomínio da coloração esverdeada das fezes (60,71%), seguida da coloração amarelada (28,7%), amarronzada (8,93%) e avermelhada (1,79%) (Tabelas 6 e 7). O odor fétido das fezes foi observado em 64,29%, enquanto que o restante dos animais 20 (35,71%) não apresentava alterações no odor das fezes (Tabela 8). Foi observada a presença de sangue nas fezes de 1,79% (1/56) deste grupo. Dos 60 potros sem sinais entéricos, 1,67% apresentaram fezes pastosas, 96,67% apresentaram coloração esverdeada, seguidas de 1,67% (1/60), amareladas e 1,67% (1/60) amarronzadas (Tabelas 6 e 7). O odor fétido das fezes foi observado em apenas 1 (1,66%) dos animais (Tabela 8).

Tabela 6. Avaliação do escore fecal em 116 potros com e sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Consistência		
	Líquida	Pastosa	Consistente
Potros com diarreia n = 56	36 (64,29%)	20 (35,71%)	0
Potros sem diarreia n = 60	0	1 (1,67%)	59 (98,33%)

n = amostras testadas

Tabela 7. Característica da coloração das fezes e a presença ou não da diarreia em 116 potros, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Cor			
	Amarelada	Amarronzada	Esverdeada	Avermelhada
Potros com diarreia n = 56	16 (28,7%)	5 (8,93%)	34 (60,71%)	1 (1,79%)
Potros sem diarreia n = 60	1 (1,67%)	1 (1,67%)	58 (96,67%)	0 (0%)

n = número de amostras testadas

Tabela 8. Característica das fezes avaliando-se a relação do odor e a presença ou não da diarreia em 116 potros, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Odor	
	Característico	Fétido
Potros com diarreia	20 (35,71%)	36 (64,29%)
n = 56		
Potros sem diarreia	59 (98,33%)	1 (1,67%)
n = 60		

n = amostras testadas

Ao avaliar as características físicas das fezes, pode ser observado também que, dos 56 potros com diarreia, 94,63% (53/56) apresentavam aumento na frequência de defecação e apenas 5% apresentavam frequência normal. Em contraste, nos 60 animais sem sinais entéricos, apenas 3,33% (2/60) apresentavam um aumento na frequência de defecação (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação da frequência de defecação de 116 potros (56 com diarreia e 60 sem diarreia), provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Frequência de defecação	
	Aumentada	Normal
Potros com diarreia	53 (94,64%)	3 (5,36%)
n = 56		
Potros sem diarreia	2 (3,33%)	58 (96,67%)
n = 60		

n = amostras testadas

Observou-se que dos potros com diarreia, em 89,3% (50/56) foram encontrados os agentes pesquisados em suas amostras fecais (Tabela 10), constatando-se em 32% (16/50) a presença de um agente (monoinfecção) e em 68% (34/50) de dois ou mais agentes (Tabela 11). No grupo sem sinais entéricos a taxa de detecção dos enteropatógenos nas amostras fecais foi de 80% (48/60) (Tabela. 10). Destes foi verificada em 20% (12/48) a presença de monoinfecção e em 58,33% (28/48) o isolamento de mais de um enteropatógeno (Tabela 11).

Tabela 10. Detecção de enteropatógenos em amostras de fezes de potros com e ou sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Enteropatógenos	Diarreia (n = 56)		Sem Diarreia (n = 60)	
	n	(%)	n	(%)
Amostras positivas	50	(89,30)	48	(80,00)
Amostras negativas	6	(10,70)	12	(20,00)
Total	56	(100,00)	60	(100,00)

n = amostras testadas

p<0,05

Tabela 11. Frequência de monoinfecção e coinfecção de enteropatógenos em potros com e sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Enteropatógenos	Diarreia (n = 46)		Sem Diarreia (n = 49)	
	n	(%)	n	(%)
Monoinfecção	16	(32,00)	12	(25,00)
Coinfecção	34	(68,00)	28	(58,33)

n = amostras testadas

Escherichia coli foi o micro-organismo mais frequentemente isolado (62,5%, 35/56), seguido de *Salmonella* sp. (25%, 14/56), *C. perfringens* (17,86%, 10/56), *Strongyloides* (25%, 14/56), *Estrongilídeos* (10,71%, 6/56), *R. equi* (7,14%, 4/56), *Cryptosporidium* spp. (5,36%, 3/56), *C. difficile* (1,78%, 1/56) e Coronavírus (1,78%, 1/56) no grupo dos potros com diarreia (Tabela 12). No grupo sem sinais entéricos a ordem decrescente dos enteropatógenos isolados foi *E. coli* (61,66%, 37/60), *Strongyloides* (25%, 15/60), *Estrongilídeos* (16,66%, 10/60), *R. equi* (10%, 6/60), *C. perfringens* (10%, 6/60), *Salmonella* spp. (6,67%, 4/60), *C. difficile* (1,67%, 1/60), Coronavírus (1,67%, 1/60) e *Cryptosporidium* spp. (1,67%, 1/60) (Tabela 13).

Lawsonia intracellularis e rotavírus não foram detectados no grupo com diarreia tampouco nos animais sem sinais entéricos [Tabela 12 e 13].

Tabela 12. Frequência de enteropatógenos isolados em amostras de fezes diarreicas de 56 potros distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Faixa etária (dias)			Total
	0 – 30 (n = 19)	31 – 60 (n = 17)	61 – 90 (n = 20)	
Enteropatógenos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Escherichia coli</i>	14 (73,70)	11 (70,59)	10 (55,00)	35 (62,50)
<i>Salmonella</i> sp.	2 (10,53)	5 (29,41)	7 (35,00)	14 (25,00)
<i>Clostridium perfringens</i>	7 (36,84)	3 (17,65)	ND	10 (17,86)
<i>Clostridium difficile</i>	1 (5,26)	ND	ND	1 (1,78)
<i>Rhodococcus equi</i>	2 (10,53)	2 (11,76)	ND	4 (7,14)
<i>Lawsonia intracellularis</i>	ND	ND	ND	0
Coronavírus	1 (5,26)	ND	ND	1 (1,78)
Rotavírus	ND	ND	ND	0
<i>Giardia duodenalis</i>	ND	1 (5,88)	ND	1 (1,78)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1 (5,26)	1 (5,88)	1 (5,00)	3 (5,36)
Estrongilídeos	2 (10,53)	1 (5,88)	3 (15,00)	6 (10,71)
Strongyloides	3 (15,79)	3 (17,65)	8 (40,00)	14 (25,0)

n = amostras testadas
ND = enteropatógeno não detectado

Tabela 13. Frequência de enteropatógenos isolados em amostras de fezes não diarreicas de 60 potros distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Faixa Etária (dias)			total
	0 – 30 (n = 10)	31 – 60 (n = 13)	61 – 90 (n = 37)	
Enteropatógenos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Escherichia coli</i>	6 (50,00)	8 (61,54)	23 (62,16)	37 (61,66)
<i>Salmonella</i> sp.	ND	1 (7,70)	3 (8,10)	4 (6,67)
<i>Clostridium perfringens</i>	2 (20,00)	2 (15,40)	2 (5,40)	6 (10,00)
<i>Clostridium difficile</i>	1 (10,00)	ND	ND	1 (1,67)
<i>Rhodococcus equi</i>	2 (20,00)	2 (15,40)	2 (10,81)	6 (10,00)
<i>Lawsonia intracellularis</i>	ND	ND	ND	0
Coronavírus	ND	ND	1 (2,70)	1 (1,67)
Rotavírus	ND	ND	ND	0
<i>Giardia duodenalis</i>	ND	ND	ND	0
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1 (10,00)	ND	ND	1 (1,67)
Estrongilídeos	2 (20,00)	1 (7,70)	7 (21,62)	10 (16,66)
Strongyloides	2 (20,00)	1 (7,70)	12 (32,43)	15 (25,00)

n = amostras testadas
ND = enteropatógeno não detectado

A frequência dos isolados de *Salmonella* spp. e subespécies, nos potros com (56) diarreia, divididos em três faixas etárias foi, respectivamente, *Salmonella* Saintpaul 5,26% (1/19, 0 a 30 dias) e 5,88% (1/17, 31 a 60 dias); *Salmonella* Panama 5,26% (1/19, 0 a 30 dias) e 5% (1/20, 61 a 90 dias); *Salmonella* Infantis 17,65% (3/17, 31 a 60 dias) e 10% (2/20, 61 a 90 dias); *Salmonella* Typhimurium 15% (3/20, 61 a 90 dias); *Salmonella* entérica subsp. Entérica (5,88%, 31 a 60 dias); *Salmonella* Muechen 5% (1/20, 61 a 90 dias), representados pela tabela 14.

Tabela 14. Frequência de sorotipos em isolados do gênero *Salmonella* em 56 potros com diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Enteropatógeno	Faixa etária (dias)			Total
	0 – 30 n = 19	31 - 60 n = 17	61 - 90 n = 20	
<i>Salmonella</i> sp.	2 (10,53%)	5 (29,41%)	7 (35%)	14 (25,00%)
<i>Salmonella</i> Saintpaul	1 (5,26%)	1 (5,88%)	ND	2 (3,57%)
<i>Salmonella</i> Panama	1 (5,26%)	ND	1 (5,00%)	2 (3,57%)
<i>Salmonella</i> Infantis	ND	3 (17,65%)	2 (10,0%)	5 (8,92%)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ND	ND	3 (15,0%)	3 (5,36%)
<i>Salmonella</i> subsp. Enterica	ND	1 (5,88%)	ND	1 (1,78%)
<i>Salmonella</i> Newport	ND	ND	ND	0
<i>Salmonella</i> Muechen	ND	ND	1 (5,0%)	1 (1,78%)

n = amostras testadas

ND = enteropatógeno não detectado

A frequência dos isolados de *Salmonella* spp. e subespécies, nos potros sem diarreia, divididos em três faixas etárias foi respectivamente, *Salmonella* Saintpaul 2,7% (1/37, 61 a 90 dias); *Salmonella* Infantis 7,7% (1/13, 31 a 60 dias); *Salmonella* Typhimurium 2,7% (1/37, 61 a 90 dias); *Salmonella* Newport 2,7% (1/37, 61 a 90 dias), representados pela tabela 15.

Tabela 15. Frequência de sorotipos do gênero *Salmonella* spp. e suas subespécies em 60 potros sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Enteropatógeno	Faixa etária (dias)			Total 60
	0 – 30 n = 10	31 - 60 n = 13	61 - 90 n = 37	
<i>Salmonella</i> sp.	ND	1 (7,70%)	3 (8,10%)	4 (6,66%)
<i>Salmonella</i> Saintpaul	ND	ND	1 (2,70%)	1 (1,66%)
<i>Salmonella</i> panamá	ND	ND	ND	0
<i>Salmonella</i> Infantis	ND	1 (7,70%)	ND	1 (1,66%)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ND	ND	1 (2,70%)	1 (1,66%)
<i>Salmonella</i> subsp. <i>Enterica</i>	ND	ND	ND	0
<i>Salmonella</i> Newport	ND	ND	1 (2,70%)	1 (1,66%)
<i>Salmonella</i> Muechen	ND	ND	ND	0

n = amostras testadas

ND = enteropatógeno não detectado

A detecção dos enteropatógenos em monoinfecção e coinfeções diagnosticados nos animais com diarreia, por ordem decrescente, estão listados juntamente com as frequências dentro de três faixas etárias distintas (Tabela 16).

Tabela 16. Detecção de enteropatógenos em monoinfecções e em coinfecções de amostras de fezes diarreicas de 56 potros, distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Enteropatógeno	0 – 30 dias		31 – 60 dias		61 – 90 dias		Total
	n = 19	(%)	n = 17	(%)	n = 20	(%)	n (%)
<i>E. coli fimH</i>	1	(5,26)	ND	0	1	(5)	2 (3,57)
<i>E. coli</i>	3	(15,79)	1	(5,88)	4	(20)	8 (14,28)
<i>R. equi</i> vap A (plasmídeo 85kb) tipo I	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>Cryptosporidium</i> spp.	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>E. coli papC</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A + <i>C. difficile</i>	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A	2	(10,53)	ND	0	ND	0	2 (3,57)
<i>E. coli</i> + Strongyloides	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli papC</i> + Strongyloides + Estrongilídeos	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>Salmonella</i> . Saintpaul	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli</i> + <i>Salmonella</i> ser. Saintpaul	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A + <i>Salmonella</i> Panama + Strongyloides + Estrongilídeos	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>C. perfringens</i> Toxina A + <i>R. equi</i> vap A + <i>R. equi</i> (87kb) tipo I + Strongyloides + Coronavírus	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>Salmonella</i> Panama + Strongyloides	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli papC</i> + <i>Salmonella</i> Infantis + Strongyloides	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>Salmonella</i> Typhimurium + Strongyloides	ND	0	ND	0	2	(10)	2 (3,57)
<i>Salmonella</i> enterica subsp. enterica + Strongyloides + Estrongilídeos	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>Salmonella</i> Muechen + Strongyloides	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>Salmonella</i> ser. Infantis + Strongyloides	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>Salmonella</i> Infantis + <i>C. perfringens</i> Toxina A	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>Salmonella</i> ser. Infantis + Strongyloides + Estrongilídeos	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>Salmonella</i> Infantis	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + Strongyloides + Estrongilídeos	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i>	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A + <i>R. equi</i> vap A + <i>R. equi</i> (85kb) tipo I + <i>R. equi</i> (87kb) tipo I	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli</i> + Strongyloides	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i>	2	(10,53)	2	(11,76)	1	(5)	5(8,93)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A + <i>R. equi</i> (85kb) tipo I + <i>Giardia</i> sp.	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli</i> hemol	1	(5,26)	1	(5,88)	ND	0	2 (3,57)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>E. coli</i> hemol + Estrongilídeo	ND	0	ND	0	1	(5)	1 (1,78)
<i>C. perfringens</i> Toxina A β 2	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>Cryptosporidium</i> spp.	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> e <i>papC</i> + <i>E. coli</i> hemol.	ND	0	1	(5,88)	ND	0	1 (1,78)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	(5,26)	ND	0	ND	0	1 (1,78)

n = amostras testadas

ND = enteropatógeno não detectado

No grupo controle foram observadas monoinfecções e coinfecções, as quais estão listadas na tabela 17, juntamente com a subdivisão dos animais acometidos em três diferentes faixas etárias.

Tabela 17. Detecção de enteropatógenos em monoinfecções e em coinfecções de amostras de fezes não diarreicas de 60 potros distribuídos em três diferentes faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Enteropatógeno	0 – 30 dias		31 – 60 dias		61 – 90 dias		Total
	n = 10	(%)	n = 13	(%)	n = 37	(%)	n (%)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>Salmonella</i> Typhimurium	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli</i>	ND	0	2	(15,38)	5	(13,51)	7 (11,7)
<i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A + <i>C. perfringens</i> toxina A β 2	ND	0	1	(7,7)	ND	0	1 (1,67)
<i>E. coli</i> + Strongyloides	ND	0	ND	0	2	(5,40)	2 (3,33)
<i>R. equi</i> avirulento + Strongyloides	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
Strongyloides	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli ag43</i> + <i>Salmonella</i> Saintpaul + <i>R. equi</i> vap A	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli ag43</i>	ND	0	1	(7,7)	3	(8,11)	1 (1,67)
<i>E. coli</i> + Coronavírus	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli</i> + <i>Salmonella</i> ser. Infantis	ND	0	1	(7,7)	ND	0	1 (1,67)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>Salmonella</i> Newport + Strongyloides	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + Strongyloides	2	(20)	ND	0	1	(2,70)	3 (5)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i>	ND	0	1	(7,7)	3	(8,11)	4 (6,67)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A + Estrongilídeos	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>C. perfringens</i> Toxina A	1	(10)	ND	0	ND	0	1 (1,67)
<i>E. coli fimH</i>	ND	0	1	(7,7)	ND	0	1 (1,67)
<i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A + <i>C. difficile</i> A/B + <i>R. equi</i>	1	(10)	ND	0	ND	0	1 (1,67)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>E. coli papC</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A +	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli</i> hemol	1	(10)	1	(7,7)	ND	0	2 (3,33)
Estrongilídio	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>E. coli papC</i>	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>C. perfringens</i> Toxina A β 2 + <i>C. perfringens</i> toxina A + <i>R. equi</i> vap A + <i>R. equi</i> (plasmídeo 87kb) tipo I + Strongyloides + Estrongilídeos	ND	0	1	(7,7)	ND	0	1 (1,67)
<i>R. equi</i> avirulento	1	(10)	1	(7,7)	ND	0	2 (3,33)
<i>E. coli ag43</i> + Strongyloides	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli ag43</i> + Strongyloides + Estrongilídeos	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
Strongyloides + Estrongilídeos	ND	0	ND	0	3	(8,11)	3 (5)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + Estrongilídeos	1	(10)	ND	0	ND	0	1 (1,67)
Estrongilídio	ND	0	ND	0	1	(2,70)	1 (1,67)
<i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	(10)	ND	0	ND	0	1 (1,67)

n = amostras testadas

ND = enteropatógeno não detectado

A identificação e contagem de ovos por grama de fezes do grupo dos potros com diarreia revelou 20 animais positivos. Destes, 6 foram positivos para *S. westeri*, correspondendo a 10,53% (0 a 30 dias), 6,0% (31 a 60 dias) e 15% (61 a 90 dias) no total de animais por cada faixa etária do estudo (Tabela 18). Os 14 animais infectados por *Strongyloides* apresentaram uma ocorrência de 15,80% (0 a 30 dias), 15,80% (31 a 60 dias) e 40% (61 a 90 dias) (Tabela 18).

Tabela 18. Identificação dos endoparasitas e o total da contagem de ovos por grama de fezes de 20 potros* com diarreia, divididos em três faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Faixa etária (dias)		
	0 - 30 (n = 19)	31 - 60 (n = 17)	61 - 90 (n = 20)
Enteropatógeno	n	n	n
Strongilídeos	2 (10,53%)	1 (6,0%)	3 (15%)
Potro 3 (O.P.G)			800
Potro 7 (O.P.G)	50		
Potro 14 (O.P.G)		8500	
Potro 17 (O.P.G)			3100
Potro 18 (O.P.G)	50		
Potro 24 (O.P.G)			350
Strongyloides (<i>S. westeri</i>)	3 (15,80%)	3 (15,80%)	8 (40%)
Potro 1 (O.P.G)		500	
Potro 3 (O.P.G)			450
Potro 7 (O.P.G)	550		
Potro 8 (O.P.G)	38550		
Potro 9 (O.P.G)			250
Potro 10 (O.P.G)			50
Potro 11 (O.P.G)			1500
Potro 12 (O.P.G)			400
Potro 14 (O.P.G)		10900	
Potro 15 (O.P.G)			1250
Potro 16 (O.P.G)		400	
Potro 17 (O.P.G)			400
Potro 18 (O.P.G)	550		
Potro 21 (O.P.G)			750

Potro* = animais positivos para endoparasitas, testados pelo método de Gordon & Whitlock (1939) modificado

n = amostras testadas

O.P.G = ovos por grama de fezes

A identificação e contagem de ovos por grama de fezes do grupo dos potros sem diarreia revelou 25 animais positivos, destes, 10 estavam positivos para *S. westeri*, correspondendo a 20% (0 a 30 dias), 7,7% (31 a 60 dias) e 18,9% (61 a 90 dias) no total de animais por faixa etária (Tabela 17). Os 15 animais infectados por *Strongyloides* tiveram uma distribuição de 20% (0 a 30 dias), 7,7% (31 a 60 dias) e 32,43% (61 a 90 dias) (Tabela 19).

Tabela 19. Identificação dos endoparasitas e o total da contagem de ovos por grama de fezes de 25 potros* sem diarreia, divididos em três faixas etárias, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo.

	Faixa etária (dias)		
	0 - 30 (n = 10)	31 - 60 (n = 13)	61 - 90 (n = 37)
Enteropatógeno	n	n	n
Estrongilídeos	2 (20%)	1 (7,70%)	7 (19%)
Potro 22 (O.P.G)			500
Potro 25 (O.P.G)			250
Potro 26 (O.P.G)		1100	
Potro 28 (O.P.G)			50
Potro 31 (O.P.G)			18500
Potro 32 (O.P.G)	50200		
Potro 34 (O.P.G)	2350		
Potro 35 (O.P.G)			700
Potro 36 (O.P.G)			19500
Potro 37 (O.P.G)			20450
Strongyloides (<i>S. westeri</i>)	2 (20)	1 (7,70)	12 (32,43)
Potro 2 (O.P.G)			12000
Potro 4 (O.P.G)			3900
Potro 5 (O.P.G)			7500
Potro 6 (O.P.G)			11200
Potro 13 (O.P.G)			250
Potro 19 (O.P.G)	5000		
Potro 20 (O.P.G)	30700		
Potro 26 (O.P.G)		950	
Potro 27 (O.P.G)			850
Potro 28 (O.P.G)			300
Potro 29 (O.P.G)			50
Potro 31 (O.P.G)			5000
Potro 33 (O.P.G)			500
Potro 35 (O.P.G)			50
Potro 37 (O.P.G)			50

Potro* = animais positivos para endoparasitas, testados pelo método de Gordon & Whitlock (1939) modificado
n = amostras testadas
O.P.G = ovos por grama de fezes

O isolamento de micro-organismos considerados menos comum em potros, tais como *Hafnia alvei*, *Enterobacter agglomerans* e *Providencia rettgeri* (potro 41 dias a haras 11); *Proteus vulgaris* (potro 90 dias a haras 13); *Citrobacter freundii* (potro 90 dias a haras 13); *Citrobacter* sp. (potro 60 dias – haras 13); *Proteus mirabilis* (potro 2 dias a hospital veterinário) no grupo dos animais com diarreia estão representados pela tabela 20.

Tabela 20. Micro-organismos, entéricos menos comuns em potros, isolados de 5 animais com diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Isolamento	Idade (dias)	Propriedade
<i>Hafnia alvei</i> + <i>Proteus mirabilis</i>	24	Haras 2
<i>Hafnia alvei</i> + <i>Enterobacter agglomerans</i> + <i>Providencia rettgeri</i>	41	Haras 11
<i>Proteus vulgaris</i>	90	Haras 13
<i>Citrobacter freundii</i>	90	Haras 13
<i>Citrobacter</i> sp.	60	Haras 13
ND	70	Haras 6

ND = micro-organismo não detectado

O grupo controle (60) permitiu o isolamento de *Serratia rubidaea* e *Edwardsiella agglomerans* (potro 1 dia, haras 7); *Edwardsiella tarda* (potro 60 dias, haras 12); *Citrobacter* sp. e *Hafnia alvei* (potro 90 dias, haras 12); *Citrobacter* spp. (potro 80 dias – haras 14); *Edwardsiella tarda* (potro 90 dias, haras 15), como no grupo dos animais com diarreia, estes não possuíram qualquer associação com micro-organismos patogênicos (Tabela 21).

Tabela 21. Micro-organismos, menos comuns em potros, isolados de 6 animais sem diarreia, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Isolamento	Idade (dias)	Propriedade
<i>Serratia rubidaea</i> + <i>Edwardsiella agglomerans</i>	1	Haras 7
<i>Enterobacter agglomerans</i>	60	Haras 11
<i>Edwardsiella tarda</i>	60	Haras 12
<i>Citrobacter</i> sp. + <i>Hafnia alvei</i>	90	Haras 12
<i>Citrobacter</i> spp.	80	Haras 14
<i>Edwardsiella tarda</i>	90	Haras 15
ND	83	Haras 1
ND	68	Haras 6
ND	113	Haras 11
ND	1	Haras 12
ND	60	Haras 14
ND	80	Haras 14

nd = não detectado
ND = micro-organismo não detectado

A frequência de mortalidade durante a ocorrência dos surtos nos potros com diarreia foi de 13,33% (6/56), já o grupo controle apresentou 3,33% (2/60) de óbitos (tabela 22). A taxa de letalidade referente aos potros com diarreia foi de 100% (1/1) no haras 5, 14,3% (1/7) no haras 8, 100% (2/2) no haras 9, 100% (2/2) no haras 10, 33,33% (1/3) no haras 14. Estes dados, o município dos criatórios e a raça dos animais estão listados na tabela 23. Nos haras onde ocorreram as mortes dos potros, os enteropatógenos isolados em monoinfecção e coinfeções dos animais com diarreia foram, respectivamente, *E. coli* juntamente com *C. perfringens* Toxina A e *Salmonella* Panama; *E. coli* fimbria H, *E. coli* papC e *Salmonella* Infantis; *Salmonella* Typhimurium; *Salmonella* entérica subsp. enterica; *Salmonella* Muechen. Dentre os animais mortos apenas um não foi possível a identificação de qualquer enteropatógeno estudado. O grupo dos animais sem diarreia que vieram a óbito foi possível isolar *E. coli* e *Salmonella* Infantis; *E. coli* fimH, *E. coli* ag43 e *Salmonella* Newport (Tabela 24).

Tabela 22. Frequência de mortalidade em 56 potros com diarreia e 60 sem sinais entéricos em criatórios de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Mortalidade	
	Não	Sim
Potros com diarreia	39 (86,67%)	6 (13,33%)
n = 56		
Potros sem diarreia	58 (96,66%)	2 (3,33%)
n = 60		

n = amostras testadas

Tabela 23. Relação entre o número de potros com (n = 56) e sem diarreia (n = 60), raças acometidas e taxa de mortalidade dos animais, provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo (2011 – 2012).

Propriedade	Município	Raça	Total de potros	Potros com diarreia	Potros sem diarreia	Mortalidade	Letalidade
			n	n	n	n (%)	(%)
Haras 1	Americana	Puro Sangue Inglês	10	7	3	ND	ND
Haras 2	Orlândia	Brasileiro de Hipismo	14	7	6	ND	ND
Haras 3	Cesário Lange	Puro Sangue Inglês	10	1	3	ND	ND
Haras 4	Tupã	Quarto de milha	14	2	0	ND	ND
Haras 5	Botucatu	Manga Larga Paulista	NI	1 [†]	0	1	(100)
Haras 6	Arandu	Puro Sangue Inglês	NI	1	2	ND	ND
Haras 7	Quadra	Manga Larga Paulista	40	1	1	ND	ND
Haras 8	Catanduva	Manga Larga Paulista	60	7 [†]	1	1 (1,66)	(14,8)
Haras 9	Cerqueira César	Manga Larga Paulista	30	2 [†]	1 [†]	2 (6,66)	(100)
Haras 10	Bauru	Quarto de Milha	12	2 ^{††}	1 [†]	3 (25)	(100)
Haras 11	Bauru	Quarto de Milha	22	7	9	ND	ND
Haras 12	Brotas	Quarto de Milha	62	9	19	ND	ND
Haras 13	Bofete	Quarto de Milha	10	3	0	ND	ND
Haras 14	Botucatu	Quarto de Milha	8	3 [†]	4	1 (12,5)	(33,33)
Haras 15	Avaré	Paint Horse	20	0	10	ND	ND
Hospital Veterinário	Botucatu	Quarto de milha	NI	1	ND	ND	ND
	Botucatu	Mestiço	NI	2	ND	ND	ND
Total				56	60	8	8

[†] = indica o número de mortes nos grupos com e sem diarreia.

n = número de animais

ND = não detectado

NI = não informado

Tabela 24. Número de potros com (6) e sem (2) diarreia que vieram a óbito e os respectivos enteropatógenos isolados, em diferentes propriedades do interior do Estado de São Paulo (2011 – 2012).

	Agentes Isolados	Idade (dias)	Haras
Potros com diarreia	• <i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i> Toxina A + <i>Salmonella</i> Panama + Strongyloides + Estrongilídeos	9	5
	• <i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli papC</i> + <i>Salmonella</i> . Infantis + Strongyloides	90	8
	• <i>Salmonella</i> Typhimurium + Strongyloides	90	9
	• <i>Salmonella</i> enterica subsp enterica + Strongyloides + Estrongilídeos	40	10
	• <i>Salmonella</i> ser. Muechen + Strongyloides	90	10
	• ND	1	14
Potros sem diarreia	• <i>E. coli</i> + <i>Salmonella</i> Infantis	60	9
	• <i>E. coli fimH</i> + <i>E. coli ag43</i> + <i>Salmonella</i> Newport + Strongyloides	90	10

ND = não detectado

6. Discussão

Estudos sobre os agentes etiológicos envolvidos na síndrome diarreia, bem como as principais alterações clínicas dos potros acometidos tem sido o foco de inúmeros pesquisadores, visando minimizar o custo com tratamentos inadequados e subdesenvolvimento destes animais, além deste conhecimento facilitar a adoção de medidas preventivas. No Brasil, esta pesquisa apresenta como peculiaridade a abordagem de potros até o terceiro mês de vida, investigando os principais agentes etiológicos de origem bacteriana, viral e parasitária envolvidos na diarreia. Em contraste, estudos anteriores tinham como objetivo determinar a prevalência de um único agente etiológico, restritos a relatos de casos ou surtos ocorridos em regiões restritas ou em um criatório (VARGAS & RIGOLON, 1998; MELO et al., 2007; GOMES et al., 2008; MEIRELES et al., 2008; GUIMARÃES-LADEIRA et al., 2009; TOSCAN et al., 2010). Em outros países, estudos retrospectivos e pesquisas para determinar coinfeções entéricas em potros com diarreia já haviam sido realizados. No entanto, estes estudos não apresentavam a variedade de espécies de enteropatógenos investigados no presente trabalho (FREDERICK ET AL., 2009; SLOVIS et al., 2010; HARRIS et al., 2012).

Durante a realização dos exames físicos dos potros nos grupos com e sem diarreia, não foi observado halo endotoxêmico, tampouco alterações na coloração das mucosas e postura. Assim, todos os animais apresentavam coloração de mucosas (oculopalpebrais e bucal) róseas e estavam em posição quadrupedal (FEITOSA, 2004). A auscultação do sistema digestório nos animais amostrados permitiu identificar o aumento da motilidade intestinal no grupo dos potros com diarreia, somado ao aumento da frequência de defecação em 94,6% (53/56), consideradas anormalidades que caracterizam o quadro de diarreia (RADOSTITS et al., 2002).

Ao avaliar a desidratação nos dois grupos estudados, constatou-se que estes sinais foram observados somente no grupo dos animais com diarreia, dos quais 48,2% (27/56) apresentaram grau leve, 16% (9/56) moderado e 3,6% (2/56) grave, confirmando que a desidratação é um dos principais sinais clínicos observados em potros com diarreia (FEITOSA, 2004). Em contraste, dentre os animais desidratados, o TPC estava alterado em apenas 5,3% (2/38)

dos animais, mostrando não ser um parâmetro passível de ser utilizado exclusivamente para avaliar a presença ou não da desidratação (FEITOSA, 2004). Durante avaliação física dos potros com diarreia, não foram observadas alterações nas médias da frequência cardíaca ($84,6\text{bpm} \pm 24,1$), frequência respiratória ($36\text{mpm} \pm 20,3$) e temperatura ($38,7^{\circ}\text{C} \pm 1,5$), de maneira similar, Frederick et al. (2009), também não identificou alterações significativas nestes parâmetros em potros com diarreia.

As alterações macroscópicas das fezes de potros com diarreia encontradas no presente estudo, coincidem com os achados de Oliveira Filho et al. (2007) no Brasil, que avaliaram estas mesmas características em bezerros nelores com diarreia e concluíram que as alterações do aspecto das fezes são multifatoriais, decorrentes do manejo alimentar e da patogenicidade dos enteropatógenos.

Os valores médios obtidos durante avaliação hematológica dos potros com diarreia foram, hematócrito ($35,2\% \pm 5,9$), VCM ($37,5\text{fL} \pm 4,8$), CHCM ($34,3\% \pm 2,1$), eosinófilos ($87,5/\mu\text{L} \pm 77,8$) e monócitos ($0,5 \times 10^3 \pm 633,4$) foram observados dentro da normalidade para a espécie e idade dos animais estudados. Em contraste, o valor médio das hemácias ($9,3 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 1,6 \times 10^3$) estava diminuído, com 5,4% (3/56) dos potros com valor médio de $6,4 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 1,3 \times 10^6$). O valor médio do número de plaquetas ($58,6 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 0,1 \times 10^3$) também estava diminuído, com 5,4% (3/56) dos animais com trombocitopenia ($1,6 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 1,2 \times 10^6$). O valor médio do fibrinogênio estava normal ($492,1 \pm 237,5$), com 26,8% (15/56) dos potros com valores acima da referência ($600\text{mg/dL} \pm 0,97$). O valor médio de leucócitos estava dentro da normalidade ($10,1 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 4973$), embora, 12,5% (7/56) dos animais apresentavam leucocitose ($16,5 \times 10^3/\mu\text{L}$). De maneira similar aos leucócitos totais, o valor médio de neutrófilos encontrava-se dentro da normalidade ($4,3 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 4987,6$), com 17,8% (10/56) dos animais com neutrofilia ($9,3 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 4,4 \times 10^3$). Igualmente, o valor médio dos linfócitos estava dentro da normalidade ($1,8 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 1,7 \times 10^3$), apesar de que 37,5% (21/56) dos potros acusavam linfocitose ($3,1 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 1,5 \times 10^3$) [KOTERBA & DRUMOND, 1990; ORSINI & DIVERS, 2008; AOKI & ISHII, 2012]. Os valores hematológicos encontrados nos potros amostrados são equivalentes aos obtidos por Frederick et al. (2009),

que ao investigarem o número de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, proteína total e fibrinogênio de 192 potros com diarreia, que sobreviveram as infecções e 31 potros mortos com diarreia, não observaram diferença significativa nos valores hematológicos entre os grupos.

Durante exame hemogasométrico dos 56 potros com diarreia, foi possível verificar que, apesar da média do pH sanguíneo ($7,3 \pm 1$) apresentar-se de acordo com os valores de referência para a espécie e idade dos potros estudados, 16% (9/56) apresentaram acidose ($7,25 \pm 0,1$) [KOTERBA & DRUMOND, 1990; BROMMER et al., 2001]. O valor médio do bicarbonato ($22,8\text{mmol/L} \pm 5,4$) dos potros encontrava-se normal, embora 16% (9/56) dos animais apresentavam diminuição do bicarbonato ($15,1\text{mmol/L} \pm 3,4$). O valor médio de sódio foi abaixo dos níveis normais ($133,4\text{mmol/L} \pm 7,3$), com 66% (37/56) dos animais com hiponatremia ($131\text{mmol/L} \pm 3,3$). A diminuição do sódio nos potros pode ser justificada pela perda provocada pela diarreia, podendo levar a quadros neurológicos, com alteração do estado mental, fraqueza, letargia e hipotensão e taquicardia (AYUS et al., 1982; SCHAER, 1999). O valor médio de potássio no sangue ($3,1\text{mmol/L} \pm 0,7$) foi abaixo dos níveis normais, com 39,3% (22/56) dos potros com hipocalcemia ($2,55\text{mmol/L} \pm 0,3$). Este achado também pode ser justificado pelo excesso de perda ou má absorção provocada pela diarreia, causando fraqueza, redução da motilidade e deficiência na função respiratória (BORER & CORLEY, 2006). O valor médio de cálcio apresentado encontrava-se dentro da normalidade ($1,3\text{ mmol/L} \pm 0,3$), com apenas 5,3% (3/56) dos animais com hipocalcemia. Segundo Gasthuys et al. (1991) e Grubb et al. (1996) a hipocalcemia é justificada pela perda de cálcio em animais com diarreia, endotoxemia e septicemia, levando a fraqueza, fasciculações e tetania. Os valores hemogasométricos encontrados corroboram com os resultados obtidos por Frederick et al. (2009), que também observaram que os valores do pH, excesso de base, bicarbonato e os íons sódio e potássio não diferiram entre grupos de potros com diarreia que vieram a óbito ou sobreviveram.

No presente trabalho, foi possível a identificação de ao menos um dos enteropatógenos estudados em 80% (48/60) das amostras de fezes dos potros sem sinais entéricos e 89,3% (50/56) das amostras dos animais do grupo com

diarreia. Esta frequência da detecção dos enteropatógenos nos dois grupos difere da identificada por Frederick et al. (2009), que observou somente 55% (122/223) de enteropatógenos em potros com diarreia. em estudo similar Slovis et al. (2010), detectaram 48% de enteropatógenos no grupo sem diarreia e 71% nos potros com diarreia. A maior frequência de enteropatógenos detectados no presente estudo pode ser justificado pelo maior número de micro-organismos investigados, particularmente, *E. coli*, *Giardia* sp., Estrongilídeos e Strongyloides, os quais com exceção da *Giardia* sp., foram detectados com frequência nos isolados dos animais com e sem diarreia.

A alta frequência no isolamento de micro-organismos nos grupos estudados ocorreu principalmente pela alta taxa de detecção da *E. coli* e certos fatores de virulência, correspondendo a 62,5% de isolados dos 56 potros com diarreia e 61,66% dos 60 potros sem diarreia. A alta ocorrência de, *E. coli* era prevista devido ao fato desta bactéria pertencer a microbiota intestinal de potros (HOLLAND et al., 1989; HOLLAND et al., 1996; VAN DUIJKEREN et al., 2000).

De maneira igual, a detecção de enteropatógenos nos potros com diarreia foi mais elevada se comparada aos animais sem sinais entéricos, em relação ao número de isolados por faixa etária. Neste contexto *E. coli* foi isolada com maior frequência nas duas primeiras faixas etárias do grupo com diarreia (73,3% dos potros de 0 a 30 dias e 70,59% entre 31 a 60 dias) quando comparada ao grupo controle (50% entre 0 a 30 dias e 61,5% dos animais com 31 a 60 dias). De maneira similar, Holland et al. (1989) observou 61,6% estirpes de *E. coli* foram detectadas de 61 potros com diarreia e 38,4% de 38 potros sem diarreia. Harris et al. (2012) relataram o isolamento de 100% (9/9) de *E. coli* de amostras de fezes de potros com diarreia e 84,1% (127/151) em amostras de animais sem sinais entéricos, reforçando a alta frequência do patógeno em potros com e sem diarreia, visto que a bactéria é integrante da microbiota normal de diversas espécies, incluindo equinos (QUINN et al., 1994; HOLLAND et al., 1996).

Apesar da diversidade de fatores de virulência investigados nas linhagens de *E. coli*, a identificação de isolados potencialmente patogênicos ocorreu tanto em potros normais quanto em potros diarreicos (HOLLAND et al.,

1996; Van DUIJKEREN et al., 2000). Entretanto, a detecção dos genes *fimH* e *ag43* de *E. coli* foi identificada com maior frequência nos potros com diarreia quando comparados ao grupo controle. Curiosamente, não foram encontrados na literatura consultada estudos que relacionem estes genes diretamente na diarreia em potros, visto que, comumente estão associados às infecções urinárias em humanos e animais (GYLES, 1992; LÜTHJE & BRAUNER, 2010). O gene *papC* de *E. coli* foi detectado em seis isolados de *E. coli* (quatro no grupo com diarreia e um sem sinais entéricos). Apesar da baixa frequência nos isolados, este gene está relacionado diretamente a infecções do sistema urinário em humanos e animais, podendo estar relacionado a causa da diarreia (NORGREN et al., 1984).

Neste estudo, avaliando-se os isolados de *E. coli*, não houve a detecção das fímbrias F4 (K88) e F41, já isoladas anteriormente em potros com diarreia, relatados por Ward et al. (1986).

Salmonella spp. foi detectada em 25% (14/56) dos dos potros amostrados com diarreia e 4% no grupo sem diarreia. A alta detecção do gênero *Salmonella* spp. nos potros com diarreia corroboram com os achados de East et al. (1998) que obtiveram 22% (12/54) de isolamento de *Salmonella* sp., enquanto Van Duijkeren et al. (1994) isolaram 18% (69/380) de *Salmonella* spp. das fezes diarreicas de equinos de diferentes idades. Neste último estudo foram identificados *S. Typhimurium* (62,31% - 43/69), *S. Hadar* (4,35% - 3/69), *S. Arizona* (2,90% - 2/69), *S. enteritidis* (2,90% - 2/69), *S. virchow* (1,45% - 1/69), *S. blockey* (1,45% - 1/69) e *S. bareilly* (1,45% - 1/69). No presente estudo, foi possível identificar, *S. Saintpaul* (3,57% - 2/56), *S. Panama* (3,57% - 2/56), *S. Infantis* (8,92% - 5/56), *S. Typhimurium* (5,36% - 3/56), *S. entérica* subsp *enterica* (1,78% - 1/56) e *S. Muechen* (1,78% - 1/56) no grupo dos potros com diarreia. A maior frequência dos isolados de *Salmonella* spp. no grupo com diarreia e também em todos os potros que vieram a óbito dentre os animais amostrados reforça a importância deste enteropatógeno como agente causal de doença em potros até três meses de vida.

Estudos realizados por McDonough et al. (1999) mostram que a *S. enterica* Typhimurium é o sorotipo mais comumente encontrado em bezerros de 2 a 8 semanas de vida. Em humanos Beltran et al. (1988) mostram que *S.*

Infantis e *S. Typhimurium* apresentam-se com uma maior frequência de isolados em casos de diarreia, semelhantemente aos resultados encontrados nos potros estudados, indicando os reflexos em saúde pública de isolamento destes sorotipos, devido ao fato do contato de humanos com potros e seu ambiente nos criatórios.

No presente estudo, foi identificado 2,6% (3/116) de *S. Saintpaul*. Relatos de Hird et al. (1984), descrevem as infecções por *S. Saintpaul* em 20% (33/165) dos equinos hospitalizados. Destes a grande maioria foram animais intubados com sonda nasogástrica e/ou submetidos a antibioticoterapia, mostrando a patogenicidade deste sorotipo na espécie equina.

O sorotipo Newport não foi identificado nos animais com diarreia. No entanto, foi isolado em um potro sem sinais entéricos, o qual veio a óbito no período de ocorrência do surto no haras. Relatos de surtos por *Salmonella* Newport, descritos por Schaer et al. (2010), mostraram que além de patogenicidade e capacidade de infecção, apresenta taxa de letalidade de 36,1%, em um estudo realizado com diversas espécies de animais, onde a maioria (n=54) eram equinos.

O sorotipo Muechen foi detectado apenas no grupo de animais com diarreia representando 1,78% (1/56) dos isolados, corroborando com os resultados obtidos por Piddock et al. (1998), que identificou *S. Muechen* somente em 1,88% (2/108) dos isolados onde foram avaliados algumas espécies de animais de produção, selvagens e de companhia, mostrando a baixa frequência deste sorotipo nas infecções em animais.

A detecção *C. perfringens* apresentou maior frequência no grupo com diarreia (10/56) comparado ao grupo sem sinais entéricos (6/60), ambos enterotoxigênicos. Estudo prospectivo realizado por Weese et al. (2001), identificou de forma similar 28,6% (8/28) de *C. perfringens* enterotoxigênico em potros diarreicos.

Foram isoladas 19 linhagens de *C. perfringens* nos animais amostrados, das quais, duas produtoras da toxina beta-2 e 16 linhagens com presença da toxina A, representando 17,86% (10/56) dos isolamentos em animais com diarreia. Estes resultados assemelham-se encontrados por Netherwood et al. (1998), os quais obtiveram 34,8% (184/529) de *C. perfringes* isolados de potros

com diarreia, dos quais 90% eram *C. perfringens* produtores da toxina Tipo A, reforçando a alta frequência deste patógeno, particularmente nos isolados produtores de toxina A, na gênese da casuística de diarreia em potros.

C. difficile foi detectado em igual proporção nos potros com e sem diarreia, totalizando 1,7% (2/116) dos isolados. Apesar do número de isolamentos serem proporcionalmente menores do que os encontrados por Baverud et al. (2003), que em 777 cavalos (277 potros), identificaram 9% (2/22) dos isolados como *C. difficile* em potros com diarreia (5 dias a 7 meses) e 8% (17/226), não tratados previamente com antimicrobianos); o baixo número de isolamentos de *C. difficile* em potros mostra que, a frequência dos isolamentos desta bactéria não difere entre os animais do grupo com e sem diarreia e provavelmente exerça menor influência como patógeno das infecções entéricas.

A frequência de *R. equi* nos isolamentos do grupo com diarreia foi de 7,14% (4/56) e do grupo sem diarreia de 10% (6/60). No grupo com diarreia foram observados 4 linhagens de *R. equi* vapA 85k ou 87kb tipo I, enquanto que nos potros sem sinais entéricos foi detectado apenas 1 isolado 85 ou 87kb tipo I. Apesar da distribuição semelhante entre o grupo com diarreia e o grupo controle, Takai et al. (1996) mostram grande número de isolamentos (até 40,9%) de *R. equi* avirulento nas amostras de fezes de potros sadios. No presente trabalho, pôde ser observado que, dos animais com diarreia, a faixas etárias acometidas com isolamento de linhagens virulentas (vap A 85 e 87kb tipo I), foram entre 0 a 30 (10,53%, 2/19) e 31 a 60 (11,76%, 2/17) dias de vida, que coincide com a faixa etária com maior ocorrência de potros doentes (COHEN et al., 2008).

Não foi possível detectar a bactéria *Lawsonia intracellularis*, nos animais amostrados. Slovis et al. (2010) da mesma forma não detectaram o micro-organismo nas fezes de potros. Tal resultado pode ser creditado a idade dos animais, visto que a detecção desta bactéria em potros, geralmente ocorre em animais acima dos seis meses de vida, coincidindo com o período de desmame (PUSTERLA & GEBHART, 2009).

Coronavírus foi detectado em 5,26% dos animais entre 0 e 30 dias de vida e em 2,7% dos animais entre 61 e 90 dias (sem diarreia), corroborando

com o estudo de prevalência realizado por Harris et al. (2012), que identificaram o vírus em 3% (2/41) dos animais do grupo sem diarreia. No Brasil, a diarreia por coronavírus foi relatada em um surto no Rio Grande do Sul. Foi possível identificar o vírus por microscopia eletrônica, com uma maior frequência de 58,5% (69/118) dos potros com diarreia (MEIRELLES et al., 2008). Este resultado indica que o coronavírus provavelmente necessita de condições predisponentes específicas para acometer os potros, gerando situações pontuais de casos ou surtos.

A ausência de rotavírus nos animais amostrados contrapõem os estudos realizados por Slovis et al. (2010), que obteve prevalência de 35% nos animais com diarreia e 3% no grupo controle. Hardy et al. (1991), identificaram rotavírus em 37,21% (32/86) dos potros com diarreia, utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). No Brasil há apenas dois casos de diarreia em potros por rotavírus relatados por Racz et al. (1993), onde detectaram o vírus utilizando ensaio imunoenzimático e PAGE. De maneira similar ao coronavírus, a ausência de detecção de rotavírus nos potros estudados sinaliza a menor participação deste enteropatógeno na gênese da diarreia na região estudada.

A detecção de *Giardia* sp. foi de 1,78% (1/56) no grupo dos potros com diarreia. No Brasil, Vargas & Rigolon (1998) relataram a ocorrência deste protozoário em equinos utilizando a técnica de centrifugação-flutuação de Faust com sulfato de zinco, detectando 21,1% (26/123) como positivos. Destes, 18,2% (8/44) dos animais apresentavam idade inferior a um ano. O baixo número de animais parasitados no presente estudo pode ser explicado pela liberação intermitente dos cistos junto às fezes em até 40% dos animais (XIAO & HERD, 1994) e pela maior frequência dos casos em animais imunossuprimidos (WEESE, 2009).

A presença de *Cryptosporidium* spp. no grupo com diarreia correspondeu a 5,4% (3/56) dos animais distribuídos igualmente nas três faixas etárias, fato que difere sem sinais entéricos, onde 1,67% (1/60) das amostras foram positivas. Destas, 10% dos potros estavam entre 0 e 30 dias de vida, período considerado de maior ocorrência do enteropatógeno (XIAO & HERD, 1994). Grimberg et al. (2009), identificaram por microscopia eletrônica 18% (12/67) de *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes de potros com diarreia,

enquanto Harris et al. (2012), detectaram este protozoário principalmente em animais sem sinais entéricos (67%, 92/137), quando comparado ao grupo dos animais com diarreia (25% , 2/8).

A pesquisa de helmintos no presente estudo teve como principais parasitas os Estrongilídeos (grandes e pequenos estrongilídeos) e Strongyloides (*Strongyloides westeri*), foi observado que em 25% (14/56) dos animais apreswentaram *S. westeri* no grupo dos potros com diarreia, não diferindo sem sinais entéricos com 25% (15/60) parasitados. De maneira similar Harris et al. (2012), detectaram 35,7% (30/84) dos potros com diarreia e 36,7% (29/79) dos potro sem diarreia, infectados pelo parasita, não havendo diferença significativa entre os grupos com e sem diarreia. Ao contrário, Netherwood et al. (1996) no Canadá e Lyons & Tolliver (2004) nos EUA relataram menor infestação de *S. westeri*, com frequência de respectivamente 1,4% (5/365) e 1,5% (11/733) de potros com diarreia.

Os Estrongilídeos foram detectados em 10,7% (6/56) dos animais amostrados com diarreia, não diferindo sem sinais entéricos om 10,67% (10/60), já Lyons & Tolliver (2004) obtiveram maior número de animais identificados, identificando 27,6% (202/733) de potros parasitados. Não foi possível a classificação entre grandes e pequenos estrôngilos devido ao fato de que a diferenciação entre *S. vulgaris* e Cyatostomíneos é fidedigna somente se realizada a cultura larvar para identificação de L3 (UMUR & AÇICI, 2009; TAYLOR et al., 2010).

A ocorrência da monoinfecção em 32% das amostras diarreicas positivas para enteropatógenos neste estudo é equivalente aos resultados obtidos por Slovis et al. (2010) que observou a participação de um único enteropatógeno em 29% das amostras fecais dos potros com diarreia. Giguère e Sanchez (2009) identificaram maior frequência de monoinfecções, em 78% (95/122) dos potros acometidos por diarreia. No entanto, o simples isolamento de ao menos um agente etiológico não permite necessariamente prova de este ser o causador da doença, visto que para muitos enteropatógenos há a necessidade de determinar os fatores de virulência, particularmente os de origem bacteriana. Adicionalmente, frequentemente estes patógenos entéricos

promovem infecções combinadas, potencializando os efeitos entéricos nos animais infectados.

A ocorrência da coinfeção em 68% das amostras positivas para enteropatógenos neste estudo coincide com os resultados descritos por Slovis et al. (2010), que observaram alta ocorrência de associações entre patógenos nas amostras de fezes diarreicas. Giguère e Sanchez (2009) também identificaram coinfeções, em 22% (25/122) dos isolamentos de enteropatógenos (2 ou mais enteropatógenos) em potros até dez meses de vida. O conjunto destes resultados reafirma a complexidade etiológica na casuística da diarreia em potros, a ocorrência frequente de coinfeções entre os patógenos entéricos e a necessidade de investigar os principais patógenos e fatores de virulência de origem bacteriana, viral e parasitária para firmar o diagnóstico da diarreia em potros.

Outras espécies de bactéria como *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter agglomerans*, *Providência rettigeri*, *Citrobacter* sp., foram isolados de animais com diarreia que não tiveram a detecção de qualquer enteropatógeno. Os animais sem sinais entéricos apresentaram isolamento de *Serratia rubidaea*, *Edwardsiella agglomerans*, *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter* spp. e *Hafnia alvei*. A baixa frequência de isolamentos destas bactérias indica a baixa influência destes micro-organismos na gênese da diarreia em potros.

A mortalidade de 10,7% (6/56) dos potros amostrados com diarreia e 3,3% (2/60) do grupo sem diarreia coincidem com o isolamento de *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens* indicando a alta severidade e letalidade em potros infectados por estes micro-organismos como descrito por Netherwood et al. (1996). Este resultado reforça a necessidade do diagnóstico precoce e tratamento emergencial de potros infectados por estes enteropatógenos, visando aumentar as taxas de sobrevivência ou cura dos animais.

7. CONCLUSÕES

Frente os resultados apresentados, pode-se concluir que o exame físico nos potros com diarreia foi de suma importância na identificação da desidratação em 67,8% dos animais, independente do agente etiológico diagnosticado.

Embora não haja relação entre o hemograma e o agente etiológico detectado, as presenças de hiperfibrinogenemia, leucocitose, neutrofilia e linfocitose, mostraram ser uma importante ferramenta na identificação dos animais gravemente acometidos.

A hemogasometria identificou potros com acidose metabólica, hiponatremia e hipocalcemia, confirmando que este exame fornece ao Médico Veterinário subsídios para a correta correção ácido-básica e hidroeletrólítica nos potros com diarreia.

A alta ocorrência de coinfeções (68%) observadas entre agentes bacterianos, virais e parasitários confirmam a complexidade etiológica na casuística da diarreia em potros.

O isolamento de linhagens de *E. coli* nos potros com diarreia (fímbrias *H* e *ag43*), indica a possibilidade que estes fatores de virulência possam estar relacionados com a patogenicidade deste micro-organismo.

O isolamento de *Salmonella* spp. nos animais com e sem diarreia, e o predomínio deste micro-organismo nos potros que vieram a óbito reforça a necessidade de medidas de controle, bem como o diagnóstico e tratamento precoce da salmonelose em potros.

Observando a distribuição dos isolados de *Clostridium perfringens*, passa a ser notória a importância deste agente nas três faixas etárias estudadas.

O isolamento de *Clostridium difficile* em um potro de um dia de vida, enfatiza os cuidados que devem ser estabelecidos para o controle e tratamento de potros neonatos.

O isolamento de linhagens de *R. equi* 85kb tipo I e 87kb tipo I em potros diarreicos de mesmo perfil plasmidial encontrado em lavados traqueais de

pulmão de potros no Brasil confirma estes tipos de plasmídeos como os mais virulentos para potros;

Giardia sp. esteve presente em apenas 1,78% dos potros com diarreia, não mostrando ter grande relevância nos quadros de diarreia em potros na região estudada.

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp., detectado em 5,36% dos animais com diarreia, indica a baixa influência deste enteropatógeno na região estudada.

Estrongylídeos e Strongyloides foram detectados independentemente da ocorrência de diarreia, sendo os potros entre 61 e 90 dias de vida mais acometidos, o que reintera a importância da desverminação nos animais desta faixa etária.

As causas dos óbitos ocorridos em potros com e sem diarreia, ressalta a importância na identificação dos sorotipos de *Salmonella* spp., bem como a pesquisa das toxinas de *Clostridium perfringens*.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. L.; MARIN, J. B.; GOMES, R. O.; JARDIM FILHO, J. O. Frequência de tratamento antiparasitário e falta de eficácia em helmintos de equinos PSC no Jockey Club de Santa Maria, RS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, supl.1, p.274, 2004.
- ANDREWS, W. H.; JUNE, G. A.; SHERROD, P. S.; HAMMACK, T. S.; AMAGUANA, R. M. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. Gaithersburg: AOAC International, 1998. p.5001-5020.
- AOKI, T.; ISHII, M. Hematologic al and biochemical profiles in peripartum mares and neonatal foals (heavy draft horse). *Journal of Equine Veterinary Science*, v.32, p.170-176, 2012.
- ARGUEDAS, M. G. Coronavirus infections. In: *Equine Infectious Diseases*. 1ed. SAUNDERS: Sellon & Long. p.18-32, 2007.
- AYUS, J. C.; OLIVERO, J. J.; FROMMER, J. P. Rapid correction of severe hiponatremia with intravenous hypertonic saline solution. *Am. J. Med.* v.72, p.43-48, 1982.
- BÅVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A.; ASPÁN, A.; GUNNARSSON, A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. v.35, n.5, p.465-471, 2003.
- BELTRAN, P.; MUSSER, J. M.; HELMUTH, R.; FARMER, J. J.; FRRICHS, W. M.; WACHSMUTH, I. K.; FERRIS, K.; McWHORTER, A. C.; WELLS, J. G.; CRAVIOTO, A.; SELANDER, R. K. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.85, 1988.
- BIHR, T. P. Protein-losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weanling foal. *Can. Vet. J.* v.44, p.65–66, 2003.

BIRNBOIM, T.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, v.7, 1513-1523, 1979.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; RODRÍGUEZ, E.; ABALIA, I.; ALONSO, M. P.; BLANCO, J. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. *Journal of Microbiological Methods*. v.31, p.37–43, 1997.

BLOEM, A. Verificação da produção de anticorpos específicos em éguas prenhes, vacinadas contra *Rhodococcus equi*, e avaliação da transferência passiva destes anticorpos para os potros. 55p. 2006. Tese (Mestrado) – FMVZ-UNESP, Botucatu.

BORRIELO, S.P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J. Antim. Chem.*, v.41, p.13-19, 1998.

BOWMAN, D. D. Georgis – Parasitologia veterinária. ed.9. Saunders-Elsevier., p.432, 2010.

BRANDÃO, P. E., GREGORI, F., VILLAREAL, L. Y. B., ROSALES, C. A. R., SOARES, R.M., JEREZ, J. A. A nested polymerase chain reaction test for bovine coronavirus diagnosis based on the RNA-dependent RNA-polymerase gene. *Virus Review and Research*, v.10, p.45-49, 2005.

BREES, D. J.; SONDHOF, A. H.; KLUGE, J. P. et al. *Lawsonia intracellularis*-like organism infection in a miniature foal. *J. Am. Med. Assoc.* v.215, p.511-515, 1999.

BRETT, M. M.; RODHOUSE, J. C.; DONOVAN, T. J. Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea. *J. Clin. Pathol.*, p. 609-611, 1992.

BREWER BD, KOTERBA AM. Development of a scoring system for the early diagnosis of equine neonatal sepsis. *Equine Vet J.*, v.20, n.1, p.18–22, 1988.

BROMMER, H.; SLOET Van OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; KESSELS, B. Haematology: haematological and blood biochemical characteristics of Dutch warmblood foals managed under three different rearing conditions from birth to 5 months of age. *Vet Quart*, v.23, p.92-95, 2001.

BROUSSARD, J. D. Optimal fecal assessment. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v.18, n.4, p.218-230, 2003.

BUESCHEL, D.; WALKER, R.; WOODS, L.; KOKAI-KUN, J.; MCCLANE, B.; SONGER, G. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A necrotic enteritis in a foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.213, n.9, p.1305-1311, 1998.

CARTER, G. R.; PAYNE, P. A.; DAVIS, E. A concise guide to the microbial and parasitic diseases of horses. International Veterinary Information Service, Ithaca, NY. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em 30 nov. 2007.

COHEN, N. D. Epidemiology and prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Proceedings of the 10 international congress of world equine veterinary association*, 2008-Moscow, Russia. Disponível em: www.ivis.org . Acesso em: 3 jul. 2009.

COHEN, N.D.; HOROWITZ, M. L.; TAKAI, S.; BECU, T.; CHAFFIN, M. K.; MAGDESIAN, K. G.; CHU, K. K.; MARTENS, R. J. Evidence that foals with *Rhodococcus equi* pneumonia become infected early in life. *Proceedings of the annual convention of the AAEP*, 2001. Disponível em: www.ivis.org . Acesso em: 3 jul. 2009.

COLE, D. J.; Detection of *Cryptosporidium parvum* using the kinyoun acid-fast stain. *Proceedings of the annual convention of the AAEP*, v.43, p.409-410, 1997.

CORLEY, K. T. T.; FURR, M. O. Evaluation of ascore designed to predict sepsis in foals. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. v.13, n.3, p.149-155, 2003.

DAVIS, E.; RUSH, B. R.; COX, J.; DEBEY, B. KAPIL, S. Neonatal enterocolitis associated with coronavirus infection in a foal: a case report. *J. Vet. Diag. Invest.*, p.153-156, 2000.

DELMÈE, M. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *Clin Microbiol Infec.*, v.7, n.8, p.411-416, 2001.

DUHAMEL, G. E.; WHEELDON, E. B. Intestinal adenomatosis in a foal. *Vet. Pathol.* v.19, p.447-449, 1982.

DWYER, R. M. Control and prevention of foal diarrhea outbreaks. *In: Proceedings of the annual convention of the AAEP*, 2001. Disponível em: www.ivis.org . Acesso em: 3 jul. 2009.

Van DUIJKEREN, E.; SLOET van OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; HOUWERS, D. J.; van LEEUWEN, W. J.; KALSBECK, H. C. Equine salmonellosis in a Dutch veterinary teaching hospital. *Vet. Rec.*, v.135, p.248-250, 1994.

EAST, L. M.; SAVAGE, C. J.; TRAUB-DARGATZ, J. L.; DICKINSON, C. E.; ELLIS, R. P. Enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* infection in neonatal foals: 54 cases (1988-1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.212, n.11, p.1751-1756, 1998.

FEDORKO, D. P.; WILLIAMS, E. C. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and Lproline-aminopeptidase (PRO Discs) in terapid identification of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Mivrobiol.* v.35, n.5, p.1258-1259, 1997.

FEITOSA, F. L. F. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. 1ed. São Paulo: Roca, 2004. 807p.

FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: UFSM, p.888, 2007.

FORTES, E. Parasitologia veterinária. 3ed. Ícone Editora, 4ed., p.604 ,2004.

FORTIER, G.; PRONOST, L. A.; GIGUERE, C.; ZIENTARA, S. Current trends in equine infectious diseases diagnosis. *In: 9º International Congress World Equine Veterinary association*, 2006, Morocco. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em: 3 jul. 2009.

FRANK, N.; FISHMAN C. E.; GEBHART C. J.; LEVY, M. La wsonia intracellularisweanling foalproliferative enteropathy in a weanling foal. *Equine vet. J.* v.30, p.549-552, 1998.

FREDERICK, J.; GIGUÈRE, S.; SANCHEZ, L. C. Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003-2008). *J. Vet. Med.*, v.23, 1254-1260, 2009.

FURR, M. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and antimicrobial therapy. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.2, n.1, p.3-8, 2003.

GASTHUYS, F.; DE MOOR, A.; PARMENTIER, D. Cardiovascular effects of low dose calcium chloride infusions during halothane anaesthesia in dorsally recumbent ventilated ponies. *J. Vet. Med. Ass.* v.38, p.728-736, 1991.

GOMES, A. D.; BARRETA, C.; ZIEGLER, D. P.; SAUSEN, L.; STOEVEER, N.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G.; ZANELLA, A. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* sp em equinos estabulados no jockey club de Santa Maria-RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.9, p. 2662-2665, 2008.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific Industrial Research*, v. 12, n. 1, p.50-52, 1939.

GRUBB, T. L.; FOREMAN, J. H.; BENSON, G. J.; THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; CONSTABLE, P. D.; OLSON, W. O.; DAVIS, L. E. Hemodynamic effects of calcium gluconate administered to conscious horses. *J. vet. int. Med.* v.10, p.401-404, 1996.

GRIMBERG, A.; POMROY, W. E.; CARSLAK, H. B.; SHI, Y.; GIBSON, I. R.; DRAYTON, B. M. A study of neonatal cryptosporidiosis of foals in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v.57, n.5, p.284-289, 2009.

GUERRANT, R. L.; STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; BOBAK, D. A. How intestinal bacteria cause disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v.179, 331-337, 1999.

GUIMARÃES-LADEIRA, C. V.; PALHARES, M. S.; OLIVEIRA, J. S. V.; RAMIREZ, M. A.; GUEDES, R. M. C. Faecal shedding and serological cross-sectional study of *Lawsonia intracellularis* in horses in the state of Minas Gerais, Brazil. *Equine veterinary Journal*, v.41, p. 593-596, 2009.

GUY, J. S.; BRESLIN, J. J.; BREUHAUS, B.; VIVRETTE, S.; SMITH, L. G. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. *Journal of Clinical Microbiology*, p.4523-4526, 2000.

GYLES, C. L. Esherichia coli cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.*, v.38, p.734-746, 1992.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficilis. *Am. J. Dis. Child.* v.49, n.2, p. 390-402, 1935.

HARDY, M. E.; WOODE, G. N.; XU, Z. C.; WILLIAMS, J. D.; CONNER, M. E.; DWYER, R. M.; POWELL, D. G. *J. Clin. Microbiol.* v.29, n.5, p.889-893, 1991.

HARRIS, R.; SANKAR, K.; SMALL, J. A.; SUEPAUL, R.; JOHNSON, A. S.; ADESIYUN, A. Prevalence and characteristics of enteric pathogens detected in diarrhoeic and non-diarrhoeic foals in Trinidad. *Veterinary Medicine International*, v.2012, p.1-9, 2012.

HEIDMANN, P.; MADIGAN, J. E.; WATSON, J. L. *Rhodococcus equi* pneumonia: clinical findings, diagnosis, treatment and prevention. *Clin. Tech. Equine Pract.*, v.5, p.203-210, 2006.

HEPBURN, R. Management of diarrhoeae in foals up to weaning. *In Practice.*, v.29, p.334-341, 2007.

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

HIRD, D. W.; PAPPASIOANOU, M.; SMITH, B. P. Case-control study of risk factors associated with isolation of *Salmonella saintpaul* in hospitalized horses. *Am. J. Epidemiol.* v.120, n.6, p.852-864, 1984.

HOLLAND, R. E.; SCHMIDT, A.; SRIRANGANATHAN, N.; GRIMES, D. S.; WILSON, R. A.; BROWN, C. M.; WALKER, R. D. Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals. *Veterinary Microbiology*, v.48, p.243-255, 1996.

HOLLAND, R. E.; SRIRANGANATHAN, N.; DUPONT, L. Isolation of enterotoxigenic *Escherichia coli* from a foal with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.194, n.3, p.389-391, 1989.

HOPKINS, R. M.; MELONI, B. P.; GROTH, D. M.; WETHERALL, J. D.; REINOLDSON, J. A.; THOMPSON, R.C.A. Ribosomal rna sequencing reveals differences between the genotypes of giardia isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol*, v.83, n.1, p.44-51, 1997.

HOWARD-MARTIN, M. *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia in a newborn foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.189, n.5, p.564-565, 1986.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de la Pecuaria Municipal 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/> Acesso em: 27 jul. 2010.

JOHNSON, D. W.; PIENIAZEK, N. J.; GRIFFIN, D. W.; MISENER, L.; ROSE, J. B. Development of a pcr protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium Oocysts* in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* v.61, p.3849-3855, 1995.

JONES, G. F.; WARD, G.E; MURTAUGH, M. P.; LIN, G.; GEBHART, C. J. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.10, p.2611-2615, 1993.

KATO, N.; OU, C. Y. ; KATO, H.; BARTLEY, S. L.; BROWN V. K.; DOWELL Jr, V. R.; UENO, K. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* v.29, p.33-37, 1991.

KOTERBA, A. M.; DRUMMOND, W. H.; KOSCH, P. C. Equine clinical neonatology. ed. *Lea & Febiger: Filadelfia*, London, p.846, 1990.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. Bergey's manual of sistematic bacteriology, 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.984, 1994.

LAVOIE, J. P.; DROLET, R.; PARSONS, D.; LEGUILLETTE, R.; SAUVAGEAU, R.; SHAPIRO, J.; HOULE, L.; HALLÉ, G.; GEBHART, C. J. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada. *Equine Vet. J.* v.32, p.418-425, 2000.

LAVOIE, J. P.; DROLET, R. *Lawsonia intracellularis*. In: Equine Infectious Diseases. 1ed. SAUNDERS: Sellon & Long. p.313-316, 2007.

LEMARCHAND, T. X.; TULLY, JR. T. N.; SHANE, S. M.; DUNCAN, D. E. Intracellular *Campylobacter*-like organisms associated with rectal prolapse and proliferative. *Vet Pathol.* v.34, p.152, 1997.

LIMA, A. A. M.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; INNES, D. J.; GUERRANT, R. L. Effects of *Clostridium difficile* toxins a and b in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infection and Immunity*, v.56, n.3, p. 582-588, 1988.

LINDGREN, K.; LJUNGVALL, Ö.; NILSSON, O.; LJUNGSTRÖM, B. L.; LINDAHL, C.; HÖGLUND, J. *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Vet.Parasitol.*, v.151, p.337-43, 2008.

LOHMANN & BARTON. Endotoxemia. diseases In: *Equine Infectious Diseases*. 1 ed. Saunders: Sellon & Long. p. 37, 2007.

LÜTHJE, P.; BRAUNER, A. Ag43 promotes persistence of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in the urinary tract. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, p.2316-2317, 2010.

LYERLY, D. M.; NEVILLE, L. M.; EVANS, D. T. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.1, p.184-190, 1998.

LYONS, E. T.; TOLLIVER, S. C.; Prevalence of parasite eggs (*Strongyloides westeri*, *Parascaris equorum*, and strongyles) and oocysts (*Eimeria leuckarti*) in the

feces of Thoroughbred foals on 14 farms in central Kentucky in 2003. *Parasitology Research*. v.92, n.5, p.400-404, 2004.

MAIR, T.; DIVERS, T.; DUCHARME, M. Manual of equine gastroenterology. ed. WB Saunders, London. p. 527, 2002.

MACGLADE, T. R.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R. C. A. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Veterinary Parasitology*. v.110, n.3-4, p.197-205, 2003.

MARTINS, I. V. F.; PEREIRA, M. J. S.; GRISI, L.; SCOTT, F. B. Seasonal abundance of equine strongyles (Nematoda: Strongylidae) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.1, p.43-47, 2005.

McDONOUGH, P. L.; FAGELMAN, D.; SHIN, S. J.; BRUNNER, M. A.; LEIN, D. H. Salmonella enteric serotype Dublin infection: an emerging infectious diseases for the Northeastern United States. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.8, p.2418-2427, 1999.

MAYER, C. L.; PALMER, C. J. Evaluation of pcr, nested pcr, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 6, p. 2081-2085, 1996.

MEIRELLES, M.; LINS, L. A.; FREY JR, F.; KASINGER, S.; NOGUEIRA, C. E. W. Enterite por coronavírus em potros puro sangue inglês em um haras no Rio Grande do Sul. XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós Graduação. 2008.

MELO, U. P.; FERREIRA, C.; PALHARES, M. S. Doenças gastrintestinais em potros: etiologia e tratamento. *Ciência Animal Brasileira*, v.8, n.4, p.733-744, 2007.

MIWA, N.; NISHINA, T.; KUBO, S.; HONDA, H. Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J. Veterinary Medicine Science*, v.59, n.7, p.557-560, 1997.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo, *Ciência Rural, Santa Maria*, v.35, n.6, p.1469-1477, 2005.

MORSE, E. V.; DUNCAN, M. A.; PAGE, E. A.; FESSLER, J. F. Salmonellosis in equidae: a study of 23 cases. *Cornell Veterinary*. V.66, p. 198-213, 1976.

MUSCATELLO, G.; LOWE, J. M.; FLASH, M.,L.; MCBRIDE, K. L.; BROWNING, G. F. Review of the epidemiology and ecology of *Rhodococcus equi*. In: *Proceedings of the annual convention AAEP*, 2007. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em 3 Jul. 2009.

NAVARRO, M.; MONREAL, L.; SEGURA, D.; ARMENGOU, L., ANOR, S. A comparison of tradicional and quantitative analysis of acid-base and electrolyte imbalances in horses with grastrintestinal disorders. *J. Vet. Internal Medicine*, n.19, p.871-877, 2005.

NETHERWOOD, T.; WOOD, J. L. N.; TOWNSEND, H. G. G.; MUMFORD, J. A.; CHANTER, N. Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiology and infection*, n.117, p.375-383, 1996.

NORGREN, M.; NORMARK, S.; LARK, D.; O'HANLEY, P.; SVANBOR, C.; UHLIN, B. E. Mutations in E. coli cistrons affecting adhesion to human cells do not abolish Pap pili fiber formation. *EMBO J*, v.3, n.5, p.1159-1165, 1984.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P. G.; PACHECO, M. D.; MASCARINI, L. M.; RIBEIRO, M. G.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D T.; BARROS, B. J. P.; BORGES, A. S. Diarrhea in Nelore calves: Clinical and etiologic study. *Pesq. Vet. Bras.* v.27, n.10, p.419-424, 2007.

ORSINI, J. A.; DIVERS, T. J. Equine Emergencies. 3.ed. St. Louis, Missouri: Saunders/Elsevier, 2007. 839p.

PAZ e SILVA, F. M.; LOPES, R. S.; ARAÚJO-JUNIOR, J. P. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.22, n.1, p.22-28, 2013.

PEIRÓ, J. R; BORGES, A. S.; GONÇALVES, R. C.; MENDES, L. C. N. Evaluation of a portable clinical analyzer for the determination of blood gas partial pressures, electrolyte concentrations, and hematocrit in venous blood samples collected from cattle, horses, and sheep. *American Journal Veterinary Research*, vol 71, n. 5, p. 515-521, 2010.

PIDDOCK, L. J. V.; RICCIA, V.; MCLAREN, I.; GRIGGS, D. J. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.4, p.635–641, 1998.

POPOFF, M. Y.; LE MINNOR, L. Formules antigéniques des serovars de Salmonella. Centre Collaborateur OMS de référence et de recherches pour les Salmonella, 1992. 145p.

PRINCEWELL, T. J. T.; AGBA, M. I. Examination of bovine faeces for the isolation and identification of *Clostridium* species. *J. Applied Bacteriology*, v.52, p.97-102, 1982.

PUSTERLA, N.; GEBHART, C. Equine enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Equine Vet. Educ.* v.21, p.415-419, 2009.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. *Clinical Vet. Microbiology*, London, Wolfe, p.137–143, 1994.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Rhodococcus equi*. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*, Porto Alegre: Artmed, p.71-73, 2005.

RACZ, M. L.; MUNFORD, V.; FERNANDES, M. J. B.; KROEFF, S. S.; KOTAIK, I. Identification, propagation and subgroup characterization of an equine rotavirus isolated in São Paulo, Brazil. *Rev. Microbiol.* v.24, n.3, 1993.

RADOSTITS, M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, p.657-661, 2002.

RIBAS, L. M.; MORAES, C. M.; LINS, L. A.; FLORES, E. F.; NOGUEIRA, C. E. W. Fatores de risco associados a doenças respiratórias em potros Puro Sangue Inglês do nascimento ao sexto mês de vida. *Ciência Rural*, v.39, n.6, p.1789-1794, 2009.

RIBEIRO FILHO, J. D.; ABREU, J. M. G.; ALVES, G. E. S.; DANTAS, W. M. F. Hemogasometria em equinos com compactação experimental do colon maior tratados com sene, fluidoterapia enteral e parenteral. *Ciência Rural*, v.37, n.3, p.755-761, 2007.

RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; LARA, G. H. B.; SIQUEIRA, A. K.; FERNANDES, M., C. Fatores de virulência de *Rhodococcus equi*. Implicações na epidemiologia e controle da rodococose nos animais e no homem. *Vet. e Zootec.*, v.14, n.2, p.147-163, 2007.

SCHUMACHER, J.; SCHUMACHER, J.; ROLSMA, M.; BROCK, K. V.; GEBHAR, C. J. Surgical and medical treatment of an arabian filly with proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Intern. Med.* v.14, p.630-632, 2000.

SCHAER, B. L. D.; ACETO, H.; RANKIN, S. C. Outbreak of Salmonellosis Caused by *Salmonella enterica* Seroovar Newport MDR-AmpC in a Large Animal Veterinary Teaching Hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.24, p.1138–1146, 2010.

SONGER, J. G. Clostridial enteric disease of domestic animals. *Clin. Micro. Rev.* v.9, 216-234, 1996.

SELLON, D.C.; BESSER, T. E.; MACCONNICO, R. S.; VIVRETTE, S. L. et al. Diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: PCR or culture? *In: Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 2000. Disponível em www.ivis.org . Acesso em 4 jul. 2009.

SELLON, D. C. Miscellaneous parasite diseases *In: Equine Infectious Diseases*. 1 ed. SAUNDERS: Sellon & Long. p.473-480, 2007.

SIMS, L. D.; TZIPORI, S.; HAZARD, G. H.; CARROL, C. L. Haemorrhagic necrotizing enteritis in foals associated with *Clostridium perfringens*. *Australian Veterinary Journal*. v.62, 194-196, 1985.

SLOVIS, N., M. My horse has *Salmonella* – now what? *In: Proceeding of the North American Veterinary Conference*, Orlando, Florida, jan.13-27, 2007. Disponível em www.ivis.org. Acesso em 20 jun. 2010.

SLOVIS, N., M.; ESTRADA, M.; LEUTENEGGER, C. M. Comprehensive analysis of infectious agents associated with diarrhea in foals in central Kentucky. *In: Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 2010. Disponível em www.ivis.org. Acesso em 20 jun. 2011.

SLOVIS, N. M. Infection gastrointestinal disorders. *Proceedings of the 11th International Congress of World Equine Veterinary Association*, Guarujá, SP, Brazil, 2009.

SMITH, D. G. E.; LAWSON, G. H. K. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol*. v.82, p.331–345, 2001.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. *Parasitologia veterinária*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, p.218-261, 2010.

TAKAI, S.; IKEDA, T.; SASAKI, Y.; WATANABE, Y.; OZAWA, T.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15 to 17 kilodalton antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, p.1624-1627, 1995a.

TAKAI, S.; IMAI, Y.; FUKUMAGA, Y. Identification of virulence associated plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. *Journal of Infectious Diseases*. v.172, p.1306-1311, 1995b.

TAKAI, S.; WATANABE, Y.; IKEDA, T.; OZAWA, T.; MATSUKURA, S.; TAMADA, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Virulence associated plasmids in *Rhodococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology*. v.31, p.1726-1729, 1993.

TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; OCHIAI, S.; SAKAI, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v.58, p.669-672, 1996.

TOSCAN, G.; PEREIRA, R. C. F.; ARAUJO, L.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. Comparação da prevalência de *Cryptosporidium* spp. Em equinos de tração e em atletas do jockey club de Santa Maria, RS, Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.11, p.436-440, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *MICROBIOLOGIA*. 3 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. p.543-586.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. M. *MICROBIOLOGIA*. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TRAUB, R.; WADE, S.; READ, C.; THOMPSON, A.; MOHAMMED, H. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of *Giardia duodenalis* in horses, *Vet. Parasitol.*, p. 317-321, 2005.

TRAUB-DARGATZ, J. L.; BESSER, T. E. Salmonellosis. In: *Equine Infectious Diseases*. 1 ed. SAUNDERS: Sellon & Long. p.331-345, 2007.

UMUR, S.; AÇICI, M. A survey on helminth infections of equines in the central black sea region, Turkey. *Turk J Vet Anim. Sci.*; v.33, n.5, p.373-378, 2009.

VAN DUIJKEREN, E.; VAN ASTEN, A. J. A. M.; GAASTRA, W. Characterization of *Escherichia coli* isolated from adult horses with and without enteritis. *Vet Quart.* v.22, 2000.

VARGAS, L.; RIGOLON, L. P. Ocorrência de *Giardia duodenalis* em equinos do noroeste e do norte do Paraná-Brasil, *Semina: Ci.*, Londrina, v.19, n.1, p.73-75, 1998.

VERONESI, F.; PASSAMOINTI, F.; CACCIÒ, S.; DIAFERIA, M.; FIORETTI, D. P. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Italy and molecular characterization of isolates. *Zoonoses and Public Health*, jun. 2008.

WALKER, R. L.; MADIGAN, J. E.; HIRD, D. W.; CASE, J. T.; VILLANUEVA, M. R. ; BOGENRIEF, D. S. An outbreak of equine neonatal salmonellosis. *Journal Veterinary Investigation*, v.3, p.223-227, 1991.

WARD, A. C. S.; SRIRANGANATHAN, N.; EVERMANN, J. F.; TRAUB-ARGATZ, J. L. *Veterinary Microbiology*. v.12 p.221-228, 1986.

WEESE, J. S.; STAEMPFLI, H. R.; PRESCOTT, J. F. A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine Veterinary Journal*, v.33, n.4, p.403-409, 2001.

WEESE, J. S. Enteric clostridial infections *In: Equine Infectious Diseases*.1. ed. Saunders: Sellon & Long. p.362-367, 2007.

WEESE, J. S. The gastrointestinal system. *In: Color atlas of diseases and disorders of the foal*. 1. ed. Saunders: Elsevier. p.79-131, 2009.

WHITTIER, S.; SHAPIRO, D. S.; KELLY, W. F.; WALDEN T. P.; WAIE, K. J.; McMILLON, L.; T.; GILLIGAN, P. H. Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. v31, n.11, p.2861-2865, 1993.

WIERUP, M.; DIPIETRO, J. A. Bacteriologic examination of equine fecal flora as a diagnostic tool for equine clostridiosis. *Am. J. Vet. Res.* v.32, p.1629-1633, 1981.

WILSON, J. H.; GEBHART, C. J. Lawsonia proliferative enteropathy in foals: clinical features and piglet parallels. *In: Proceedings of the American association of Equine Practitioners - focus meeting*. Austin, Texas, USA – 2008.

WOOLCOCK, J. B.; FARMER, A. M. T.; MUTIMER, M. D. *Journal of Clinical Microbiology*, v.9, p.640–642, 1979.

XIAO, L.; HERD, R. P. Review of equine *Cryptosporidium* infection. *Equine Veterinary Journal*, v.26, n.1, p9-13, 1994a.

XIAO, L.; HERD, R. P. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Veterinary Journal*, v.26, n.1, p14-17, 1994b.

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T. K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Oocysts in Samples of Raw Surface Water and Wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* v.67, n.6, p.1097-1101, 2001.

ZIMMEL, D. Neonatal foal diarrhea. *In: Proceedings of the American Association of Equine Practitioners – Focus Meeting*, Austin, Texas, USA, 2008.

ANEXO I

ARTIGO CIENTÍFICO

TRABALHO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA EQUINE VETERINARY
JOURNAL**Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals**

R. O. S. SILVA, M. G. RIBEIRO[†], M. S. PALHARES, A. S. BORGES[†], R. P. A. MARANHÃO, M. X. SILVA, T. M. LUCAS[†], G. OLIVO[†] and F. C. F. LOBATO*

Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

[†]School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brazil.

*Correspondence email: flobato@vet.ufmg.br; Received: 21.07.12; Accepted: 29.12.12

Summary

Reasons for performing the study: Toxin detection and screening could contribute to knowledge of the transmission patterns, risk factors and epidemiology of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*.

Objective: To isolate *C. difficile* and *C. perfringens* and to detect A/B toxins in faecal samples from diarrhoeic and nondiarrhoeic foals.

Study design: Cross-sectional observational study.

Methods: A total of 153 samples from foals were collected: 139 samples from farms and 14 samples from diarrhoeic foals admitted to a veterinary hospital. The A/B toxins were detected by cytotoxicity assay. All suspected colonies of *C. perfringens* were subjected to polymerase chain reaction for detection of the major toxin genes (a, b, e and i) and for detection of β 2-, NetB- and enterotoxin-encoding genes. Furthermore, *C. difficile* and *C. perfringens* isolates were evaluated for *in vitro* antimicrobial susceptibility.

Results: Seven of 153 (4.6%) samples, all from diarrhoeic foals, were positive for *C. difficile* A/B toxin. Of these, 5 of 14 (35.7%) were from hospitalised foals, and only 2 of 63 (3.2%) diarrhoeic foal samples were from farms ($P = 0.002$). *Clostridium perfringens* was isolated from 31 (20.3%) foals, of which 21 of 76 (27.6%) were diarrhoeic and 10 of 76 (13.2%) were nondiarrhoeic, demonstrating a difference between these 2 groups ($P = 0.045$). Only 4 strains were positive for the β 2-encoding gene (*cpb2*). All *C. difficile* and *C. perfringens* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin.

Conclusions: The present report highlights the need for laboratory diagnostics to differentiate *C. difficile*-associated infection in foals from other causes of diarrhoea to facilitate adequate antimicrobial therapy.

Potential relevance: More studies are needed to clarify the role of *C. perfringens* as a primary agent of diarrhoea in foals.

Keywords: horse; colitis; nosocomial diarrhoea; A/B toxins

Introduction

Clostridium difficile is a spore-forming, anaerobic, Gram-positive bacillus recognised as the pathogen responsible for most cases of antimicrobial-associated diarrhoea in human patients [1]. In horses, *C. difficile* is responsible for colitis in adults [2] and diarrhoea in foals, which can occur spontaneously or may be associated with antimicrobial use [3,4]. Moreover, recent studies also showed that isolates from human patients suffering from *C. difficile* infection

(CDI) are highly related, genetically, to strains isolated from animals, suggesting hypothetical zoonotic potential [5,6]. *Clostridium perfringens* is an anaerobic, spore-forming, Gram-positive bacillus that has been associated with enteritis in adult horses and foals [7,8]. *Clostridium perfringens* isolates are conventionally classified as one of 5 toxigenic types (A–E) based on the capacity to produce one or more of the 4 major toxins (a, b, e and i) [9]. In addition to the major toxins, *C. perfringens* can produce additional virulence factors, such as b2 toxin, which has been associated with diarrhoea in horses [10], and necrotic enteritis toxin B-like (NetB), a pore-forming toxin recently described as an important virulence factor for necrotic enteritis in broiler chickens [11]. *Clostridium perfringens* is commonly found in the enteric microbiota of healthy animals, complicating the laboratory diagnosis of infections caused by this microorganism. In addition, owing to the absence of control case studies with foals, the role of b2 toxin, enterotoxin and NetB in this species remains unclear.

Toxin detection and screening could contribute to the knowledge of *C. difficile* and *C. perfringens* transmission patterns, risk factors and epidemiology [12]. In light of this, the objective of this study was to detect *C. difficile* A/B toxins and to identify *C. perfringens* and *C. difficile* strains in faecal samples from diarrhoeic and nondiarrhoeic foals.

Materials and methods

Samples

A total of 153 samples from foals were collected from farms and from animals admitted to the Veterinary Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais. A total of 139 samples from 17 different farms were cultured, comprising 63 samples from diarrhoeic foals and 76 samples from nondiarrhoeic foals. Samples from foals collected at the veterinary hospital accounted for a total of 14 diarrhoeic faecal samples. The samples from hospitalised animals were obtained at the time of clinical examination and were only collected from foals with active diarrhoea. All specimens were collected in sterile containers and were stored at -20°C until testing was performed.

Cytotoxicity assay (CTA)

The CTA for the detection of *C. difficile* A/B toxins was performed with Vero cells (Vero–ATCC CCL 81) as described earlier [13]. Briefly, faecal samples were diluted 1:4 in phosphate-buffered saline (pH 7.0) and centrifuged at 3000 **g** for 5 min at 4°C. The resulting supernatant was filtered through a filter with a pore size of 0.22 mm and diluted 2-fold until a dilution of 1:1024 was reached. Serial dilutions and parallel samples with *Clostridium sordellii* antitoxina were added onto Vero cell monolayers. The cells were examined after 24 h of incubation at 37°C in an incubator containing air supplemented with 5% CO₂. A specimen was considered positive for the CTA if at least 90% of cells were rounded and, at the same dilution of the parallel sample, the effect was neutralised by antitoxin.

Isolation and polymerase chain reaction (PCR) of *C. difficile*

To select *C. difficile* spores, equal volumes of faecal samples and 96% ethanol (v/v) were mixed and, after incubation for 30 min at room temperature, aliquots of 50 ml were inoculated on plates containing cycloserine-cefoxitin fructose agarb supplemented with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholatec. After anaerobic incubation at 37°C for 72 h, all colonies with suggestive morphology were subjected to a previously described multiplex-PCR for a housekeeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*) and a binary toxin gene (*cdtB*) [12].

Isolation and PCR of *C. perfringens*

For isolation of *C. perfringens*, 0.08–0.12 g of faeceswas serially diluted by factors of 10, ranging from 10⁻¹ to 10⁻⁶. Aliquots of 50 ml of each dilution were plated on sulfite polymyxin sulfadiazine agard and incubated anaerobically at 37°C for 24 h. After incubation, characteristic colonies were subjected to previously described PCR [14] for the detection of genes encoding the b2 toxin (*cpb2*), enterotoxin (*cpe*) and major *C. perfringens* toxins (a, b, e and i). In

addition, a previously described PCR was applied for the detection of the Net B-encoding gene (*netb*) [15]. For all PCRs, amplifications were carried out in a thermocycler (Thermal Cycler Px2e), and the products were visualised under ultraviolet light in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

Antimicrobial susceptibility

The minimal inhibitory concentration (MIC) for isolated *C. difficile* and *C. perfringens* strains was determined by the agar dilution method, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [16]. The following antimicrobials were evaluated: penicillin, florfenicol, oxytetracycline, erythromycin, vancomycin, metronidazole and tylosin. *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) was used as a control strain.

Data analysis

Fisher's exact test was used to evaluate associations between variables. Significance was set at a P value of 0.05 (Stata).

Results

Seven samples, all from diarrhoeic foals, were positive for *C. difficile* A/B toxins (Table 1). Of these, 5 (35.7%) were from 14 hospitalised foals and only 2 (3.2%) were from diarrhoeic samples from 63 visited farms, demonstrating a significant difference ($P = 0.002$). Two positive foals had a history of antimicrobial treatment before diarrhoea, and 4 had a spontaneous onset of the disease. There was no information about the clinical history for the remaining A/B toxin-positive foal. None of the nondiarrhoeic foals was positive for A/B toxins by CTA. *Clostridium difficile* was isolated from 7 animals: 5 isolates were from diarrhoeic foals and 2 from nondiarrhoeic foals. Four of 7 strains were toxigenic (A+B+), while the remaining 3 were nontoxigenic by PCR. Four animals positive for A/B toxin were negative for *C. difficile* isolation, whereas a toxigenic strain was isolated from a diarrhoeic foal that was negative by CTA. *Clostridium perfringens* was isolated from 31 (20.3%) foals, of which 21 of 76 (27.6%) were diarrhoeic and 10 of 76 (13.2%) were nondiarrhoeic animals,

indicating a difference between these 2 groups ($P = 0.045$). Among the diarrhoeic foals, 20 strains were isolated from samples from farms, while one of 14 (7.1%) was isolated from hospitalised foals. All *C. perfringens* isolates were classified as type A, and 4 strains were positive for b2-encoding gene (*cpb2*), with 3 strains coming from nondiarrhoeic foals and one strain from a diarrhoeic foal. The Net-B-encoding gene (*netb*) and the enterotoxin-encoding gene (*cpe*) were not detected. All *C. difficile* and *C. perfringens* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin. *Clostridium difficile* isolates were also susceptible to oxytetracycline and florfenicol, while 3 strains were resistant to penicillin, and 2 were resistant to erythromycin and tylosin. *Clostridium perfringens* strains were susceptible to penicillin (Table 2), while 3, 4 and 5 strains were resistant to oxytetracycline, florfenicol and tylosin, respectively. For erythromycin, a clearly bimodal distribution was observed, with 17 (58.6%) resistant strains, all with an MIC ≥ 256.0 mg/ml, and 12 susceptible strains, with an MIC ≤ 2.0 mg/ml.

Discussion

Detection and isolation of *C. difficile* A/B toxin

The A/B toxin was not observed in nondiarrhoeic foals in the present study, suggesting that subclinical CDI in foals is not an important event, in contrast with previous reports for dogs and piglets [12,17,18]. The absence of A/B toxin in nondiarrhoeic foals has also been previously reported [19,20] and, although this information has been established, a recent survey showed that clinicians and pathologists commonly submit normal faecal samples from foals for laboratory diagnosis of CDI [21]. Testing nondiarrhoeic foals might decrease the positive predictive value if the test is not 100% specific and there is a low prevalence of the organism, as shown in the present report. It is also important to note that in the present study, A/B toxins were detected by CTA, which is considered the 'gold standard' method; however, most laboratories report the use of commercial enzyme immunoassays for A/B toxin detection in equine

faecal samples, which are more rapid and economical but might have less sensitivity and specificity [21]. The results of this study and previous reports suggest that there is no justification for testing the faeces of nondiarrhoeic foals for the presence of A/B toxins.

In the diarrhoeic group, 7 of 77 (9.1%) foals, of which 4 were 5 months old, one was 3 months and 2 were 13 days old, were positive for A/B toxin detection. The prevalence found here is higher than the 5% reported by Frederick *et al.* [22] in the USA but lower than the 16.7% reported by Weese *et al.* [19] in Canada. It is also interesting to note the significant difference ($P = 0.002$) between the positive rate in animals from farms and animals from the veterinary hospital; in the foals we examined, an animal sampled in the veterinary hospital had 16 times greater probability of being positive for A/B toxin than a diarrhoeic animal from a farm. This higher rate found in hospitalised foals could not be interpreted as a nosocomial infection, because all samples were collected at the time of clinical examination. However, foals admitted to the veterinary hospital commonly have been treated previously with antimicrobials on the farm but have not responded. In fact, in this report, all positive animals from the veterinary hospital were initially diagnosed by clinicians with causes of diarrhoea other than *C. difficile*. Indeed, the higher rate of foals positive for A/B toxin at the veterinary hospital was most probably caused by a lack of awareness of CDI by veterinarians on the farm, leading to unsuccessful treatment and worsening of clinical signs. In addition, this report highlights the need for laboratory diagnostics that differentiate enteropathogens in foals, allowing for adequate antimicrobial therapy.

Two foals positive for A/B toxins had a history of diarrhoea 2 days after antimicrobial treatment with penicillin G for clinical suspicion of pneumonia. These cases were also the first confirmed description of *C. difficile* infection in foals in Brazil [4]. Among the animals examined, there were no data about antimicrobial administration or clinical history for one positive foal that was sampled on a farm. However, 4 positive foals (3 hospitalised and one from a farm) had a history of spontaneous onset of the diarrhoea. In addition, these 4 animals were negative for other enteropathogens (*Salmonella* spp., rotavirus and *Lawsonia intracellularis*), suggesting that *C.*

difficile was the aetiology of the diarrhoea in these cases. In these 4 cases, a worsening of clinical signs was observed after antimicrobial therapy other than metronidazole, which is considered the first choice for CDI in foals. Three foals received metronidazole after diagnosis of CDI (by toxin detection) and recovered well, although one foal that was treated with ceftiofur died [23].

Four toxigenic strains of *C. difficile* were isolated, all from diarrhoeic foals. Of these foals, 3 were positive for A/B toxins, and one, aged one-day-old, was negative. An asymptomatic carrier status must be considered for this animal, because previous reports have shown that it is a common event in foals younger than 14 days [20]. Moreover, it should be emphasised that the incidence of carrier status among the young animals examined in the present study was much lower than previously reported [20,24]. From a total of 16 animals younger than 14 days old, only 2 (12.5%) were positive for the isolation of *C. difficile*, of which one strain was toxigenic and the other was nontoxigenic. Another possible explanation for the presence of a toxigenic strain in a CTA-negative foal is toxin degradation by proteases found in faeces [17], but this suggestion must be considered with caution because studies have shown great stability of the A/B toxins in equine faeces [20,25]. Three nontoxigenic strains were also isolated from 2 nondiarrhoeic foals, aged 7 days and 12 months old, and another from a diarrhoeic foal, aged 5 months. Notably, *C. difficile* was recovered from only one of 68 (1.5%) nondiarrhoeic foals older than one-month-old, agreeing with previous studies that have shown that isolation in healthy foals older than one month is rare but can sometimes occur, mainly after antimicrobial treatment [3,20]. Unfortunately, there are no data regarding antimicrobial administration in this healthy foal.

Four animals were positive for A/B toxin detection, but *C. difficile* was not isolated from faecal samples. However, there is no standard method for the isolation of *C. difficile*, making it difficult to compare results from other studies, although similar results have been described in foals [19,20,26,27], as well as in other species, such as dogs and piglets [12,17]. It is well known that some *C. difficile* strains cannot grow due to susceptibility to one or both antimicrobials used in medium [28]. In addition, the use of cycloserine-cefoxitin-fructose-agar supplemented with taurocholate, even with the supplementation of taurocholate,

could lead to variable sensitivity for *C. difficile* spore recovery when compared with other media, such as TCCFB (cefoxitin-cycloserine-broth, supplemented with taurocholate) [29].

***Clostridium perfringens* isolation and genotype**

Clostridium perfringens strains were isolated from animals of all ages, including one 1-day-old diarrhoeic foal, showing early colonisation by this enteric agent. The high detection rate of *C. perfringens* type A is not surprising, because this type is considered to be the most common in animal faeces and also in the environment [9]. *Clostridium perfringens* type C was not detected, and no strains were positive for *cpe* or *netb* genes. To our knowledge, the *netb* gene has not been described in equine *C. perfringens* isolates [11], while the absence of the *cpe* gene observed here contrasts with previous studies [19,22] that have reported a low rate of the *cpe* gene (between 2 and 12.5%) in equine *C. perfringens* isolates, commonly without association with diarrhoea or worsening clinical signs.

Only one animal positive for *C. difficile* A/B toxins was also positive for *C. perfringens* isolation, suggesting that an association between these 2 enteropathogens is uncommon, as previously reported [19]. Only 4 strains were positive for the b2-encoding gene, suggesting that this gene is not a good virulence factor marker for *C. perfringens* in foals. There are few data about the role of *cpb2* in foals, because the majority of studies focus on adult horses, and the importance of b2 toxin remains controversial [30]. Disregarding the genotyping, there was a significant association between the isolation of *C. perfringens* and the presence of diarrhoea ($P = 0.045$), corroborating Netherwood *et al.* [31]. These results suggest that, despite the presence *cpb2*, *cpe* or *netb* genes, the isolation of *C. perfringens* from diarrhoeic foals could implicate the involvement of this agent in diarrhoea. However, given that *C. perfringens* could be recovered from nondiarrhoeic foals, a positive isolation of *C. perfringens* cannot be interpreted alone, and the absence of other enteropathogens might be necessary to confirm the diagnosis [10].

Antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* and *C. difficile* strains

All *C. difficile* isolates were susceptible to metronidazole and vancomycin, which have been recommended for the treatment of CDI in horses [3]. However, vancomycin is a critically important antimicrobial for human medicine and thus, its use in horses should be restricted to life-threatening situations where alternatives are not available [32]. These results are similar to previous studies in various species [20,33] and, at present, metronidazole-resistant isolates have been found only in American horses [34,35]. Likewise, all *C. difficile* isolates were also susceptible to oxytetracycline. A wide range of susceptibilities to tetracycline is commonly reported in *C. difficile* isolates from human patients and swine, but in general, nearly all isolates are susceptible [36,37]. Two *C. difficile* strains that were resistant to penicillin were isolated from foals that had signs of diarrhoea before treatment with penicillin G for pneumonia [4]. According to Båverud [38], b-lactams are commonly implicated in *C. difficile*-associated diarrhoea after antimicrobial treatment in both foals and adult horses. Two strains were resistant to erythromycin, which was previously reported in horses by Båverud *et al.* [20] and is also commonly found among *C. difficile* isolates from human patients [39]. All *C. difficile* isolates were susceptible to florfenicol, while only one strain was resistant to enrofloxacin, but no data regarding these 2 compounds were found for *C. difficile* isolates from foals. With tylosin, only one strain showed an intermediate susceptibility, whereas the remaining 6 *C. difficile* isolates were susceptible to the drug. Previous studies reported *in vitro* tylosin activity against *C. difficile* isolates from piglets with enteritis, but in contrast with our findings, some strains were also resistant [37]. The MIC results must be interpreted with caution because most *C. difficile* isolates from cases of antimicrobial-induced CDI in humans were susceptible to the implicated drug [40], suggesting that successful treatment is most probably dependent on both the susceptibility of *C. difficile* and other components of the enteric microbiota [19]. All *C. perfringens* strains were susceptible to penicillin, vancomycin and metronidazole, corroborating other studies with equine isolates and also other domestic animal species [41,42]. In this report, resistance of *C. perfringens* strains was observed for 2

macrolides tested, erythromycin and tylosin. Similar results were previously reported for isolates from various sources [33,37,43]. A clear bimodal distribution could also be observed for erythromycin, suggesting a genetic mechanism of resistance, which is probably due to the presence of the *ermQ* genes [44]. These resistance genes were previously described in *C. perfringens* isolates from several domestic species [43], but until now, they were not found in foal isolates. With oxytetracycline, 5 (17.2%) strains were also resistant. It was previously reported that *Clostridium* species can carry tetracycline resistance genes that encode a ribosome-protecting cytoplasmic protein that mediates the active efflux of tetracycline from the cell [45]. As it is common to see oxytetracycline-resistant *C. perfringens*, the resistance rate found in this study is not surprising and is also lower than that of previous reports on *C. perfringens* isolates from foals and other species, including poultry, cattle, dogs, swine and man [46,47].

Conclusions

This report highlights the need for laboratory testing to differentiate *C. difficile*-associated infection in foals from other causes of diarrhoea, allowing for adequate antimicrobial therapy. More studies are needed to clarify the role of *C. perfringens* as a primary agent of diarrhoea in foals, because there is no consensus about the role of b2 toxin and other additional virulence factors. Finally, although not routinely performed, the evaluation of antimicrobial susceptibility of *C. difficile* and *C. perfringens* isolates from foals might be useful in the treatment of the enteric diseases associated with these pathogens in foals. The next step following this study is to evaluate the presence of antimicrobial resistance genes in these isolates. In addition, the ribotyping of the *C. difficile* strains would be interesting, because until now, it has not been performed on *C. difficile* isolates from any animal source in Brazil.

Authors' declaration of interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and publication of this article.

Ethical animal research

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita (CETEA-UNESP, protocol number 150/2010).

Sources of funding

This work was supported by funds from Fapemig, Capes, PRPq-UFMG and CNPq.

Acknowledgements

We thank Amanda N. Diniz and Carlos A. Oliveira Junior for the help with the minimal inhibitory concentration assay.

Authorship

R.O.S.S. was responsible for A/B toxin detection and isolation of *C. difficile*. M.S.P. and R.P.A.M. were responsible for the clinical selection and treatment of the foals. A.S.B. and M.X.S. were responsible for visiting the farms and for the statistical analysis. T.M.L. and G.O. were responsible for the isolation, PCR and antimicrobial susceptibility of *C. perfringens*. F.C.F.L. and M.G.R. are the coordinators of this experiment. F.C.F.L. was responsible for the UFMG team, while M.G.R. was responsible for the UNESP team.

Manufacturers' addresses

aNIBSC, National Institute for Biological Standards and Control, London, UK.

bHi-media, Mumbai, India.

cSigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA.

dSPS, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

eThermo Electron Corporation, Milford, Massachusetts, USA.

fStata Corp., College Station, Texas, USA.

References

1. Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.D., Wehland, J. and Aktories, K. (2009) *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog.* **5**, e1000626.
2. Songer, J.G., Trinh, H.T., Dial, S.M., Brazier, J.S. and Glock, R.D. (2009) Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**, 377-380.
3. Båverud, V. (2004) *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **20**, 615-630.
4. Silva, R.O.S., Moreira, F.M., Rezende, J.V., Pires, P.S., Maranhão, R.P.A., Palhares, M.S. and Lobato, F.C.F. (2012) First confirmed case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in foals in Brazil. *Ciência Rural* **42**, 498-500.
5. Jhung, M.A., Thompson, A.D., Killgore, G.E., Zukowski, W.E., Songer, G., Warny, M., Johnson, S., Gerding, D.N., McDonald, L.C. and Limbago, B.M. (2008) Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1039-1345.
6. Norman, K.N., Scott, H.M., Harvey, R.B., Norby, B., Hume, M.E. and Andrews, K. (2011) Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5755-5760.

7. Schotte, U., Truyen, U. and Neubauer, H. (2004) Significance of β -toxicogenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors – a review. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **51**, 423-426.
8. Furr, M., Cohen, N.D., Axon, J.E., Sanchez, L.C., Pantaleon, L., Haggett, E., Campbell, R. and Tennent-Brown, B. (2012) Treatment with histamine-type 2 receptor antagonists and omeprazole increase the risk of diarrhoea in neonatal foals treated in intensive care units. *Equine Vet. J.* **41**, 80-86.
9. Siqueira, F.F., Almeida, M.O., Barroca, T.M., Horta, C.C., Carmo, A.O., Silva, R.O., Pires, P.S., Lobato, F.C. and Kalapothakis, E. (2012) Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity. *Vet. Microbiol.* **159**, 397-405.
10. Hazlett, M.J., Kircanski, J., Slavic, D. and Prescott, J.F. (2011) Beta-2 toxicogenic *Clostridium perfringens* type A colitis in a three-day-old foal. *J. Vet. Diagn. Invest.* **23**, 373-376.
11. Keyburn, A.L., Bannam, T.L., Moore, R.J. and Rood, J.I. (2010) NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins* **2**, 1913-1927.
12. Silva, R.O.S., Salvarani, F.M., Cruz Júnior, E.C.C., Pires, P.S., Santos, R.L.R., Assis, R.A., Guedes, R.M.C. and Lobato, F.C.F. (2011) Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* from piglets in Brazil. *Ciência Rural* **41**, 1130-1135.
13. Van den Berg, R.J., Bruijnesteijn Van Coppenraet, L.S., Gerritsen, H.J., Endtz, H.P., Van Der Vorm, E.R. and Kuijper, E.J. (2005) Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5338-5340.
14. Vieira, A.A.S., Guedes, R.M.C., Salvarani, F.M., Silva, R.O.S., Assis, R.A. and Lobato, F.C.F. (2008) Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arq. Inst. Biol.* **75**, 513-516.
15. Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I. and Moore, R.J. (2008) NetB, a new toxin that is associated *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in foals R. O. S. Silva *et al.*

16. CLSI (2011) Performance standards for Antimicrobial Suceptibility Test. Twenty-first Information Supplement v.31, no.1, January, 2011, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
17. Clooten, J., Kruth, S., Arroyo, L. and Weese, J.S. (2008) Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Vet. Microbiol.* **129**, 209-214.
18. Keessen, E.C., Hopman, N.E., van Leengoed, L.A., van Asten, A.J., Hermanus, C., Kuijper, E.J. and Lipman, L.J. (2011) Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1816- 1821.
19. Weese, J.S., Staempfli, H.R. and Prescott, J.F. (2001) A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine Vet. J.* **33**, 403-409.
20. Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspán, A. and Gunnarsson, A. (2003) *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet. J.* **35**, 465-471.
21. Medina-Torres, C.E., Weese, J.S. and Staempfli, H.R. (2011) Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Vet. Microbiol.* **152**, 212-215.
22. Frederick, J., Giguère, S. and Sanchez, L.C. (2009) Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003–2008). *J. Vet. Intern. Med.* **23**, 1254-1260.
23. Preis, I.S., Silva, R.O.S., Pires, P.S., Lobato, F.C.F., Palhares, M.S., Maranhão, R.P.A. and Ecco, R. (2012) Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. *Braz. J. Vet. Pathol.* **5**, 7-11.
24. Magdesian, K.G., Hirsh, D.C., Jang, S.S., Hansen, L.M. and Madigan, J.E. (2002) Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993–1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **220**, 67-73.
25. Weese, J.S., Staempfli, H.R. and Prescott, J.F. (2000) Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**, 332-336.
26. Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A. and Gunnarsson, A. (1997) *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet. J.* **29**, 279-284.

27. Arroyo, L.G., Staempfli, H. and Weese, J.S. (2007) Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet. Microbiol.* **120**, 179-183.
28. Songer, J.G. and Uzal, F.A. (2005) Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**, 528-536.
29. Thitaram, S.N., Frank, J.F., Lyon, S.A., Siragusa, G.R., Bailey, J.S., Lombard, J.E., Haley, C.A., Wagner, B.A., Dargatz, D.A. and Fedorka-Cray, P.J. (2011) *Clostridium difficile* from healthy food animals: optimized isolation and prevalence. *J. Food Prot.* **74**, 130-133.
30. Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M., Gibert, M., Gerber, H. and Straub, R. (1999) Prevalence of b2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 358-361.
31. Netherwood, T., Wood, J.L., Townsend, H.G., Mumford, J.A. and Chanter, N. (1996) Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiol. Infect.* **117**, 375-383.
32. Barr, B.S., Waldridge, B.M., Morrese, P.R., Reed, S.M., Clark, C., Belgrave, R., Donecker, J.M. and Weigel, D.J. (2013) Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. *Equine Vet. J.* **45**, 154-158.
33. Marks, S.L. and Kather, E.J. (2003) Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Vet. Microbiol.* **94**, 39-45.
34. Jang, S.S., Hansen, L.M., Breher, J.E., Riley, D.A., Magdesian, K.G., Madigan, J.E., Tang, Y.J., Silva, J. Jr and Hirsh, D.C. (1997) Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clin. Infect. Dis.* **25**, S266-S267.
35. Magdesian, K.G., Dujowich, M., Madigan, J.E., Hansen, L.M., Hirsh, D.C. and Jang, S.S. (2006) Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **228**, 751-755.
36. Delmée, M. and Avesani, V. (1988) Correlation between serogroup and susceptibility to chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, rifampicin and

tetracycline among 308 isolates of *Clostridium difficile*. *J. Antimicrob. Chemother.* **22**, 325-331.

37. Post, K.W. and Songer, J.G. (2004) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs with enteritis. *Anaerobe* **10**, 47-50.
38. Båverud, V. (2002) *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet. Q.* **24**, 203-219.
39. Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P. and European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD) (2011) Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2227-2234.
40. Dzink, J. and Bartlett, J.G. (1980) *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated diarrhea or colitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 695-698.
41. Watkins, K.L., Shryock, T.R., Dearth, R.N. and Saif, Y.M. (1997) *In-vitro* antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet. Microbiol.* **54**, 195-200.
42. Martel, A., Devriese, L.A., Cauwerts, K., de Gussem, K., Decostere, A. and Haesebrouck, F. (2004) Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chicken to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.* **33**, 3-7.
43. Slavic', D., Boerlin, P., Fabri, M., Klotins, K.C., Zoethout, J.K., Weir, P.E. and Bateman, D. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can. J. Vet. Res.* **75**, 89-97.
44. Benning, V.R. and Mathers, J.J. (1999) Comparison of agar dilution and broth microdilution methods of anaerobic antimicrobial susceptibility testing using several veterinary antibiotics against *Clostridium perfringens* strains originating from porcine and avian sources. *Anaerobe* **5**, 561-569.
45. Chopra, I. and Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, application, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232-260.
46. Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J. and Boerling, P. (2008) Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chicken at a commercial farm. *Vet. Microbiol.* **127**, 116-127.

47. Silva, R.O.S., Salvarani, F.M., Assis, R.A., Martins, N.R.S., Pires, P.S. and Lobato, F.C.F. (2009) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Braz. J. Microbiol.* **40**, 261-263. R. O. S. Silva *et al.* *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in foals

TABLE 1: Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals (n = 153)

Assay	Results	Foals			
		Nondiarrhoeic (farm)	Diarrhoeic		Total
			Hospitalised	Farm	
<i>Clostridium difficile</i> A/B toxin detection	Positive	0/76 (0%)	5/14 (35.7%) ^a	2/63 (3.2%) ^b	7/153 (4.6%)
	Negative	76/76 (100%)	9/14 (64.3%)	61/63 (96.8%)	146/153 (95.4%)
<i>Clostridium difficile</i> isolation	Positive	2/76 (2.6%)	4/14 (28.6%)	1/63 (1.6%)	7/153 (4.6%)
	A+B+	0/76 (0%)	3/14 (21.4%)	1/63 (1.6%)	4/153 (2.6%)
	A+B-	2/76 (2.6%)	1/14 (7.2%)	0/63 (%)	3/153 (2%)
	Negative	74/76 (97.4%)	10/14 (71.4%)	62/63 (98.4%)	146/153 (95.4%)
<i>Clostridium perfringens</i> isolation	Positive	10/76 (13.2%)	1/14 (7.1%)	20/63 (31.8%)	31/153 (20.3%)
	cpb2+	3/76 (4%)	0/14 (0%)	1/63 (1.6%)	4/153 (2.6%)
	cpb2-	7/76 (9.2%)	1/14 (7.1%)	19/63 (30.2%)	27/153 (17.7%)
	Negative	66/76 (86.8%)	13/14 (92.9%)	43/63 (68.3%)	122/153 (79.7%)

Values within a row with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.01$).

TABLE 2: Classification (susceptible, intermediate and resistant) of the 29 *C. perfringens* strains isolated from foals

Antimicrobial	Classification (%) [*]		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Metronidazole	29 (100)	0	0
Penicillin	29 (100)	0	0
Vancomycin	29 (100)	0	0
Tylosin	24 (82.8)	0	5 (17.2)
Florfenicol	19 (65.5)	6 (20.7)	4 (13.8)
Erythromycin	12 (41.4)	0	17 (58.6)
Oxytetracycline	10 (34.5)	5 (17.2)	14 (48.3)

^{*}According to the Clinical and Laboratory Standards Institute [16].