

# OCORRÊNCIA, ASPECTOS BACTERIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS NA COLIBACILOSE DE BEZERROS<sup>1</sup>

HELENA MAGALHÃES<sup>2</sup>, MARIA DO AMPARO QUEIROZ DE FREITAS<sup>3</sup>, WALDO MORENO GONÇALVES<sup>4</sup>  
JEFFERSON ANDRADE DOS SANTOS<sup>5</sup>, MARIA INÉS MUNIZ DE MEDEIROS<sup>2</sup>,  
CARLOS HENRIQUE CAMPELLO COSTA<sup>2</sup> e ELICÉ WALLY VOLLÚ<sup>2</sup>

**RESUMO** - A colibacilose foi registrada em 31 animais (5,70%), de 19 propriedades, dentre 543 bezerros necropsiados, que mostravam diarreia, febre, anorexia, distúrbios respiratórios, prostração e caquexia; em três foram observados fenômenos nervosos caracterizados respectivamente por ataxia, paresia e cegueira. A enfermidade surgiu, com exceção de um caso, no primeiro mês de vida. As cepas de *Escherichia coli* isoladas foram identificadas pelo sistema API 20E. A classificação sorológica de 13 cepas oriundas de bezerros de 8 diferentes criações evidenciou os sorotipos 078:K80, 0141:K99, 0119, 08:K99, 07, 021, 09 e 0128. A histopatologia mostrou a ocorrência de alterações inflamatórias do parênquima pulmonar e do cordão umbilical, ao lado de microabscessos esplênicos, renais e hepáticos e de trombos bacterianos nos rins, no baço e no fígado, comprovando-se ainda bactérias na luz de tubos uriníferos. O conjunto de lesões observadas permitiu a classificação de praticamente todas as formas estudadas nas chamadas colibaciloses septicêmicas, também denominadas colissepticemias.

Termos para indexação: *Escherichia coli*, sorotipo, colissepticemia, lesões, bovinos.

## OCCURRENCE, BACTERIOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF COLIBACILLOSIS IN CALVES

**ABSTRACT** - Colibacillosis was detected in 31 animals (5,70%) of 19 farms, from 543 dead calves, that showed diarrhea, fever, anorexia, respiratory disorders, prostration and cachexia; 3 of them showed nervous problems characterized respectively by ataxia, paresis and blindness. The enfermity started with only one exception in the first month of life. Strains of isolated *Escherichia coli* were identified by the API 20E systems. The serologic classification of 13 strains from 8 different farms was the following: 078:K80, 0141:K99, 0119, 08:K99, 07, 021, 09 and 0128. Histopathological findings were: omphalophlebitis, pneumonia, microabscesses of the liver, kidneys and spleen and bacterial colonization of the renal tubules, of the glomerular capillaries and spleen. The lesions observed lead to the classification of almost all the forms studied from the so-called septicemia colibacillosis, also named colisepticemia.

Index terms: *Escherichia coli*, serotypes, colisepticemia, lesions, bovine.

## INTRODUÇÃO

A colibacilose dos bezerros é uma doença infecto-contagiosa causada por estirpes patogênicas de *Escherichia coli*, que afeta os animais durante o período de lactação. Esse microrganismo pode ser integrante da flora normal dos intestinos.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 18 de dezembro de 1990

<sup>2</sup> Méd.-Vet., PESAGRO-Rio/Laboratório de Biologia Animal. Alameda São Boaventura, 770 - Fonseca - CEP 24123 Niterói, RJ.

<sup>3</sup> Méd.-Vet., Minist. da Agric./PESAGRO-Rio/Lab. de Biol. Animal.

<sup>4</sup> Biol. PESAGRO-Rio/Lab. de Biol. Animal.

<sup>5</sup> Méd.-Vet., Prof. UFF/Consultor, PESAGRO-Rio/Lab. de Biol. Animal.

Existem numerosas raças patogênicas de *E. coli* que são classificadas sorologicamente sobretudo por seus antígenos somáticos (O) e de superfície celular (K) (Corboz & Becker 1973, Castro et al. 1967, Renault 1978, Renault et al. 1977, Rojas & Prussinb 1978, Srivastava & Arya 1979, Talavera 1979). As cepas de *E. coli* patogênicas geralmente são hemolíticas, o que é salientado por Ugorsky et al. (1971), fundamentados em estudos sobre a colibacilose de bezerros.

As colibaciloses apresentam pelo menos quatro manifestações distintas e denominadas enterotóxicas, enterotoxêmicas, invasoras locais e septicêmicas. Na primeira forma, a bactéria, provida de patogenicidade, adere à mucosa do intestino e se multiplica sobretudo na luz do delgado, elaborando uma enterotoxina que incita a formação de abundante secreção de fluidos. A perda de líquidos na luz intestinal justifica a diarreia, a desidratação e mesmo a morte conseqüente. Na colibacilose enterotoxêmica, a bactéria, que prolifera no intestino delgado produz uma toxina, supostamente neuro-tóxica, a qual, absorvida, atua como um antígeno, determinando uma resposta vascular de hipersensibilidade. A forma invasora local, que aparentemente só é reconhecida no homem, é caracterizada pela penetração e destruição do epitélio intestinal à custa da bactéria, o que ocorre sobretudo à altura do cólon.

As formas septicêmicas, sem dúvida, por sua freqüência, as mais importantes no bezerro, são caracterizadas pela invasão do organismo pela *E. coli* através das vias umbilical, respiratória e digestiva, elaborando a bactéria em tais circunstâncias uma endotoxina provavelmente responsável pelas lesões. As alterações, via de regra, lembram aquelas produzidas por germes piogênicos quando atingem o organismo e se disseminam, ocorrendo assim, inflamação de serosas, artrites, pielonefrites e embolismo bacteriano. Os intestinos, em geral, estão poupados. Bezerros com deficiências de imunoglobulinas por privação do colostro são mais suscetíveis (Jones & Hunt 1983).

As diferentes formas clínicas da colibacilose têm sido identificadas em todos os países, independentemente de clima, estação e sexo (Jones & Hunt 1983). Os próprios animais saudáveis, bem como os doentes, são o reservatório das raças patogênicas de *E. coli*. Isso porque as cepas existentes na flora normal só passam a exercer ação patogênica quando se reproduzem de forma anormal, ou selecionam e transferem plasmídeos que passam a conferir ação patogênica (Kariuki 1977). A colonização do intestino dos animais por *E. coli* enteropatogênicas, mediadas, via de regra, por antígenos de aderência (adesinas), é um dos fatores essenciais na patogenia da colibacilose neonatal. (Leite et al. 1989).

Wray & Thomlinson (1974) relataram as lesões anatomopatológicas e histopatológicas, bem como os achados bacteriológicos em uma série de 25 bezerros que morreram de colibacilose: as lesões incluíram edema dos pulmões e do abomaso e enterite, variando um pouco a gravidade das mesmas. As cepas de *E. coli* foram isoladas da maioria dos bezerros e identificadas como sorotipos 015, 026, 035 e 078:K80, embora algumas cepas não pudessem ser tipadas. A forma septicêmica ocorreu em nove bezerros, enquanto em seis a *E. coli* encontrada nos intestinos. O microrganismo foi isolado dos intestinos e de outros órgãos, principalmente do baço.

O presente trabalho descreve os achados bacteriológicos e sorológicos, bem como as lesões histopatológicas da enfermidade, ao mesmo tempo que oferece subsídios sobre sua distribuição pelos meses do ano e incidência por faixa etária.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em investigações sobre doenças de bezerros no município de Cantagalo, foram realizadas 543 necrópsias, em animais no primeiro ano de vida, pertencentes a 117 propriedades.

O material destinado às pesquisas bacteriológicas era, após a necrópsia, recolhido em sacos de plástico e conservado em gelo. No laboratório eram procedidas sementeiras da medula óssea, do sangue do cora-

ção, do conteúdo da vesícula biliar, das fezes, dos macerados de fígado e baço, de pulmões, de rins, de cérebro e ocasionalmente do cordão umbilical. Os materiais eram semeados em meios aeróbios, anaeróbios e de enriquecimento, e incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, eram preparados esfregaços do crescimento e corados pelo método de Gram. O enriquecimento, em caldo tetrationato de bile, do macerado de rins e das fezes, para a pesquisa de enterobactérias, era plaqueado em ágar-eosina-azul de metileno (meio de Teague) e incubado a 37°C por 24 horas.

As colônias fermentadoras, que no meio de Teague apresentavam brilho metálico, foram semeadas no meio de triagem de Costa & Vernin (1955) e no meio de SIM, e incubadas por 24 horas. Essa análise bioquímica preliminar permite uma identificação presuntiva através das reações de motilidade, ação sobre a lactose, e/ou sacarose, produção de gás, produção de H<sub>2</sub>S, ação da urease e produção de indol.

As amostras suspeitas de *E. coli* foram analisadas bioquimicamente, utilizando-se o sistema API 20E, com incubação a 37°C por 24 horas.

Foram enviadas 13 cepas de *E. coli*, das 31 isoladas, para classificação sorológica no National Veterinary Service Laboratories (Ames, Iowa, USA).

Para estudos histopatológicos, segmentos de fígado, baço, rins, pulmões, encéfalo, coração e linfonodos foram fixados em solução de formol-salina a 20%, sendo em seguida processados pelas técnicas habituais de inclusão em parafina, cortados em micrótomo e corados pela hematoxilina-eosina.

## RESULTADOS

A colibacilose foi registrada em 31 animais (5,70%) de 19 propriedades. A infecção ocorreu em animais com idade compreendida entre 1 a 60 dias, recaindo um pouco mais naqueles com 1 a 10 dias de vida; em duas oportunidades a enfermidade foi comprovada em fetos com 6 a 8 meses de desenvolvimento (Fig. 1).

A incidência da moléstia foi maior nos meses de junho, julho e agosto e menor no trimestre compreendido entre janeiro e março (Tabela 1).

Do ponto de vista clínico, os animais apresentavam febre, diarreia, anorexia, distúrbios respiratórios, prostração e caquexia. Em três deles foram observados fenômenos nervosos,

caracterizados, respectivamente, por ataxia, paresia e cegueira.

A bactéria foi isolada, com maior frequência, do macerado de fígado e baço, seguindo-se em ordem decrescente o isolamento da cultura dos pulmões, sangue e fezes (Tabela 2).

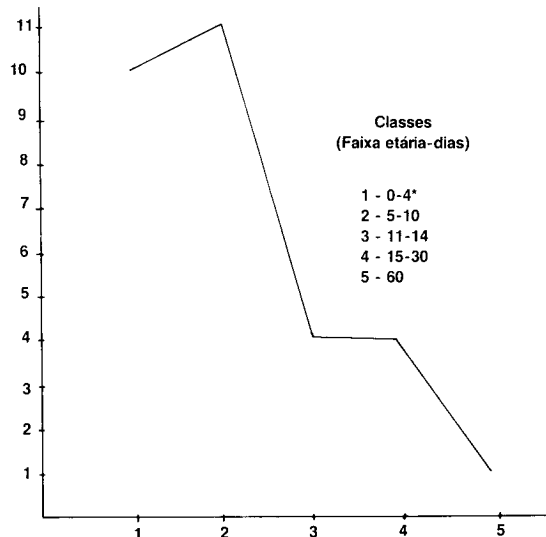


FIG. 1. Frequência de animais acometidos, por faixa etária-dias.

\* 2 fetos.

TABELA 1. Mortalidade dos bezerros em relação ao período de isolamento de *E. coli*.

Meses	Ano de ocorrência						Total	
	1978	1979	1980	1981	1982	1983	Nº	%
Jan	-	-	-	-	-	-	-	-
Fev	-	-	-	-	-	1	1	3,2
Mar	-	1	-	-	-	-	1	3,2
Abr	-	-	1	-	-	-	1	3,2
Mai	-	-	1	-	-	1	2	6,5
Jun	-	-	1	2	-	1	4	12,9
Jul	-	-	1	2	1	1	5	16,1
Ago	-	1	3	2	1	-	7	22,6
Set	-	-	-	-	-	1	1	3,2
Out	-	1	1	-	-	1	3	9,7
Nov	-	2	-	-	1	-	3	9,7
Dez	-	1	-	1	-	1	3	9,7
Total	-	6	8	7	3	7	31	100

Fonte: PESAGRO-RIO/LBA.

**TABELA 2. Distribuição das 31 amostras de *E. coli* de acordo com as fontes de isolamento. Cantagalo, RJ, 1978-1983.**

Fonte de Isolamento	Nº	%
Bile	6	19,4
Cordão umbilical	1	3,2
Fezes	22	70,9
Fígado e baço	27	87,1
Hemocultura	22	70,9
Medula óssea	16	51,6
Pulmões	23	74,1
Rim	8	25,8
Sistema nervoso central	1	3,2

Fonte: PESAGRO-RIO/LBA.

O comportamento bioquímico das 31 cepas isoladas revelou tratar-se de *E. coli*. As 13 cepas submetidas à classificação sorológica apresentaram oito diferentes sorotipos, distribuídos em oito propriedades distintas, sendo todas hemolíticas em ágar-sangue (Tabela 3).

Na histopatologia, os aspectos mais relevantes foram sinais de disseminação bacteriana por mecanismo metastático, observados em nove casos, evidenciando-se, em consequência, colônias de bactérias Gram negativas nos pulmões (quatro casos), nos rins (dois casos) e no cordão umbilical (um caso). Verificou-se uma vez a presença das bactérias nos pulmões e rins e no baço e rins simultaneamente. O microorganismo se alojava na luz de capilares (Fig. 2), nos tubos uriníferos (Fig. 3) e, às vezes, no seio de focos de necrose, não se podendo, em tais circunstâncias, estabelecer correlações com estruturas normais (Fig. 4).

Os processos supurativos de órgãos, representados por microabscessos, foram outra alteração de apreciável ocorrência. Tais focos inflamatórios, que foram assinalados em 13 casos, tinham as características comuns das microabscedações, aparecendo em quatro casos no fígado (Fig. 5), em três casos no baço (Fig. 6), três casos nos rins, três casos nos pulmões e uma vez no umbigo (Fig. 7). Em um caso,

**TABELA 3. Caracterização sorológica das cepas de *E. coli* isoladas de bezerras de diferentes propriedades. Catangalo, RJ, 1978-1983.**

Sorotipos	Propriedades	Cepas Classificadas
0128ab:K-:H51	a	1
09:K-:HNM	b	1
07:K16:H6	b	1
0119:K-:HNM	c-f	2
0141:K.:H16	c	1
0141:K99:H10	c	1
078:K80:HNM	d-e	2
08:K99:H4	e	1
021:K.:H <sub>2</sub>	e	1
RUGOSA	g-h	2
Total	8	13

Fonte: PESAGRO-RIO/LBA.

K- = não há presença de antígeno K.

K. = antígeno K presente, mas não identificado com o antisoro K "standard".

NM. = não móvel.

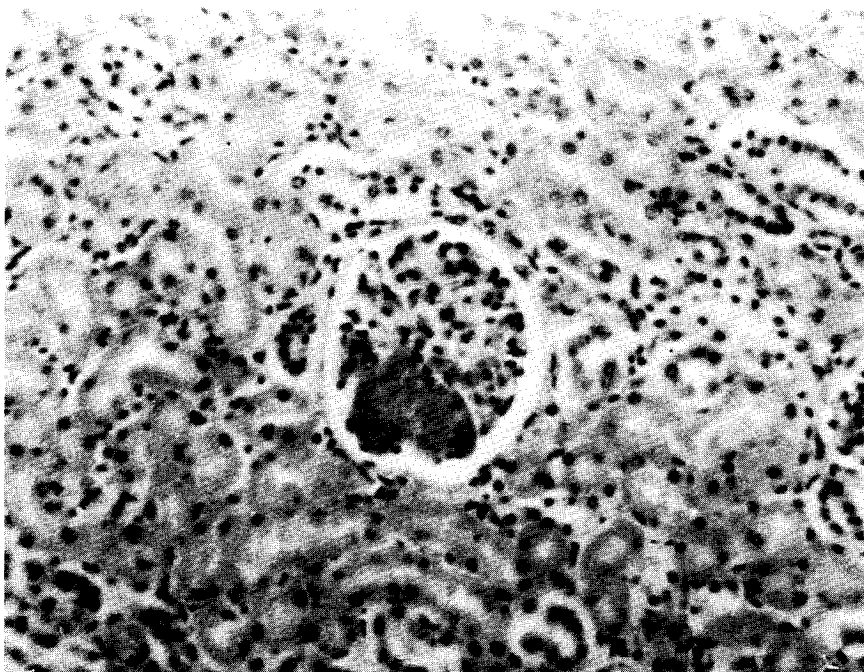
tais abscessos localizados no parênquima renal, associaram-se ao embolismo bacteriano glomerular, enquanto em outro os microabscessos, situados no parênquima do pulmão, aliavam-se à extensa colonização bacteriana tecidual.

Os microabscessos foram evidenciados sempre em um único órgão, exceto em um caso em que o processo inflamatório atingia simultaneamente os pulmões, os rins e o baço.

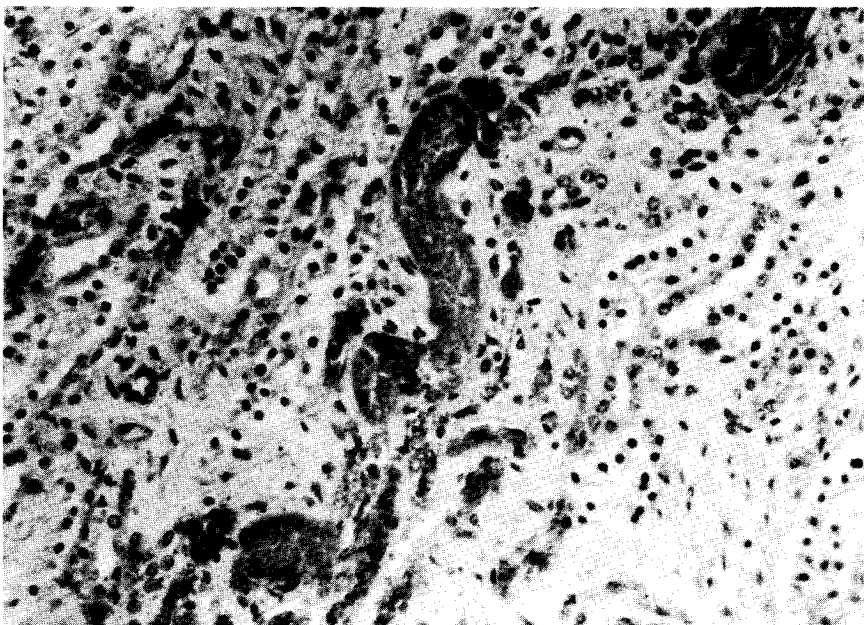
As onfaloflebites ocorreram com alguma frequência na enfermidade, e cinco animais da série estudada eram portadores do processo umbilical (16,13%). Os animais tinham entre 1 e 13 dias de vida. O exame microscópico dos cordões mostrava, ora acentuado edema (Fig. 8), ora infiltração neutrofílica difusa, surgindo, às vezes, abscedação ou colonização bacteriana da geléia de Wharton. Lesões de necrose da íntima de ramos da artéria umbilical, com abundantes figuras de cariorrexis, foram constatadas em uma oportunidade.

Os processos inflamatórios dos pulmões, caracterizados por pneumonias e pneumonites, foram evidenciados em seis animais. As pneumonias propriamente ditas foram enquadradas nas chamadas broncopneumonias catarrais e serocatarrais, surpreendendo-se um caso em que o processo se encontrava no estágio congestivo e um outro em que havia lesões incipientes de broncopneumonia purulenta. De outro lado, um episódio final da inflamação broncopulmonar, caracterizado por discreta fibrose do respectivo parênquima foi assinalado uma vez.

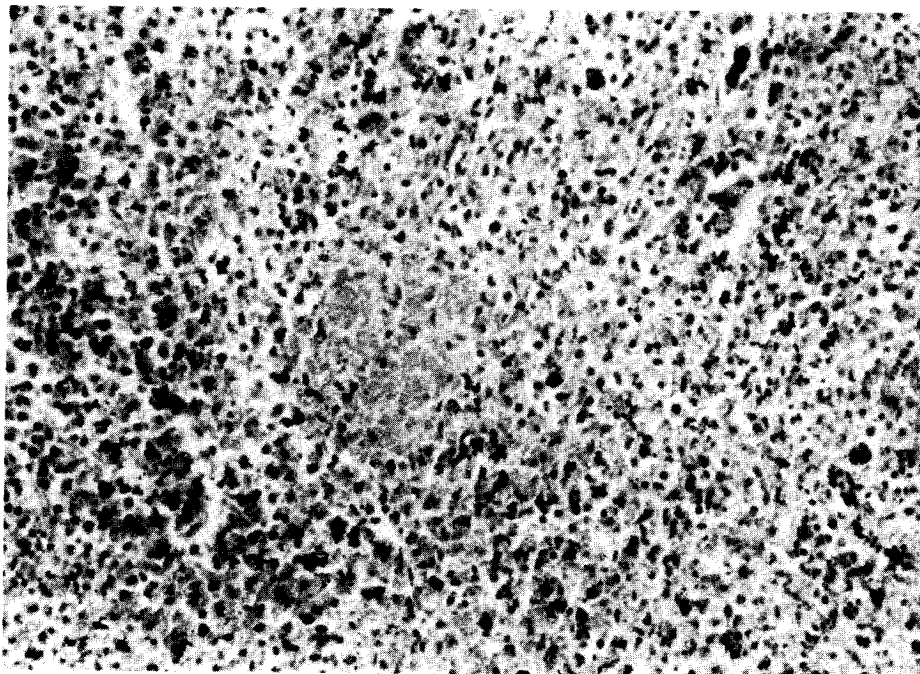
As pneumonites, que foram verificadas duas vezes, eram caracterizadas, em um caso, pela infiltração dos septos e paredes alveolares por células mononucleadas e, em outro, por neutrófilos. Como já foi apontado, abscessos e colonizações bacterianas de parênquima do órgão foram constatados.



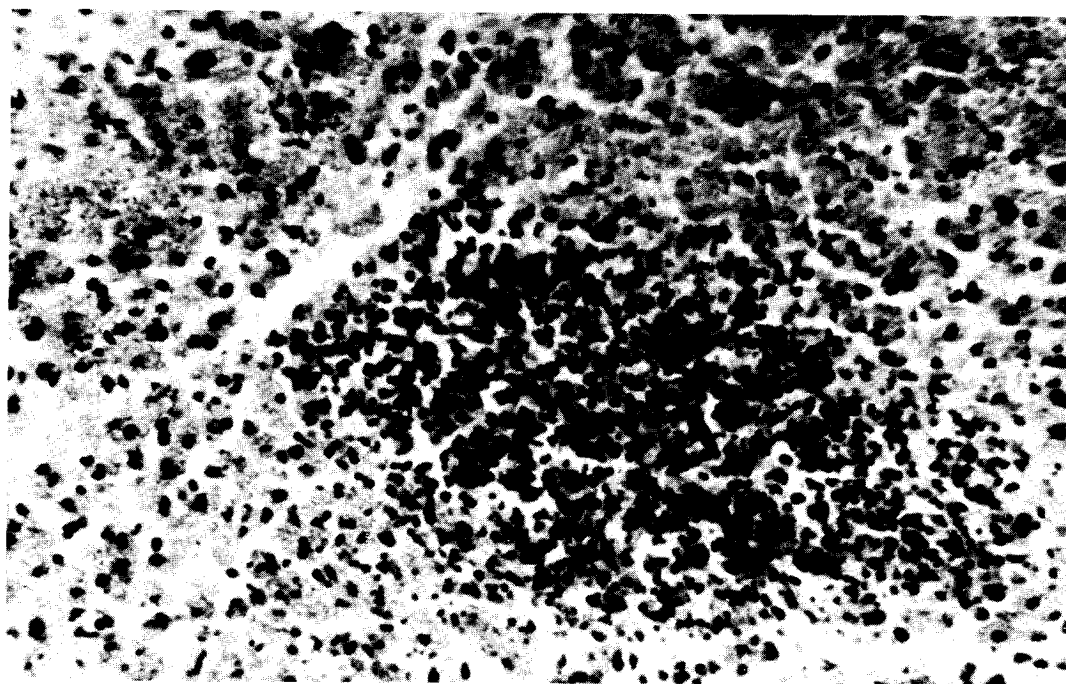
**FIG. 2.** Colônias bacterianas nos capilares glomerulares. Hematoxina-eosina. 16/0,40x8.



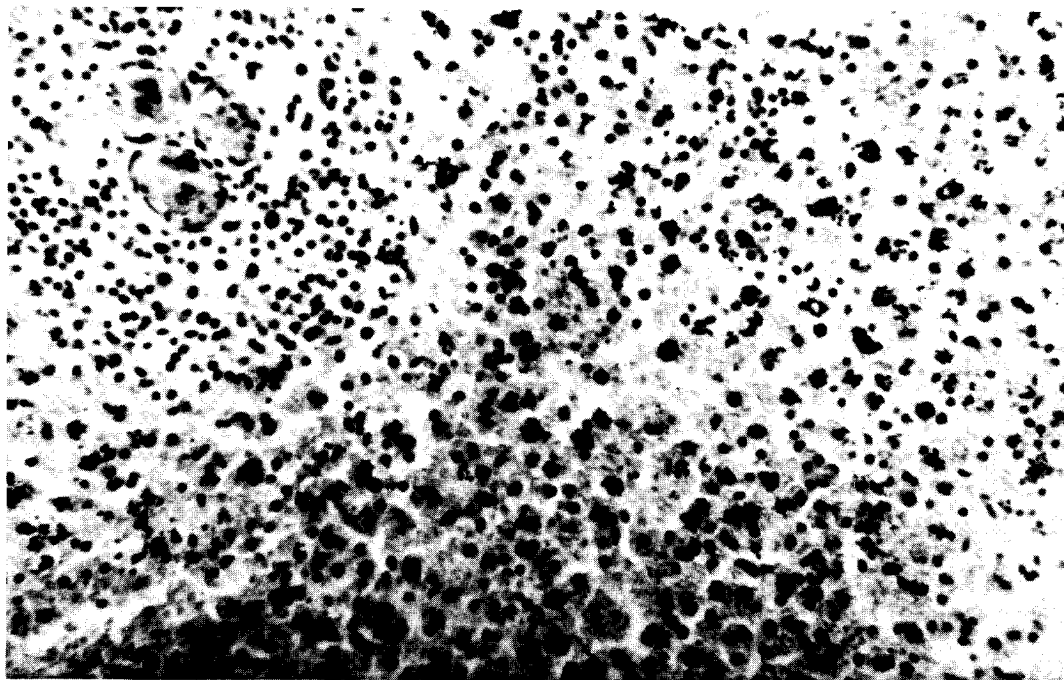
**FIG. 3.** Colônias bacterianas em tubos uriníferos. Hematoxilina-eosina. 16/0,40x8.



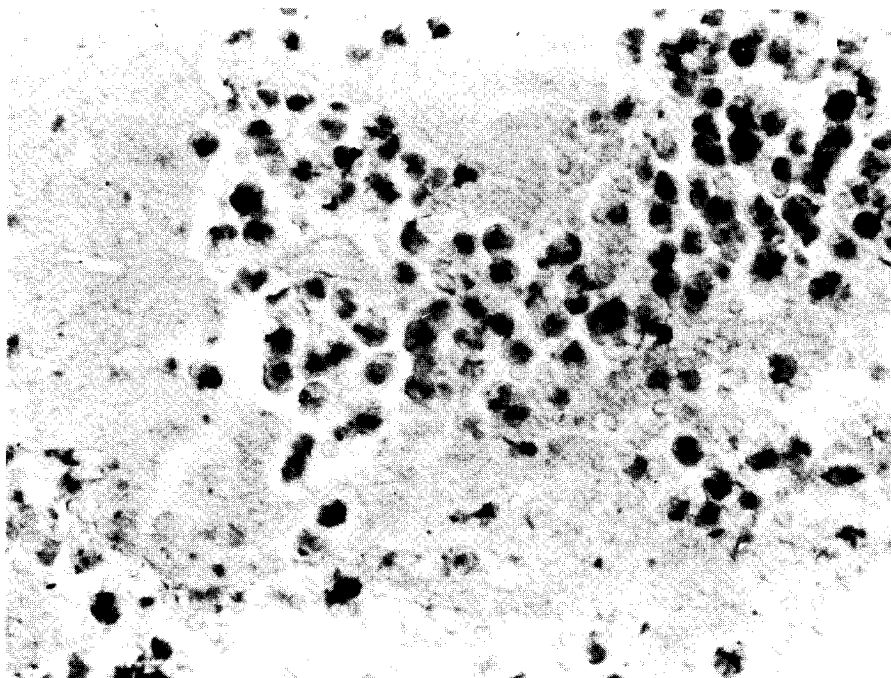
**FIG. 4.** Colônias bacterianas em foco de necrose do baço. Hematoxilina-eosina. 16/0,40x8.



**FIG. 5.** Microabscesso hepático. Hematoxilina-eosina. 16/0,40x8.



**FIG. 6.** Microabscesso esplênico. Hematoxilina-eosina. 16/0,40x8.



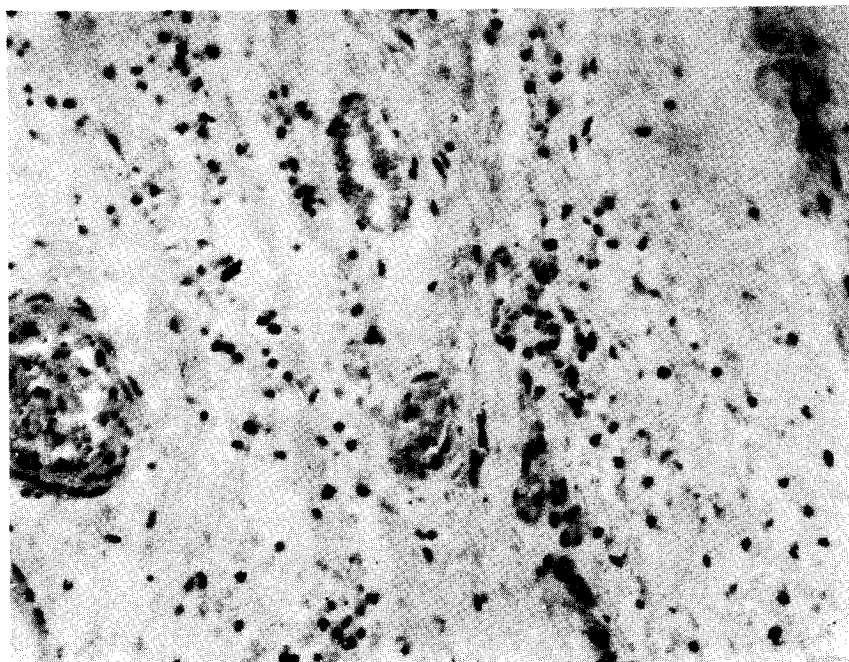
**FIG. 7.** Microabscesso do cordão umbilical. Hematoxilina-eosina. 40/0,75x8.

No fígado, a par da presença de microabscessos e da colonização por bactérias, foram comprovados três casos de inflamação intersticial e não purulenta do órgão (Fig. 9).

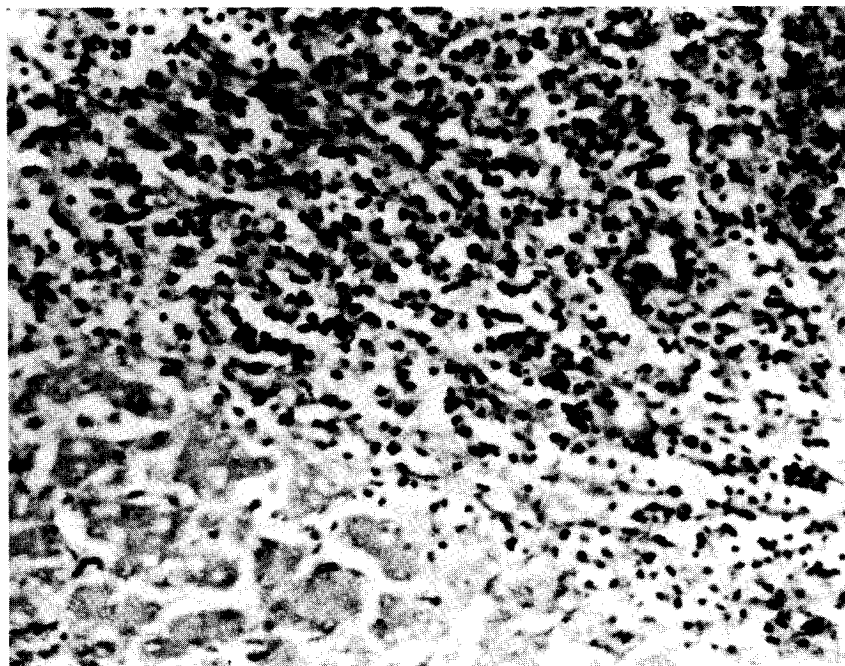
Nos órgãos hemolinfopoéticos, alteração digna de registro foi a de um certo despoamento de seus elementos linfocitários, com a conseqüente rarefação das estruturas linfóides, lesões observadas três vezes ao nível do baço e uma vez em linfonodo. A microabscedação do baço foi também encontrada, como já mencionado.

Os intestinos, quando examinados, não mostravam alterações microscópicas.

Em um animal que morrera no 6º dia de vida, não foram evidenciadas alterações histopatológicas nos diferentes órgãos. A ausência de lesões microscópicas foi também registrada em fetos portadores da infecção e abortados no 6º e 8º meses de desenvolvimento, respectivamente.



**FIG. 8.** Inflamação com abundante edema do cordão umbilical. Hematoxilina-eosina. 16/0,40x8.



**FIG. 9.** Inflamação intersticial não purulenta do fígado. Hematoxilina-eosina. 16/0,40x8.



Por fim, convém salientar a ocorrência da coartação da aorta, acompanhada de hipoplasia do ventrículo esquerdo em um animal com a infecção e que morreu após cinco horas de vida.

## DISCUSSÃO

Na primeira e segunda semana de vida, os bezerros podem morrer subitamente ou após algumas horas de evolução da enfermidade, caracterizada por febre, apatia e diarreia, que falta, via de regra, nas formas septicêmicas. A diarreia, quando presente, é aquosa, ligeiramente hemorrágica, ocorrendo, à necropsia, lesões congestivas ao nível do tubo digestivo (coagulador, intestino delgado e fígado) e dos pulmões. Petéquias sobre o epicárdio, congestão subaguda da zona medular da suprarenal e artrites são igualmente assinaladas (Renault et al. 1977).

A forma diarreica se subdivide em dois tipos: o enterotóxico e o entérico ou síndrome diarreica (Renault 1978). A forma enterotóxica acarreta a morte súbita do animal pela multiplicação de cepas enteropatogênicas e lesões do intestino delgado. Na forma entérica, os bezerros apresentam diarreia profusa amarelo-clara ou quase branca, com muitos coágulos lácteos e eventualmente com estrias de sangue. Em dois ou três dias ocorre a desidratação e pode haver uma fase final septicêmica. A possibilidade do envolvimento de citotoxina na diarreia de bezerros é sugerida por Yano et al. (1986), que encontraram a verocitotoxina (VT) em 63,7% das amostras estudadas.

A grande maioria dos casos ora estudados recai na forma septicêmica considerando-se expressivo isolamento do sangue (70,9%) e medula óssea (51,6%), com índices superiores aos obtidos por Wray & Thomlinson (1974) e Srivastava & Arya (1979). A bacteremia ficou bem caracterizada pelo isolamento frequente da *E. coli* de três ou mais tecidos do animal, ressaltando-se o isolamento do fígado e baço. O comprometimento do sistema nervoso central, também considerado por Wray &

Thomlinson (1974), foi assinalado em três animais, constatando-se uma encefalite bacteriana, de cujo cérebro foi isolada *E. coli* 0119.

As 13 cepas tipadas correspondem a nove grupos somáticos diferentes, todos considerados patogênicos para bovinos. Essa variabilidade dos grupos somáticos de cepas de *E. coli* foi observada por outros autores (Renault et al. 1977, Srivastava & Arya 1979).

O grupo somático 078, mais associado com a forma septicêmica (Corboz & Becker 1973), foi verificado em dois bezerros, sendo o único sorotipo que coincidiu com os resultados de Wray & Thomlinson (1974). Os grupos somáticos 08, 09, 021 e 0141, com capacidade enteropatogênica, foram identificados em quatro animais. O sorotipo 0119, associado com a forma entérica (Renault 1978) foi observado em dois animais.

A histopatologia mostrou claramente o caráter septicêmico de tais casos, enquadrados na classificação de Jones & Hunt (1983), constatando-se bactérias Gram negativas ao nível dos diferentes parênquimas, ocorrendo igualmente a microabscedação de diversos órgãos, ao lado de pneumonias, onfalites agudas e supurações renais. A ausência de alterações intestinais, verificada muitas vezes, é outro dado que até certo ponto corrobora a idéia de situar nas colisepticemias a maior parte dos casos investigados.

Wray & Thomlinson (1974) observaram lesões macroscópicas no cordão umbilical, com isolamento de *E. coli* de pus de abscesso, enquanto nessa pesquisa foram observadas lesões de microabscedações e presença de colônias de bactérias Gram negativas no cordão umbilical, com isolamento de *E. coli* de um caso.

A aplicação dessa pesquisa visa alertar os profissionais sobre a ocorrência de sorotipos patogênicos isolados de casos de colibacilose em bezerros em nossos rebanhos.

De acordo com a literatura consultada, essa é uma das poucas pesquisas que se fez no País, em relação às amostras de *E. coli* de origem bovina.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Billie O. Blackburn, Chefe do Setor de Sorologia do Laboratory Report, National Veterinary Services Laboratories de Ames, Iowa, USA, pela colaboração na identificação sorológica das amostras estudadas.

## REFERÊNCIAS

- CASTRO, A.F.P. de; GIORGI, W.; CAMPEDELLI FILHO, O.; SANTA ROSA, C.A. Isolamento e tipificação de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerras. **O Biológico**, v.33, p.67-73, 1967.
- CORBOZ, L.; BECKER, M. Étude sur la diarrhée néonatale du veau: activité entérotóxique d'*Escherichia coli* provenant de veaux morts de diarrhée. **Schweizer Archiv fuer Tierheilkunde**, v.115, p.149-159, 1973.
- COSTA, G.A.; VERNIN, C.S. Sobre uma modificação do meio de Monteverde. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.55, n.1, p.115-120, 1955.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D. Colibacillosis. In: **VETERINARY Pathology**. 5.ed. Filadélfia: Lea e Febiger, 1983. Cap. 10, p.604-606.
- KARIUKI, D.P. Antibiotic resistance and resistance factores in *Escherichia coli* isolated from scouring calves. **East African Medical Journal**, v.54, p.155-158, 1977.
- LEITE, D. da S.; GARCIA, M.; YANO, T.; CASTRO, A.F.P. de. Detecção da adesina Fy em amostras de *E. coli* isoladas de bezerras com diarréia no Brasil. **Revista de Microbiologia**, v.20, n.3, p.292-295, 1989.
- RENAULT, L. *Escherichia coli* infection of the calf. Diagnosis and new prospects of immunization. **Bulletin Mensuel de la Société Vétérinaire**, v.62, n.4, p.259-281, 1978.
- RENAULT, L.; PALISSE, M.; BONNET, Ph. Troubles gastro-intestinaux infectieux d'origine bacterienne. In: MORNET, P. et al. **Leveau**. Paris: Maloine, 1977. Parte 6, cap. 1, p.303-316.
- ROJAS, X.; PRUSSINB, H. Colibacillosis. I. Aislamiento, serotificación y pruebas de enteropatogenicidad de *E. coli* de origem fecal. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.10, n.2, p.145-148, 1978.
- SRIVASTAVA, N.C.; ARYA, S.C. *Escherichia coli* serotypes in calves. **Indian Veterinary Journal**, v.56, p.901-903, 1979.
- TALAVERA, A. Estudio de la estructura O-antigénica de cepas de *Escherichia coli* aisladas de heces fecales de terneros diarreicos de diferentes vaqueiras. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, v.10, n.1, p.33-36, 1979.
- UGORSKY, L.; MOLENDÁ, J.; ZALESINSKI, A. Participation of beta-hemolytic *Escherichia coli* in calf colibacterioses. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulaway**, v.15, n.1/2, p.14-16, 1971.
- WRAY, C.; THOMLINSON, J.R. Lesions and bacteriological findings in colibacillosis of calves. **British Veterinary Journal**, v.130, n.2, p.189-199, 1974.
- YANO, T.; TAMASHIRO, W.M. da S.C.; GARCIA, M.; CASTRO, A.F.P. de. Detecção de verocitotoxina (VT) em amostras de *E. coli* isoladas de bezerras com diarréia. **Revista de Microbiologia**, v.17, n.4, p.339-341, 1986.