

## DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA CONTRA COLIBACILOSE EM SUÍNOS

Rubiana Midori Anami\*

José Maurício Gonçalves dos Santos\*\*

Suelen Regina Ferreira\*\*\*

**RESUMO:** A colibacilose pode manifestar-se sob a forma de uma severa diarreia, dependendo das cepas bacterianas envolvidas - de maior ou menor patogenicidade -, do meio ambiente, do manejo geral e sanitário dos animais, da higiene e desinfecção das instalações, da imunidade da porca progenitora dos leitões e das características genéticas dos animais em questão. Foram coletadas amostras de diarreia em 31 leitões nas fases de maternidade e creche, em duas granjas nas regiões Norte e Noroeste do Paraná, para a produção de uma bacterina formolizada visando ao controle da colibacilose neonatal. As porcas do experimento foram vacinadas duas vezes - quatro e duas semanas antes do parto. Houve uma redução no percentual de leitões que apresentavam diarreia de 90% para 17% ( $P < 0,0001$ ), durante a primeira semana de vida. O uso de autovacina contra a colibacilose em leitões, administrada nas porcas durante a fase de gestação, mostrou-se eficiente na redução da incidência de diarreia neonatal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diarreia Neonatal; Leitão; Maternidade.

## DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A BACTERIN AGAINST COLIBACILLOSIS IN PIGS

**ABSTRACT:** The colibacillosis can manifest itself as severe diarrhea, depending on the bacteria involved - the more or less pathogenic -, the environment, the general management and animal health, hygiene and disinfection of the premises, the immunity of the mother of the piglets and genetic characteristics of the animals in question. Samples were collected from 31 piglets' diarrhea during the maternity and nursery on two farms in North and Northwest Paraná, to produce the formolized bacterin aimed to control the neonatal colibacillosis. The mother pigs of the experiment were vaccinated twice - four and two weeks before giving birth. There was a reduction in the percentage of piglets which had diarrhea from 90% to 17% ( $P < 0,0001$ ) during their first week of life. The use of auto vaccination against colibacillosis in piglets, managed in the mother pigs during its pregnancy that has proved the effective reduction on the incidence of neonatal diarrhea.

**KEYWORDS:** Neonatal Diarrhea; Piglets; Maternity.

## INTRODUÇÃO

A moderna suinocultura industrial vem promovendo ao longo dos anos uma verdadeira revolução em toda a cadeia de produção de suínos. Vários foram os ganhos obtidos tanto no desempenho dos animais, devido ao melhoramento genético e ao aprimoramento do conhecimentos sobre a nutrição e sanidade, bem como sobre ambiência, instalações e reprodução.

Não obstante, há ainda vários desafios a serem vencidos em todos os setores da produção de suínos, em que, mesmo com o uso das mais modernas ferramentas disponíveis, ainda nos deparamos

eventualmente com problemas que, quando não adequadamente combatidos, insistem em manifestar-se.

Dentre esses problemas, as doenças que afetam os leitões nas fases de maternidade e creche merecem atenção especial. Por serem ainda animais jovens e bastante sensíveis, os problemas sanitários que se manifestam nessas duas fases podem ter um efeito devastador no desempenho subsequente dos animais. Entre essas doenças, sem dúvida as diarreias possuem um papel importantíssimo.

As diarreias, assim como outras doenças que acometem o trato digestório dos suínos, são multifatoriais, ou seja, além do agente causador

\* Médica Veterinária pelo Centro Universitário de Maringá - CESUMAR; Ex Bolsista Probioc-CESUMAR. E-mail: rubsrebs@pop.com.br

\*\* Orientador e Docente Doutor dos Cursos de Medicina Veterinária e CST - Agronegócio do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR; Médico Veterinário. E-mail: jmgds@cesumar.br

\*\*\* Co-orientadora da Pesquisa; Médica Veterinária do Abatedouro Coroaves Ltda. E-mail: suelen@coroaves.com.br

do problema em questão, existem outros fatores predisponentes que merecem atenção, como, por exemplo, imunidade passiva e ativa, temperatura e amplitude térmica no interior das instalações, umidade, gases, qualidade da ração, tamanho de lotes e tipos de manejo realizados.

Assim sendo, como uma das ocorrências mais comuns desses problemas tem-se a colibacilose em suínos, tanto neonatos como no pós-desmame, a qual é uma infecção intestinal de leitões com cepas patogênicas de *Escherichia coli* (*E. coli*).

### 1.1 COLIBACILOSE EM SUÍNOS

A colibacilose pode manifestar-se sob a forma de uma severa diarreia, dependendo das cepas bacterianas envolvidas - que podem apresentar maior ou menor patogenicidade -, do meio ambiente, do manejo geral e sanitário dos animais, da higiene e desinfecção das instalações, da imunidade da porca progenitora dos leitões e das características genéticas dos animais em questão.

### 1.2 CARACTERIZAÇÃO DA *E. coli*

A *E. coli*, é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Foi inicialmente descrita pelo médico pediatra alemão Theodor Escherich, que chamou esse microorganismo de *Bacterium coli commune*. É um habitante normal do trato intestinal dos suínos, assim como de todos os outros animais. A espécie *E. coli* é composta por bactérias que possuem caracterização bioquímica semelhante, mas são separadas em grupos baseando-se na associação com diferentes tipos de doença e hospedeiros, composição antigênica, perfil plasmidial, produção de hemolisinas e colicinas, polimorfismo enzimático e padrão de susceptibilidade a bacteriófagos (LIOR, 1994).

Essa bactéria possui os antígenos O (somático), K (capsular) e H (flagelar). Além destes, nas cepas de *E. coli* que acometem os suínos são muito importantes as fímbrias ou antígeno F, sendo os mais importantes e prevalentes a F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987) e F41. Esses antígenos são extremamente importantes, pois permitem a classificação das diferentes cepas de *E. coli* por sorotipagem, que é um método bem estabelecido e amplamente utilizado (LIOR, 1994).

Também apresentam produção das toxinas termolábil (LT), com alto peso molecular e imunogênica, e termoestável (ST), de baixo peso molecular e não-imunogênica. Outra característica importante é a presença de material genético na forma de plasmídeos, sendo a presença da fímbria F4 e a produção de hemolisina codificadas pelo mesmo plasmídeo.

As fímbrias e as toxinas estão classificadas como fatores de virulência entre outros que a *E. coli* possui. As diferentes fímbrias permitem que a *E. coli* possa realizar a adesão junto aos enterócitos (GYLES, 1994; SMITH; MARRON; SMITH, 1994). É importante salientar que a *E. coli* pode

infectar outros sistemas, como o urogenital o nervoso, e até mesmo causar septicemia (SMITH; MARRON; SMITH, 1994).

### 1.3 PROFIXALIA DA COLIBACILOSE

A ocorrência da colibacilose nas produções de suínos é freqüente e de gravidade variável, podendo levar à formação de animais-refugos e até mesmo a um aumento no índice de mortalidade, devido à debilitação dos animais (SOBESTIANSKY et al., 1999). Uma vez manifestada a colibacilose, com certeza haverá gastos envolvidos, seja no tratamento, seja na prevenção.

Preocupar-se somente com o tratamento com antimicrobianos, definitivamente, não é única nem a melhor medida a ser tomada. A manifestação clínica da doença pode se dar de forma mais amena ou mais severa, dependendo da quantidade de fatores de risco envolvidos, da cepa de *E. coli* que está presente e da dose infectante (SILVA; BRITO; MORES, 1995; SOBESTIANSKY, et al. 1999). Portanto, até que o tratamento adequado seja instaurado e se atinja o resultado, isto é, a resolução da diarreia, o desempenho do animal poderá sofrer algum comprometimento (FAIRBROTHER, 1999; SOBESTIANSKY et al., 1999).

Assim, a prevenção, embora também possa envolver alguns custos, é uma estratégia que não pode ser descartada ou deixada em segundo plano, devendo ser adotada não somente para o controle das diarreias, mas também para todas as outras doenças que possam vir a prejudicar o sistema de produção de suínos. Dentre as medidas preventivas que podem ser tomadas, a vacinação dos animais é uma prática que pode se tornar bastante efetiva, quando adequadamente utilizada.

Os esquemas vacinais propostos pelas empresas que produzem e comercializam as vacinas contra a colibacilose neonatal dos leitões (FORTDODGE, 2005; PFIZERL, 2005) indicam a vacinação das fêmeas durante a gestação:

- em duas doses, na primeira vacinação (quatro e duas semanas antes do parto); ou,
- uma dose no caso de revacinação (duas semanas antes do parto).

O uso de duas doses em um primeiro contato visa estimular uma maior resposta imunológica, e após esta, uma única dose a cada ciclo reprodutivo na fase final de gestação é suficiente para se obter uma resposta adequada.

Além do uso de vacinas inativadas comerciais (bacterinas), é possível produzir autovacinas. A autovacina consiste em elaborar, no caso da colibacilose, uma bacterina a partir das cepas bacterianas que estejam causando problemas específicos em determinado local, ou seja, uma granja produtora de suínos ou uma região. Como característica interessante, a bacterina apresenta, no todo ou em parte, os mesmos antígenos que estão causando o problema em uma dada situação. Isso pode proporcionar uma resposta imune mais adequada para cada caso.

Como ponto limitante, os efeitos de uma autovacina podem não ser satisfatórios fora da granja ou região onde foi produzida.

Já uma vacina comercial, produzida com uma maior quantidade de amostras e cepas bacterianas, tende a ser mais efetiva em situações diversas.

O objetivo deste experimento foi a produção de uma autovacina contra a colibacilose como alternativa à compra de produtos comerciais, com vista a somar esforços no controle dessa diarreia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL

As coletas de material foram realizadas em duas granjas produtoras de suínos, em ciclo completo, localizadas no Estado do Paraná: uma no município de Rancho Alegre, situado na Região Norte, com um plantel de 45 matrizes, e a outra no município de Maringá na Região Noroeste, com um plantel de 1.000 matrizes.

### 2.2 ANIMAIS

Foram utilizados 31 leitões com diarreia, nas fases de maternidade e creche, com idades variando entre 07 e 35 dias, sendo coletadas, através de *swab* retal, amostras de fezes diarreicas, uma de cada leitão (BORDIN, 1992).

### 2.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

#### 2.3.1 Isolamento bacteriano

O material coletado foi enviado para isolamento bacteriano e caracterização bioquímica no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Maringá/PR – CESUMAR. Como procedimentos laboratoriais para o exame microbiológico foi primeiramente realizada a semeadura direta, sem enriquecimento, em meio de cultura sólido (ágar MacConkey); e após um período de 24 horas, à temperatura de 37°C, foi observado o crescimento bacteriano. As amostras com resultado negativo, ou seja, sem crescimento, foram descartadas, e as positivas foram ressemeadas em novas placas com o mesmo tipo de Agar, para a obtenção de colônias bacterianas isoladas.

#### 2.3.2 Caracterização bioquímica

Vinte e quatro horas após a segunda semeadura foi feita a leitura das placas, tendo-se verificado que todas apresentaram crescimento com colônias isoladas. Sequencialmente foram realizadas as semeaduras

para a caracterização bioquímica em meio TSI (*triple sugar iron*), meio LIA (*lysine-iron agar*), meio SIM (*sulphide indol motility*) e meio citrato (ágar citrato de Simmons), as quais foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C, durante um período de 24 horas.

### 2.4 PRODUÇÃO DA BACTERINA

Após o resultado do teste bioquímico, 20 colônias de *E. coli*, obtidas a partir das 31 amostras iniciais de fezes diarreicas foram selecionadas para a produção da bacterina.

#### 2.4.1 Crescimento bacteriano

Cada amostra de *E. coli* foi submetida a crescimento *over night* em estufa à temperatura de 37°C, após a semeadura em tubos de ensaio com 12mL de caldo TSB (*tryptic soy broth*). O crescimento foi confirmado através da turvação do caldo e formação de sedimento.

#### 2.4.2 Inativação bacteriana e teste de esterilidade

Posteriormente ao crescimento em caldo TSB, cada uma das amostras foi submetida a um processo de inativação, através da adição de formaldeído (com concentração final de 0,5%) aos tubos de ensaio, seguido de homogeneização com o uso de um agitador vortex, sendo o material mantido por uma hora em estufa à temperatura de 37°C.

Após esse procedimento foi realizado o teste de esterilidade, que consistiu em fazer a semeadura de uma alíquota de cada um dos tubos de ensaio em ágar sangue durante um período de 24 horas, em estufa à temperatura de 37°C. Nenhuma das amostras apresentou crescimento bacteriano nas placas de cultivo, obtendo-se então, com esse resultado negativo, a sua esterilidade.

#### 2.4.3 Envasamento da bacterina

Terminados todos os procedimentos de crescimento, isolamento e caracterização bacterianos, seguidos da confirmação da esterilidade das amostras, foi realizado o processo de envase. Essa etapa da produção da bacterina foi feita com o auxílio de um aparelho de fluxo laminar horizontal. Para o envase foram utilizados frascos de vidro esterilizados, sendo acondicionados 18mL em cada recipiente. A vacina foi obtida através da ressuspensão de cada amostra em seu respectivo tubo de ensaio, utilizando-se um agitador vortex. Posteriormente, todas as amostras foram acondicionadas em um frasco do tipo *Erlenmeyer*, mantido em constante agitação para garantir a homogeneidade do seu conteúdo, obtendo-se dessa forma um *pool* das 20 amostras. Com isso foi envasada a bacterina em frascos de vacina para aplicação em uma das granjas

## 2.5 ACONDICIONAMENTO, ESQUEMA VACINAL E MODO DE USAR A BACTERINA

Após o envase os frascos com a vacina produzida foram mantidos sob refrigeração de 2 a 8°C, ao abrigo da luz solar. O período de validade sugerido para a bacterina foi de 6 meses.

Para proteger os leitões contra a colibacilose neonatal através de imunidade passiva, o esquema vacinal proposto para as porcas neste experimento seguiu o mesmo já recomendado para as vacinas comerciais existentes no mercado. Como não era utilizada nenhuma vacina na granja em que a bacterina experimental foi testada, tanto marrãs como porcas foram submetidas, na primeira vacinação, a duas doses de bacterina, sendo a primeira realizada quatro semanas antes do parto e a segunda dose duas semanas antes do parto, objetivando um efeito *booster* na produção de anticorpos com essa segunda aplicação.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variável “manifestação clínica de diarreia” foi submetida à análise pelo programa estatístico SAS (2000), pelo procedimento *Interactive Data Analysis*, adotando-se a distribuição binomial dos dados para essa variável.

## 3 RESULTADOS

Houve crescimento de 21 amostras que foram avaliadas na caracterização bioquímica, sendo os resultados apresentados na Tabela 1 (na coluna ao lado).

Durante a avaliação experimental foram utilizadas vinte porcas, das quais dez foram submetidas à vacinação no esquema proposto e as demais foram utilizadas como controle. As porcas submetidas à vacinação estavam em boas condições corporais e nutricionais, não manifestando alteração clínica alguma que sugerisse doença ou contra-indicação à imunização ativa. Por não se fazer uso de nenhum tipo de adjuvante, a dose utilizada foi de 3mL, proporcionando uma maior quantidade de antígenos ao sistema imune. Quanto à administração, a dose foi aplicada por via intramuscular profunda com uso de agulhas 40x12 (18 G 1 ½), na face posterior de um dos membros pélvicos da porca. Nenhum dos animais apresentou anorexia nem aborto após a vacinação.

Quanto à manifestação clínica de diarreia, houve uma redução no percentual de leitões que apresentavam esse problema de 90% para 17% ( $P < 0,0001$ ), durante a primeira semana de vida. Embora não tenha sido feita avaliação estatística, houve também uma redução na severidade da diarreia, verificando-se uma maior rapidez na sua resolução e uma menor debilitação dos leitões acometidos no grupo nascido de porcas vacinadas.

**Quadro 1.** Resultados da caracterização bioquímica de amostras de *Escherichia coli* provenientes de leitões com diarreia.

Amostra	TSI <sup>1</sup>	LIA <sup>2</sup>	SIM <sup>3</sup>	Citrato <sup>4</sup>
1	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo	Negativo
2	Amarelo	Positivo/Gás	Móvel/Positivo	Negativo
3	Amarelo	Positivo/Gás	Móvel/Positivo	Negativo
4	Amarelo	Positivo/Gás	Móvel/Positivo	Negativo
5	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo	Negativo
6	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo/H <sub>2</sub> S	Negativo
7	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo/H <sub>2</sub> S	Negativo
8	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo/H <sub>2</sub> S	Negativo
9	Amarelo	Positivo	Positivo	Negativo
10	Amarelo	Positivo	Positivo	Negativo
11	Amarelo/H <sub>2</sub> S	Negativo	Positivo/H <sub>2</sub> S	Negativo
12	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo/H <sub>2</sub> S	Negativo
13	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo	Negativo
14	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo	Negativo
15	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo	Negativo
16	Amarelo	Positivo	Móvel/Positivo	Negativo
17	Amarelo/H <sub>2</sub> S	Positivo	Móvel/Negativo/H <sub>2</sub> S	Negativo
18	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
19	Negativo	Positivo	Móvel/Negativo	Negativo
20	Amarelo	Positivo	Positivo	Negativo
21	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

Legenda: 1 TSI (*triple sugar iron*); 2 LIA (*lysine-iron agar*); 3 SIM (*sulphide indol motility*); 4 citrato (agar citrato de Simmons).

## 4 DISCUSSÃO

Dois dos primeiros experimentos, também realizados em condições de campo no início do uso da vacinação contra a colibacilose, mostraram resultados positivos da vacinação. O primeiro deles, de Ward e Bigland (1976), demonstrou através dos resultados que uma única dose de bacterina inativada por formalina possibilitou a redução do número de animais com diarreia, assim como no presente estudo, além de diminuir a mortalidade. O segundo trabalho, de Rozemond (1976), encontrou resultados similares, entretanto o autor relatou a incidência de 0,5% de aborto nas fêmeas vacinadas dentro de três dias após a vacinação. Tal ocorrência não foi evidenciada neste estudo com autovacina.

A redução da ocorrência da diarreia observada nos leitões filhos de porcas vacinadas também foi observada nos resultados obtidos por Barman e Sarma (1999), que submeteram leitões oriundos ou não de porcas vacinadas contra cepas de *E. coli* F4ac a desafio sete dias após o parto. Dos leitões vacinados, 33,33% apresentaram uma diarreia moderada, enquanto todos os leitões não vacinados apresentaram diarreia profusa, com elevada mortalidade. O que é diferente do estudo aqui apresentado com o uso de autovacina é que os leitões não foram desafiados, mas apenas mantidos nas mesmas condições de controle ambiental e nutricional.

O uso da vacina também evitou a manifestação clínica da colibacilose nos leitões filhos de fêmeas de primeiro parto que haviam sido vacinadas duas vezes durante a gestação quanto eram marrãs (NAGY; MACKENZIE; PAINTER, 1985). Estes mesmos autores também observaram que os leitões da segunda leitegada também foram protegidos, mesmo tendo sido aplicada apenas uma dose de vacina na segunda gestação. Em concordância com os dados desse experimento, Nagy, Mackenzie e Painter (1985) observaram uma elevada redução da morbidade da colibacilose. De forma complementar, esses autores também observaram redução da mortalidade dos leitões durante a fase de maternidade.

A imunidade passiva recebida pelos leitões através do colostro e do leite não é totalmente eficiente em expelir a *E. coli* pelas fezes. Cepas dessa bactéria com antígeno fimbrial F4ab e F4ac tendem a sofrer uma redução na eliminação pelas fezes, enquanto as cepas F5 e F6 não sofreram alteração na excreção, ou seja, diminuição (NAGY; MACKENZIE; PAINTER, 1985).

O fato de normalmente alguns leitões filhos de porcas vacinadas ainda apresentarem diarreia pode estar relacionado à baixa ingestão de colostro e leite, e principalmente à demora na ingestão de colostro logo após o parto, pois pode permitir a colonização das ilosidades intestinais pela *E. coli* (ALEXANDER, 1994). Além disso, os fatores de risco, que são na verdade fatores predisponentes para a manifestação clínica da colibacilose, devem ser combatidos, pois mesmo uma imunidade passiva adequada pode não ser suficiente em situações extremas como, por exemplo elevada umidade no piso, alta dose infectante e inadequado controle de temperatura, que permite elevada amplitude térmica diária (ALEXANDER, 1994; SILVA; BRITO; MORES, 1995; SOBESTIANSKY et al., 1998; 1999; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2001).

## 5 CONCLUSÃO

O uso de autovacina contra a colibacilose em leitões, administrada nas porcas durante a fase de gestação, mostrou-se eficiente na redução da incidência de diarreia na fase de maternidade.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, T. J. L. Neonatal Diarrhoea in Pigs. In: GYLES, C.L. **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 151-170.

BARMAN, N. N.; SARMA, D. K. Passive immunization of piglets against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with K88ac pili bearing bacterins. **Indian J Exp Biol.**, v. 37, n. 11, p. 1132-1135, nov. 1999.

BORDIN, E. L. **Contribuição ao Diagnóstico em Patologia Suína: Coleta de Material**. 2. ed. rev. e amp. São Paulo: Roca, 1992.

FAIRBROTHER, J. M. Neonatal *Escherichia coli* diarrhea. In: STRAW, B. E. et al. **Diseases of Swine**. 8. ed. Iowa: Iowa State University Press; Ames, 1999. p. 433-441.

FORTDODGE. Disponível em: <<http://www.fortdodge.com.br>>. Acesso em: 20 maio 2005.

GYLES, C. L. *Escherichia coli* enterotoxins. In: GYLES, C. L. **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 337-364.

LIIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 31-72.

NAGY, L. K.; MACKENZIE, T.; PAINTER, K. R. Protection of the nursing pig against experimentally induced enteric colibacillosis by vaccination of dam with fimbrial antigens of *E. coli* (K88, K99 and 987P). **Vet Rec.**, v. 117, n. 16, p. 408-413, 19 Oct. 1985.

PFIZER. Disponível em: <[http://www.pfizersaudeanimal.com.br/sui\\_produtos\\_litterguard.asp](http://www.pfizersaudeanimal.com.br/sui_produtos_litterguard.asp)>. Acesso em: 20 maio 2005.

ROZEMOND, H. *E. coli* enterotoxigenicosis in unweaned piglets. IV. Evaluation of results obtained on using an adjuvant vaccine in the field. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 101, n. 9, p. 481-490, 1 May 1976.

SAS INSTITUTE INC. **Statistical Analysis System**. Versão 8.0. Cary, NC: [S. n.], 2000.

SILVA, C. A.; BRITO, B. G.; MORES, N. Fatores de risco responsáveis pelo aparecimento de diarreias pré-desmame em granjas suínolas no norte do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, VII, 1995, Blumenau-SC. **Anais...** Blumenau-SC: [S. n.], 1995. p. 85.

SMITH, C.J.; MARRON, M.; SMITH, S.G.J. Fimbriae of *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L. **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 399-435.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e Patologia Suína**. Goiânia, GO: Art 3, 1999.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Suinocultura Intensiva: Produção, Manejo e Saúde do Rebanho**. Brasília: Embrapa, 1998.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. **Clínica Veterinária em Sistemas Intensivos de Produção de Suínos e Relatos de Casos Clínicos**. Goiânia: Art3, 2001.

WARD, G. E.; BIGLAND, C. H. Use of a formalin-treated, live *Escherichia coli* vaccine in the prevention of neonatal enteric colibacillosis in swine. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 168, n. 4, p. 317-318, 15 Feb. 1976.