

## PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA (ST) E *Salmonella* sp EM BEZERROS NO AGRESTE MERIDIONAL DE PERNAMBUCO<sup>1</sup>

Carla Lopes de Mendonça<sup>2</sup>, Norma dos Santos Lázaro<sup>3</sup>, Roberto Soares de Castro<sup>4</sup>, José Augusto B. Afonso<sup>5</sup> e Ernesto Hofer<sup>6</sup>

ABSTRACT.- Mendonça C.L., Lázaro N.S., Castro R.S., Afonso J.A.B. & Hofer E. 1996. [Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* sp in calves in the southern agreste region of the State of Pernambuco, Brazil.] Ocorrência de *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sp em bezerros no agreste meridional de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 16(4):127-131. Clínica de Bovinos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor s/n, Garanhuns, Pernambuco 55290-000, Brazil.

The diarrheic processes caused by pathogenic enterobacteria are of great economic-sanitary importance, with limiting effects on cattle raising. In the present study 106 fecal samples from 52 diarrheic and 54 non-diarrheic calves aged 1 to 90 days were analyzed, in order to determine the occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Salmonella* sp among calves reared in the agreste region of the state of Pernambuco and to determine the behavior of the isolates in response to 16 antimicrobial agents. The strains were cultured in selective media and submitted to biochemical characterization, serologic identification and detection of heat-stable enterotoxin. *E. coli* was isolated from all 106 calves studied and five of these strains (4,7%) were producers of heat-stable enterotoxin. *Salmonella* sp was isolated from six (5,7%) samples belonging to serovars Dublin, Muenchen and Infantis. The *Salmonella* strains were highly sensitive to the drugs tested, whereas the *E. coli* strains were more resistant to tetracycline (50,9%), sulfonamide (40,6%), streptomycin (35,9%) and ampicillin (22,6%). Particularly outstanding in the general analysis was the multiresistance of *E. coli* (52,0%), with a predominance of the tetracycline-sulfonamide association. The present results serve as a warning regarding the indiscriminated use of antimicrobial agents. Low percentages of ETEC and *Salmonella* in calves show the necessity of other diagnostic procedures to clarify the etiology.

INDEX TERMS: Diarrhea, calves, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 11 de novembro de 1996.

<sup>2</sup> Clínica de Bovinos, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Bom Pastor s/n, Garanhuns, PE 55290-000. Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional, CNPq (301426/910).

<sup>3</sup> Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970.

<sup>4</sup> Depto Medicina Veterinária, UFRPE, Av. D. Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-030.

<sup>5</sup> Clínica de Bovinos, UFRPE.

<sup>6</sup> Depto Bacteriologia, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ 21045-900.

SINOPSE. Os processos diarréicos acarretados por enterobactérias patogênicas têm sido incriminados como de grande importância econômica-sanitária, desempenhando um papel limitante na criação de bezerros. Com o objetivo de estudar a ocorrência de *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sp em bezerros no agreste meridional de Pernambuco e o comportamento dos isolados frente aos antimicrobianos, foram analisadas 106 amostras fecais provenientes de 52 bezerros diarréicos e 54 não diarréicos de 1 a 90 dias de idade. O cultivo das amostras foi realizado em meios seletivos com posterior caracterização bioquímica, identificação sorológica e detecção de

enterotoxina termoestável. Para verificação do comportamento dos isolados, foram selecionados 16 antimicrobianos. *E. coli* foi isolada dos 106 bezerros estudados, sendo cinco (4,7%) produtoras de enterotoxina termoestável e, *Salmonella* isolada de seis (5,7%) amostras pertencentes aos sorovares Dublin, Muenchen e Infantis. As amostras de *Salmonella* demonstraram uma elevada sensibilidade frente as drogas testadas, enquanto que as de *E. coli* revelaram maior resistência à tetraciclina (50,9%); sulfonamida (40,6%); estreptomicina (35,9%) e ampicilina (22,6%). No cômputo geral destaca-se a multiresistência de *E. coli* (52%), predominando a associação tetraciclina-sulfonamida. Face aos resultados auferidos adverte-se quanto ao uso indiscriminado de antimicrobianos. Os baixos percentuais de ETEC e *Salmonella* salientam a necessidade de outros procedimentos de diagnóstico visando esclarecer a etiologia das diarreias.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Diarreia, bezerros, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp.

## INTRODUÇÃO

A infecção do trato intestinal é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em bezerros, sendo responsável por sérios prejuízos à pecuária. Sua etiologia é complexa e multifatorial onde fatores ambientais, nutricionais, imunológicos e agentes infecciosos tais como bactérias, vírus e protozoários, estão envolvidos (Allen & White 1985). Dentre os patógenos bacterianos causadores de diarreia neonatal, destacam-se a *Salmonella* e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). No entanto, salienta-se a participação de *Clostridium perfringens*, *Campylobacter spp* (Charles & Furlong 1992) e mais recentemente, *E. coli* verotoxigênica e *E. coli* necrotoxigênica (Blanco et al. 1993).

A infecção por *Salmonella* caracteriza-se pelo aspecto septicêmico, acompanhado ou não de processo diarreico, ou por uma enterite localizada, acometendo principalmente animais jovens (Anderson & Blanchard 1989). A diarreia neonatal, tendo como modelo representativo a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), caracteriza-se clinicamente por diarreia profusa, resultando em desidratação progressiva, acidose metabólica e óbito nos casos mais graves (Zeman et al. 1989). Para acarretar um quadro diarreico as ETEC devem possuir atributos de virulência, que são mediados por plasmídios e, portanto transferidos de uma cepa para outra, recomendando-se a classificação de uma amostra de *E. coli* enterotoxigênica pela sua capacidade em produzir enterotoxinas termoestável e/ou termolábil, reservando-se para um segundo plano a identificação sorológica (Acres 1985).

No Brasil, trabalhos realizados em diferentes regiões têm demonstrado a participação de enterobactérias, particularmente *E. coli* e *Salmonella* sp, como agentes bacterianos de diarreia em bezerros em percentuais que variam de 9,3 a 24,6% (Ávila et al. 1988, Oliveira et al. 1989, Pianta 1993, Lázaro et al. 1994b).

Um crescente isolamento de bactérias resistentes aos antimicrobianos, particularmente de *E. coli*, vem sendo observado em várias espécies de animais domésticos, entre os quais os bovinos (Singh et al. 1992). Segundo Carter (1988) a resistência múltipla a drogas, transferível devido aos fatores R, ocorre mais comumente nos membros da família Enterobacteriaceae, sendo transferida entre cepas da mesma espécie e de espécies bacterianas diferentes estreitamente relacionadas.

O propósito do presente estudo foi determinar a ocorrência de *E. coli* produtoras de enterotoxina termoestável e *Salmonella* sp em bezerros diarreicos e não diarreicos no agreste meridional de Pernambuco, como também verificar o comportamento dos isolados frente aos antimicrobianos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se um total de 106 bezerros mestiços, submetidos a um sistema de criação semi-intensiva, procedentes de 18 propriedades localizadas no agreste meridional do Estado de Pernambuco, agrupados da seguinte forma: 52 diarreicos e 54 não diarreicos com idade variando de 1 a 90 dias. As amostras fecais foram colhidas com auxílio de um "swab" e mantidas à temperatura de 4°C, sendo processadas num período máximo de três horas.

### Isolamento e identificação bioquímica

As amostras fecais foram semeadas em agar Eosina Azul de Metileno (EMB-Merck) e agar *Salmonella-Shigella* (SS-Merck). Paralelamente foi realizado o enriquecimento em caldo lactosado e caldo tetracionato (DIFCO), segundo Kauffmann com semeadura após 37°C por 24 horas em agar EMB e SS. De cada placa foram repicadas 5 a 10 colônias lactose negativas e lactose positivas em agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI-Merck) e incubadas a 37°C por 24 h, com posterior confirmação bioquímica adotando-se as fórmulas dos meios, critérios de incubação e leitura das reações segundo especificações de Costa & Hofer (1972) e Ewing (1986)

### Identificação sorológica

As amostras compatíveis com *Salmonella*, do ponto de vista bioquímico, foram analisadas sorologicamente pela determinação das estruturas antigênicas, somáticas e flagelares, através do processo de soro aglutinação rápida segundo Costa & Hofer (1972). Nesta etapa foram utilizados antissoros polivalentes e monovalentes somáticos e flagelares. A representação dos sorovares foi realizada de acordo com a orientação de Le Minor & Popoff (1987).

### Deteção de enterotoxina termoestável

A pesquisa de enterotoxina termoestável nas amostras de *E. coli* foi realizada em camundongos recém-natos, conforme metodologia descrita por Dean et al. (1972), modificada por Gianella (1976). As amostras que apresentaram valores da relação do peso do intestino/peso da carcaça iguais ou maiores que 0,083 foram consideradas positivas. Como controle positivo foi utilizada a amostra padrão de *E. coli* H10407 produtora de enterotoxina termoestável.

### Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Empregou-se a técnica dos discos impregnados com antimicrobianos, segundo Bauer et al. (1966), sendo selecionados

os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico (AN)- 30 mcg; amicacina (AM)- 30 mcg; ampicilina (AP)- 10 mcg; carbenicilina (CR) - 100 mcg; cefalotina (CF) - 30 mcg; cefoxitina (CFO)- 30 mcg; cefoperazona sódica (CPZ)- 75 mcg; cloranfenicol (Co)-30 mcg; danofloxacina (DFX)- 5 mcg; estreptomina (ET)- 10 mcg; gentamicina (GN)- 10 mcg; kanamicina (KN)- 30 mcg; nitrofurantoína (NT)- 300 mcg; sulfazotrim (SFT)- 25 mcg; sulfonamida (SUL)- 300 mcg; tetraciclina (TT)- 30 mcg. Como controle do antibiograma foi utilizado a amostra padrão de *E. coli* ATCC 25922.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os bezerros em estudo albergavam *E. coli*, detectando-se após avaliação da patogenicidade cinco (4,7%) produtoras de enterotoxina termoestável, sendo quatro provenientes de animais diarreicos e uma de não diarreico (Quadro 1), com maior ocorrência entre 31 a 60 dias de idade (Quadro 2). A presença de ETEC em bezerros nesta faixa etária nos leva a admitir o estado de portador e que outros enteropatógenos poderão estar envolvidos no processo diarreico, pois segundo Zeman et al. (1989) a *E. coli* enterotoxigênica é uma das principais causas da diarreia em bezerros nos primeiros dias de vida. Da mesma forma, cepas portadoras de plasmídeo Ent, o qual codifica a produção de enterotoxina, podem sobreviver no trato intesti-

Quadro 1. Ocorrência de *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sp em bezerros diarreicos e não diarreicos

	Bezerros		
	Diarreicos n = 52	Não diarreicos n = 54	Total n = 106
<i>E. coli</i> enterotoxigênica	4 (7,7%)	1 (1,8%)	5 (4,7%)
<i>Salmonella</i> sp	4 (7,7%)	2 (3,7%)	6 (5,7%)

nal desses animais por um longo período, aumentando assim a transmissibilidade de ETEC entre bezerros (Falkow et al. 1976). Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de Barranteguy et al. (1988) e Lázaro et al. (1994b), que encontraram bezerros de até 40 dias de idade portadores de ETEC.

Foram isoladas seis (5,7%) amostras de *Salmonella* caracterizadas sorologicamente como *S. Dublin*, *S. Infantis* e *S. Muenchen*. O sorovar Dublin foi observado em quatro animais, todos apresentando quadro diarreico e faixa etária variando de 16 a 30 dias (Quadro 2).

Quadro 2. Distribuição da ocorrência de *E. coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sp em bezerros nas diferentes faixas etárias

	Faixas etárias			
	1-15 dias n = 31	16-30 dias n = 37	31-60 dias n = 33	61-90 dias n = 05
<i>E. coli</i> enterotoxigênica	1 (3,2%)	1 (2,7%)	3 (9,1%)	0
<i>Salmonella</i> sp	1 (3,2%)	5 (13,5%)	0	0

O encontro de *S. Dublin* em animais com diarreia, ratifica as afirmações de Heath (1992), que caracteriza este sorovar como enzoótico para os bezerros, haja visto a alta adaptabilidade para a espécie bovina. Em contraposição, os sorovares Infantis e Muenchen foram resgatados de animais não diarreicos e enquadrados como ubíquos, ou seja, não possuem hospedeiros específicos e nem sempre animais portadores deste sorovar apresentam sintomatologia clínica (Hirsh 1994). Salienta-se ainda, que o bezerro não diarreico do qual foi isolado *S. Infantis*, tinha apenas 3 dias de idade e que esta situação segundo Radostits et al. (1994), pode ser decorrente de vacas portadoras de *Salmonella* que se tornam eliminadoras ativas com o parto, contaminando o meio ambiente, predispondo a infecção do recém-nato. Em nenhum dos animais foi verificado uma infecção concomitante por *E. coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sp.

Os baixos percentuais de ETEC e *Salmonella* nos bezerros por nós analisados, não esclareceram o diagnóstico na maioria dos casos, tornando-se evidente a necessidade de ampliar o processamento laboratorial, considerando-se a etiologia multifatorial dos processos diarreicos.

Quanto ao comportamento das 106 amostras de *E. coli* frente aos antimicrobianos, observou-se um maior percentual de resistência à tetraciclina (50,9%), sulfonamida (40,1%); estreptomina (35,8%) e ampicilina (22,6%). De maneira geral, estes valores se mostraram ligeiramente superiores nos animais diarreicos quando comparados aos não diarreicos (Figura 1). Estes achados corroboram os trabalhos de Gottschalk & Grodzinsky (1988) e Lázaro et al. (1994a) que encontraram elevados percentuais de resistência de *E. coli* frente à tetraciclina, estreptomina e ampicilina. As amostras evidenciaram um maior grau de sensibilidade frente à amicacina, cefoxitina, ácido nalidíxico, gentamicina e danofloxacina (Figura 1).

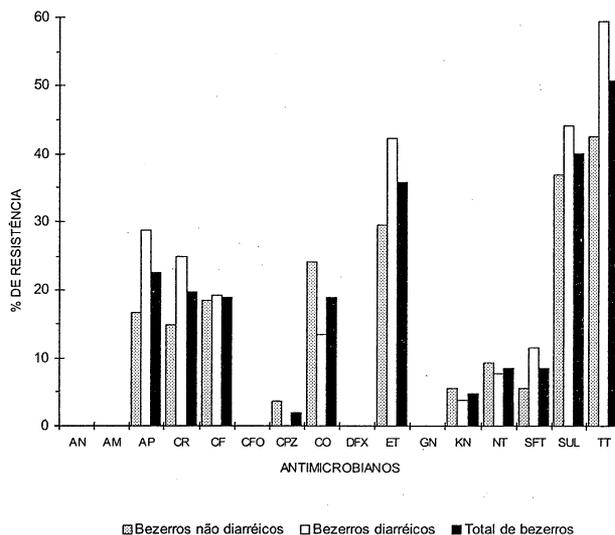


Fig. 1. Perfil de resistência das amostras de *E. coli* isoladas dos bezerros diarreicos e não diarreicos frente aos antimicrobianos.

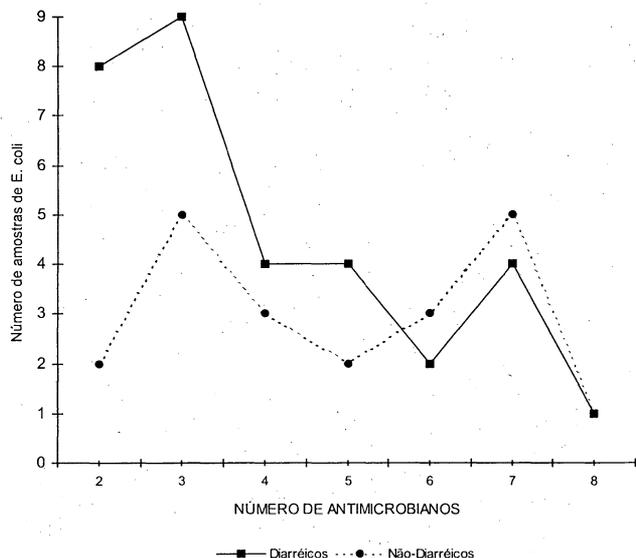


Fig. 2. Demonstração da resistência múltipla apresentada pelas amostras de *E. coli* isoladas de bezerros diarreicos e não diarreicos.

Analisando os resultados, verifica-se a resistência múltipla de *E. coli* (53/106) a duas ou mais drogas, como pode ser observado na Figura 2. Chama-se atenção para a detecção de nove amostras resistentes a sete antimicrobianos, havendo uma maior participação da associação tetraciclina-sulfonamida, drogas empregadas com frequência na região.

Gottschalk & Grodinsky (1988), analisando distintos graus de resistência de *E. coli* isoladas de bezerros, tipo leiteiro, encontraram 26% dos isolados resistentes a quatro ou mais antibióticos. Sob este prisma, Singh et al. (1992), relataram a transmissão da multiresistência a drogas entre populações bacterianas por meio de plasmídios, podendo estas bactérias serem transmitidas entre os animais e dos animais para a espécie humana.

Os diferentes sorovares de *Salmonella* apresentaram uma elevada sensibilidade para a maioria dos antimicrobianos (12/16) empregados (Figura 3), entretanto um grau intermediário de sensibilidade foi assinalado em 83,3% das amostras frente à estreptomina, de modo similar aos ensaios realizados por Morteo et al. (1990) e Shah & Jhala (1992).

O perfil de resistência apresentado pelas amostras alerta para o uso não criterioso de antimicrobianos, acarretando sérios problemas de ordem econômica e sanitária, como também, conseqüências deletérias à nível de saúde pública. Salientamos no entanto, a importância de medidas de controle mais eficazes tais como o manejo higiênico adequado, visando diminuir o grau de exposição ao agente etiológico, bem como, estimular a resistência inespecífica através da correta administração do colostro.

*Agradecimentos.* - À Profa. Rosélia Bezerra, Departamento de Medicina Veterinária, e ao Dr. Nivaldo de Azevedo Costa, Clínica de Bovinos de

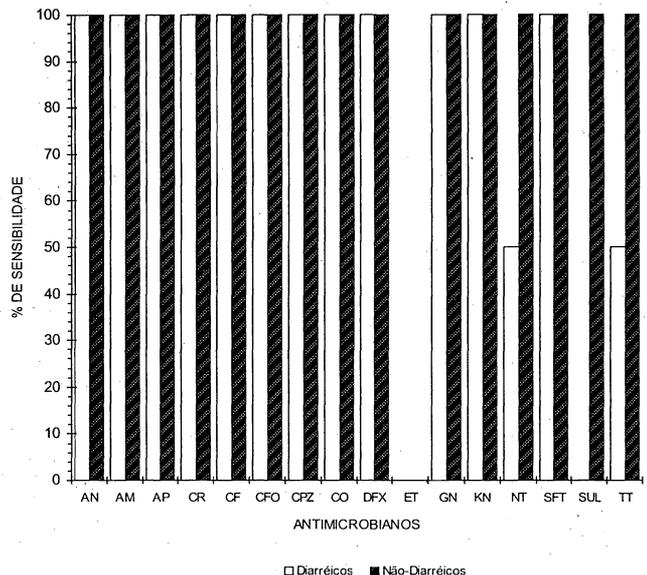


Fig. 3. Perfil de sensibilidade das amostras de *Salmonella* sp isoladas de bezerros diarreicos e não diarreicos frente aos antimicrobianos.

Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela colaboração prestada no decorrer do trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Acres S.D. 1985. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *J. Dairy Sci.* 68:229-256.
- Allen S.D. & White R.D. 1985. Dairy calf diarrhea. *Agri Practice* 6:23-31.
- Anderson M. & Blanchard P. 1989. The clinical syndromes caused by *Salmonella* infection. *Vet. Med.* 84:816-819.
- Ávila F.A., Lallier R., Quintana J.L., Schocken-Iturrino R.P. & Ávila S.H.P. 1988. *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in the northern region of state of São Paulo, Brazil. *Ars Vet.* 4:285-289.
- Barrandeguy M.E., Cornaglia E.M., Gottschalk M., Fijtman N., Pasini M.L., Yafal A.G., Parraud J.R. & Schudel A.A. 1988. Rotavirus, enterotoxigenic *Escherichia coli* and other agents in the feces of dairy calves with and without diarrhea. *Revta Latinoam. Microbiol.* 30:239-245.
- Bauer A.W., Kirby W.N.M., Swerris I.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:93-96.
- Blanco M., Blanco J., Blanco J. E. & Ramos J. 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrototoxic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.* 54 : 1446 - 1451
- Carter G.R. 1988. Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária. Rocca, São Paulo.
- Charles T.P. & Furlong J. 1992 Diarréia dos bezerros. Embrapa-CNPGL, Coronel Pacheco, Minas Gerais, 107p.
- Costa G.A. & Hofer E. 1972. Isolamento e identificação de enterobactérias. Monografia Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 120p.
- Dean A.G., Ching Y.C., Williams R.G. & Harden L.B. 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 25:407-411.
- Ewing W.H. 1986. Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. Elsevier, New York. 536p.
- Falkow S., Williams Jr. L.P, Seman S.L. & Rollings L.D. 1976. Increased

- survival in calves of *Escherichia coli* K12 carrying on ENT plasmid. Infect. Immunol. 13:1005-1007.
- Gianella R.A. 1976. Suckling mouse model for detection of heat stable *Escherichia coli* enterotoxin characteristics of the model. Infect. Immunol. 14:95-99.
- Gottschalk M. & Grodsinsky C. 1988. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* aisladas de terneros con y sin diarrea en distintos tipos de explotación ganadera. Revta Latinoam. Microbiol. 30:247-251.
- Heath S.E. 1992. Neonatal diarrhea in calves: Diagnosis and intervention in problem herds. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 14:995-1002.
- Hirsh D.C. 1994. *Salmonella*, p. 119-124. In: Biberstein E.L. & Zee Y.C. (ed.) Tratado de Microbiologia Veterinária. Acribia, Zaragoza.
- Lázaro N.S., Hofer E., Mendonça C.L. & Gonçalves L.M.V. 1994a. Comportamento das amostras de *Escherichia coli* isoladas de bovinos frente a antimicrobianos. Revta Bras. Med. Vet. 16: 198-201.
- Lázaro N.S., Rodrigues D.P., Mendonça C.L., Duque V.M., Passos R.F.B. & Hofer E. 1994b. *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de bezerras no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Revta Bras. Med. Vet. 16:55-61.
- Le Minor L. & Popoff M. Y. 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:465-468.
- Morteo C.G., Aluja A.S. & Estrella S.G. 1990. Estudio etiológico de los problemas diarreicos en becerros lactantes. Vet. Méx. 21:435-438.
- Oliveira A.A., Pedreira P.A.S. & Almeida M.F.R.S. 1989. Doenças de bezerras: I. Diarréias bacterianas no estado de Sergipe, Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 41:213-222.
- Pianta C. 1993. Diarréia neonatal de origem bacteriana em bovinos. Ciência Rural 23:107-115.
- Radostits O. M., Blood D. C. & Gay C. C. 1994. Veterinary Medicine. 8th ed. Baillière Tindall, London.
- Shah N.M. & Jhala V.M. 1992. Isolation of *Salmonella typhimurium* from neonatal diarrhoea in calves. Indian Vet. J. 69:84-85.
- Singh M., Sanyal S.C. & Yadav J.N.S. 1992. Enterotoxigenic drug resistant plasmids in animal isolates of *Escherichia coli* and their zoonotic importance. J. Trop. Med. Hyg. 95:316-321.
- Zeman D.H., Thomson J.U. & Francis D.H. 1989. Diagnosis, treatment, and management of enteric colibacillosis. Vet. Med. 84:794-802.