

DIARRÉIA BOVINA: ESTUDO DA ETIOLOGIA, VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE AGENTES ISOLADOS DE BEZERROS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO – SP, BRASIL.

(BOVINE DIARRHEA: STUDY OF THE ETIOLOGY, VIRULENCE AND RESISTENCE TO ANTIMICROBIAL DRUGS OF AGENTS ISOLATED FROM CALVES OF THE RIBEIRÃO PRETO REGION, SP, BRAZIL)

(DIARRREA BOVINA: ESTUDIO DE LA ETIOLOGÍA, VIRULENCIA Y RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE AGENTES AISLADOS DE BECERROS DE LA REGIÓN DE RIBEIRÃO PRETO – SP, BRASIL)

H.A. J.GAMEZ¹, E.C. RIGOBELLO¹, S. A. FERNANDES², J. M. MARIN³, F.A. ÁVILA⁴

RESUMO

Foram analisados 200 espécimes fecais de bezerros leiteiros com diarreia na faixa etária de um a 90 dias, da região de Ribeirão Preto/SP, com objetivo de isolar e identificar os principais enteropatógenos e também se caracterizar o perfil de resistência a diferentes antibióticos e quimioterápicos. Foram isoladas cepas de *Escherichia coli* de 173 (86,5%) espécimes, das quais 53 eram de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), cujos sorotipos mais frequentes foram: O9K35:K99 (39,6%) e O8:K85:K99 (32,0%). As 120 cepas restantes eram de *E. coli* não enterotoxigênicas, sendo mais frequentes os sorogrupos O114 (23,3%), O119 (22,5%) e O111 (15,0%). Também foram isoladas de 12 espécimes (6,0%) cepas de *Clostridium perfringens*, de cinco (2,5%), cepas de *Salmonella* Dublin e de 86 (43,0%), cepas de *Cryptosporidium* sp. O teste de sensibilidade frente a antibióticos e quimioterápicos determinou para as cepas de *E.coli* uma resistência de 100,0% para lincomicina, 99,4% para penicilina G e 85,5% para novobiocina. As cepas de *S. Dublin* foram resistentes à penicilina G (100,0%), à novobiocina e à eritromicina (80,0%), à lincomicina e à cefalotina (60,0%).

PALAVRAS-CHAVE: Bezerro. Diarreia. *Escherichia coli*. *Salmonella*. *Clostridium*. *Cryptosporidium*.

SUMMARY

Two hundred fecal samples of calves from dairy herds presenting diarrhea were analyzed in group age of one to 90 days, of the region of Ribeirão Preto-SP, aiming at isolating and identifying the main enteropathogens and also to determine the resistance profile to several antimicrobial drugs. Of the analysed samples, 173 (86.5%) strains of *E. coli* were isolated, being 53 (26.5%) strains enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), whose more frequent serotypes were: O9:K35:K99 (39.6%) and O8:K85:K99 (32.0%). The 120 (60.0%) others strains of *E. coli* were non enterotoxigenic, being more frequent the sorogroups O114 (23.3%), O119 (22.5%) and O111 (15.0%). Also were isolated 12 (6.0%) strains of *Clostridium perfringens*, five (2.5%) strains of *Salmonella* Dublin and 86 (43.0%) strains of *Cryptosporidium* sp. The test of sensibility

¹ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Unesp Jaboticabal-SP.

² Pesquisadora do Laboratório Central- Instituto Adolfo Lutz- São Paulo- SP.

³ Professor Adjunto, Depto. de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia da USP, Ribeirão Preto, SP, Dep.de Ciências e Morfologia .

⁴ Professor Titular, Departamento de Patologia Veterinária da Unesp - Jaboticabal - SP. Email.: favila@fcav.unesp.br
Apoio financeiro: CNPq, FAPESP e CAPES

for antibiotics and chemotherapics, determined for the *E. coli* strains disclosed a resistance of 100.0% for lincomycin, 99.4% for penicillin G and 85.5% for novobiocin. The *S. Dublin* strains were resistant to the penicillin G (100.0%), novobiocin and erythromycin (80.0%), lincomycin and cefalotin (60.0%).

KEY-WORDS: Calf. Diarrhea. *Escherichia coli*. *Salmonella*. *Clostridium*. *Cryptosporidium*.

RESUMEN

Fueron analizados 200 especímenes fecales de becerros lecheros con diarrea, con edades entre un y 90 días, de la región de Ribeirão Preto/SP, Brasil, con el objetivo de aislar e identificar los principales enteropatógenos y también caracterizar el perfil de resistencia a diferentes antibióticos y quimioterápicos. Fueron aisladas cepas de *Escherichia coli* de 173 (86,5%) especímenes, de las cuáles 53 eran de *E. coli* no enterotoxigénicas (ETEC), cuyos serotipos más frecuentes fueron O9K35:K99 (39,6%) y O8:K85:K99 (32,0%). Las 120 cepas restantes eran de *E. coli* no enterotoxigénicas, siendo más frecuentes los serogrupos O114 (23,3%), O119 (22,5%) y O111 (15,0%). También fueron aisladas, de 12 especímenes (6,0%) cepas de *Clostridium perfringens*, de cinco (2,5%) cepas de *Salmonella* Dublin y de 86 (43,0%) cepas de *Cryptosporidium* sp. El teste de sensibilidad frente a antibióticos y quimioterápicos determinó resistencia de 100,0% de las cepas de *E. coli* para la lincomicina, 99,5% para penicilina G y 85,5% para novobiocina. Las cepas de *S. Dublin* fueron resistentes a penicilina G (100,0%), novobiocina y eritromicina (80,0%), lincomicina y cefalotina (60,0%).

PALABRAS-CLAVE: Becerro. Diarrea. *Escherichia coli*. *Salmonella*. *Clostridium*. *Cryptosporidium*.

INTRODUÇÃO

A síndrome diarreia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em bezerros (KROGH, 1983). No Brasil, apesar de não existirem estatísticas oficiais, acredita-se que as perdas por essa síndrome sejam altas especialmente considerando-se o manejo dos rebanhos. As perdas ocasionadas por esse complexo incluem os custos da mortalidade dos animais, da medicação e da mão-de-obra envolvidas com o tratamento, além da produtividade reduzida dos animais (CHARLES e FURLONG, 1992).

A pecuária leiteira na maioria dos estados brasileiros é constituída por criações cujas condições higiênico-sanitárias podem ser consideradas precárias, excetuando-se aquelas de gado produtor de leite tipo A e B. Alguns estudos realizados, principalmente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, evidenciaram que a diarreia dos bezerros, de modo geral, constitui uma das mais importantes causas de perdas no rebanho bovino. Isto se agrava com a falta de infra-estrutura de laboratórios para o diagnóstico nas diversas regiões do País (CHARLES e FURLONG, 1992). A diarreia neonatal dos bezerros é um sério problema devido a existência de vários agentes e fatores envolvidos na sua gênese. O agente causador pode proliferar no trato intestinal sozinho ou combinado com outro organismo (LARIVIÉRE et al., 1979, MOON et al., 1978). Dentre os vários microrganismos envolvidos, a *E. coli* enterotoxigênica parece ser a mais freqüente (GLANTZ et al., 1959, SMITH e HALLS, 1967). Nos últimos anos, as pesquisas têm demonstrado também

o envolvimento cada vez mais freqüente de *Salmonella*, rotavírus e criptosporídios (KIRKPATRICK, 1985, ANDERSON e BLACHARD, 1989, LEVINE, 1987, AMBROSIM et al., 2002).

No Brasil, Madruga et al. (1992) relataram que a diarreia foi a causa mais freqüente de mortalidade (53,3%) observada em duas microrregiões do Estado do Mato Grosso do Sul. Ao exame bacteriológico, ficou demonstrado que a *E. coli* e *Salmonella* foram as bactérias de maior ocorrência. O exame parasitológico não evidenciou a presença de *Cryptosporidium*.

Kuchembuck et al. (1984) isolaram de 57 amostras de fezes diarreicas de bezerros, da região de Botucatu/SP, duas cepas de *Salmonella* sp e 37 cepas de *E. coli*, das quais 12 eram enterotoxigênicas e portadoras do antígeno K99.

Em se tratando de *E. coli*, dois fatores importantes devem ser evidenciados para o aparecimento da doença: colonização do intestino delgado e produção de enterotoxina (SMITH e HALLS, 1967). Alguns estudos têm demonstrado que o antígeno K99 desenvolve um importante papel na colonização do intestino delgado de bezerros (ORSKOV et al., 1975 e FAIRBROTHER et al., 1986). A produção deste antígeno é plasmidial e ele pode ser transferido de uma bactéria para outra (KROGH, 1983). Entretanto, novos fatores de aderência têm sido descritos (MORRIS et al., 1980, FAIRBROTHER et al., 1986, ÁVILA et al., 1986) em cepas de *E. coli*, tanto de origem suína quanto bovina.

As primeiras observações sobre a produção de enterotoxinas devem-se a Smith e Halls (1967) que

verificaram o fato de que culturas vivas de *E. coli*, ou filtrado destas, isoladas de animais domésticos, são capazes de dilatar alças ligadas de intestino de porcos e coelhos, com acúmulo de líquido na luz intestinal. Existem duas classes de enterotoxinas que se diferenciam entre si fundamentalmente pela resistência ao calor e origem. São as enterotoxinas LT (LT-I e LT-II) termolábeis e ST (STa e STb) termoestáveis. A LT-II foi descrita pela primeira vez em cepas de *E. coli* isoladas de fezes de búfalos e já foram descritas duas variantes antigênicas: LT-IIa e LT-IIb (GUTH et al., 1986). A enterotoxina STa é detectada pelo teste do camundongo lactente (DEAN et al. 1972), tem baixo peso molecular e é mediada por plasmídios. Esta toxina apresenta variações encontradas em cepas de *E. coli* isoladas de suínos (STap) e seres humanos (STah).

Na salmonelose dos bezerros é verificado um pequeno número de sorotipos, predominando a *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Typhimurium e secundariamente a *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Anatum e *Salmonella* Newport (RIBEIRO e SILVA, 1982, ANDERSON e BLACHARD, 1989 e CAMPOS e HOFER, 1989).

O *Clostridium perfringens* produz não só em bezerros, como em outros animais, diferentes intoxicações e algumas doenças infecciosas como, por exemplo, uma enterite necrótica-hemorrágica causada pelo tipo C. O microrganismo é um habitante normal do intestino dos animais, inclusive sadios. Entretanto, o simples isolamento de *C. perfringens* das fezes diarreicas de um bezerro, ainda que com características hemorrágicas, não confirma o diagnóstico (TZIPORI, 1985).

A diarreia dos bezerros determinada por coccídios do gênero *Cryptosporidium* ocorre especialmente na faixa etária de cinco a 10 dias de idade. São consideradas duas espécies parasitando bezerros: *C. parvum*, ocorrendo em animais com menos de três semanas e o *C. muris*, em bezerros acima dessa idade (AURICH et al., 1990).

Os fatores de resistência às drogas antimicrobianas são, na sua maioria, de natureza plasmidial. No final da década de 50 e no princípio da de 60, autores japoneses revelaram a existência dos plasmídios R. A partir de então, vários outros, como Nakano et al. (1988), detectaram a sua presença nas enterobactérias patogênicas *Salmonella*, *E. coli* e em outros microrganismos do homem e de outros animais. Os plasmídios R são responsáveis pela resistência adquirida a diversos antibióticos e quimioterápicos e pelo aparecimento de amostras multiresistentes. O uso indiscriminado desses agentes terapêuticos tem sido um dos grandes responsáveis pela disseminação dos fatores R. Os tratamentos prolongados ou repetidos exercem sobre a microbiota pressões de seleção, originando populações com alto índice de resistência. Diante desses fatos, objetivou-se estudar a etiologia da diarreia em bezerros leiteiros, incluindo a ocorrência dos diferentes enteropatógenos, alguns fatores

de virulência e a resistência a antimicrobianos daqueles clinicamente mais relevantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram estudadas amostras de fezes de bezerros provenientes de várias granjas produtoras de leite, de raças especializadas, situadas na região de Ribeirão Preto-SP, em número representativo. As propriedades foram visitadas em qualquer época, na ocorrência de casos de diarreia.

Amostras de fezes

Foram estudados 200 espécimes fecais de bezerros com diarreia na faixa etária de um a 90 dias. Os espécimes foram colhidos de bezerros criados nos municípios de Jaboticabal, Taiacu, Monte Alto, São Carlos, Viradouro, Pitangueiras e em Ribeirão Preto (Tabela 1).

Isolamento e identificação bioquímica

Para o isolamento de *E. coli*, as amostras de fezes foram semeadas em placas contendo ágar Mac Conkey e ágar-sangue, e incubadas a 37° C por 24 horas. As colônias com características culturais semelhantes às de *E. coli* foram identificadas como pertencentes à espécie em estudo, com base nos testes de fermentação da lactose, produção de indol, reações de vermelho de metila e Voges Proskauer, utilização de citrato, produção de urease e de gás sulfídrico (H₂S), cuja leitura foi feita após 24 e 72 horas de incubação a 37° C. Para isolamento de *Salmonella*, as cepas foram semeadas em caldo selenito e plaqueadas diretamente em placas contendo EMB ágar (ágar eosina-azul de metileno) e incubadas a 37° C, por 24-48 horas. As colônias não fermentadoras da lactose foram submetidas à identificação bioquímica, segundo Edwards e Ewing (1972). A tipificação sorológica das cepas foi feita no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Para isolamento de *C. perfringens*, as amostras de fezes foram semeadas em caldo BHI (Infusão Cérebro Coração) contendo fragmentos de fígado cozido (Meio Tarozzi) com camada VASPAR e submetidas a choque térmico, isto é, foram aquecidas a 80° C, por 10 minutos e, em seguida, submetidas a tratamento com água fria corrente. Após o choque térmico, esses tubos foram incubados a 37° C por 48 horas. Havendo crescimento no meio Tarozzi, foram feitos repiques das culturas para placas contendo ágar específico para *C. perfringens*, seguindo-se incubação sob condições de anaerobiose por 48 horas à temperatura de 37° C. As colônias com características de *C. perfringens* (formação do halo pela lecitinase) foram identificadas morfológicamente pela coloração de Gram e submetidas à identificação bioquímica, com base nos testes de

fermentação da glicose, lactose, maltose, sacarose e digestão da caseína.

Identificação sorológica das cepas de *E. coli* enterotoxigênicas

A identificação sorológica das cepas de *E. coli* enterotoxigênicas foi realizada com anti-soro OK produzido em coelhos, através do teste de aglutinação (AMBROSIM et al., 2002) em lâmina contra os seguintes sorotipos: Myers n°. 483 (O9:K35:K99), Myers n°. 490 (O101:K30:K99), Myers n°. 505 (O101:K28:K99), Myers n°. 524 (O8:K85:K99), Myers n°. 559 (O9K25:K99), Myers Wi-1 (O20:K?:K99). Primeiramente, as cepas foram cultivadas em placas contendo meio de Minca a 37° C, por 24 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução salina (NaCl a 0,85%), e uma gota era depositada sobre lâminas de vidro, adicionando-se uma gota dos anti-soros e misturando-se delicadamente para observação da aglutinação específica.

Identificação sorológica das cepas de *E. coli* não-enterotoxigênicas

A identificação sorológica das cepas de *E. coli* não enterotoxigênicas foi realizada com soros polivalentes e monovalentes (PROBAC), preparados em coelhos, através do teste de aglutinação em lâmina. Todos os soros continham anticorpos contra antígenos O. Foram usados os soros polivalentes: A (continham anticorpos contra os sorogrupos O26, O55, O111, O119); B (continham anticorpos contra os sorogrupos O114, O125, O142); C (continham anticorpos contra os sorogrupos O86, O126,

Tabela 1- Número e distribuição em porcentagem dos 200 espécimes fecais de bezerros com diarreia, criados em fazendas da região de Ribeirão Preto-SP, no período de agosto de 2001 a maio de 2002.

Municípios	Fazendas	Espécimes fecais	%
1.Jaboticabal	UNESP	5	2,5
2.Monte Alto	Santa Júlia	13	15
	Leite Monte Alto	17	
3.Taiapu	Germania	30	15
4.Pitangueiras	Pitangueiras	20	10
5.Viradouro	Guanabara	30	15
6.Ribeirão Preto	Instituto de Zootecnia	50	25
7.São Carlos	Floresta	10	17,5
	Camila	05	
	Bom Sucesso	06	
	Santa Lúcia	02	
	Boa Vista	03	
	São João	04	
	Santa Elissa	03	
Santa Estrela	02		

Tabela 2 - Número, porcentagem e tipos de agentes isolados de 200 espécimes de fezes diarreicas de bezerros da região de Ribeirão Preto-SP, no período de agosto de 2001 a maio de 2002.

Agentes	Espécimes Positivos	
	Nº	%
<i>E. coli</i> não enterotoxigênica	120	60,0
<i>Cryptosporidium</i> sp.	86	43,0
<i>E. coli</i> enterotoxigênica	53	26,5
<i>C. perfringens</i>	12	6,0
<i>Proteus</i> sp.	9	4,5
<i>Enterobacter</i> sp.	8	4,0
<i>S. dublin</i>	5	2,5
<i>Pseudomonas</i> sp.	4	2,0
<i>Klebsiella</i> sp.	4	2,0
<i>Arizona</i> sp.	2	1,0

O127, O128). Os soros monovalentes usados continham anticorpos contra cada um dos sorogrupos anteriormente citados.

Deteção de enterotoxina STa

As cepas de *E. coli* identificadas foram cultivadas em caldo BHI, em banho-maria, a 36° C, sob agitação, durante 18 horas. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionada solução de azul de Evans a 2% e uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada por via oral em grupos de quatro camundongos lactentes com três a quatro dias de idade, deixando-se um camundongo como controle positivo, mantidos à temperatura ambiente, por três horas. Após esse tempo, os camundongos foram sacrificados (inalação de éter), retirado-lhes os intestinos (I), feitas as pesagens destes e das carcaças (C) em separado e determinada a razão entre os respectivos pesos, (I/C). Um resultado I/C superior a 0,085 foi considerado positivo e abaixo de 0,085 negativo (DEAN et al, 1972).

Deteção de *Cryptosporidium*

Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* foram feitos esfregaços de fezes diarreicas em lâminas que foram analisados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada e preconizada por Henriksen e Pohlens (1981).

Sensibilidade a antimicrobianos

Todas as cepas de *S. Dublin* e de *E. coli* foram submetidas a teste de sensibilidade aos seguintes antibióticos e quimioterápicos: ácido nalidíxico, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, penicilina G, novobiocina, neomicina, tetraciclina, nitrofurantoína, trimetoprim e sulfadiazina. O método usado foi o de Bauer et al. (1966).

Tabela 3 - Razão entre o peso do intestino e o da carcaça obtida pelo teste do camundongo lactante para a detecção da enterotoxina STa.

Peso do intestino/ Peso da carcaça	Nº de Preparações	(%)	Interpretação (presença de STa)
> 0,085 (\bar{x} = 0,088)	53	30,6	Enterotoxigênica
< 0,085 (\bar{x} = 0,075)	120	69,4	Não Enterotoxigênica

Tabela 4 - Número, porcentagem e tipos de associações de enteropatógenos isolados de espécimes fecais de bezerros com diarreia, da região de Ribeirão Preto-SP, no período de agosto de 2001 a maio de 2002.

Agentes	Amostras Associadas	
	Nº	%
<i>E. coli</i> + <i>Enterobacter</i> sp.	9	20,4
<i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i>	8	18,2
<i>E. coli</i> + <i>S. dublin</i>	5	11,4
<i>E. coli</i> + <i>Pseudomonas</i> sp.	5	11,4
<i>E. coli</i> + <i>Proteus</i> sp.	4	9,1
<i>E. coli</i> + <i>Arizona</i> sp.	3	6,8
<i>Enterobacter</i> sp. + <i>Klebsiella</i> sp.	3	6,8
<i>C. perfringens</i> + <i>Enterobacter</i> sp.	2	4,5
<i>E. coli</i> + <i>Klebsiella</i> sp.	1	2,3
<i>C. perfringens</i> + <i>Klebsiella</i> sp.	1	2,3
<i>Enterobacter</i> sp. + <i>Pseudomonas</i> sp.	1	2,3
<i>E.coli</i> + <i>C. perfringens</i> + <i>Enterobacter</i> sp.	1	2,3
<i>E. coli</i> + <i>Enterobacter</i> sp. + <i>Proteus</i> sp.	1	2,3

RESULTADOS

Dos 200 espécimes fecais de bezerros com diarreia foram isoladas cepas de *E. coli* de 173. De cinco também foram isoladas cepas de *Salmonella* Dublin, de 12, cepas de *C. perfringens*, de nove, cepas de *Proteus* sp, de oito, cepas de *Enterobacter* sp, de quatro, cepas de *Klebsiella* sp, de quatro, cepas de *Pseudomonas* sp e, de dois, cepas de *Arizona* sp (Tabela 2). Oitenta e seis preparações foram positivas para *Cryptosporidium* sp (Figura 1).

Das 173 cepas de *E. coli* examinadas pelo teste do camundongo lactante, 53 cepas foram positivas e 120 foram negativas. A atividade enterotoxigênica foi demonstrada com base na razão peso do intestino/peso da carcaça (Tabela 3).

O isolamento de dois ou mais agentes foi constatado em 44 amostras de fezes de bezerros com diarreia, onde as principais associações foram de *E. coli* e *Enterobacter* sp (20,4%), *E. coli* e *C. perfringens* (18,2%), *E. coli* e *S. Dublin* (11,4%) e *E. coli* e *Pseudomonas* sp (11,4%) (Tabela 4). Os resultados dos testes da aglutinação em lâmina das cepas de *E. coli* enterotoxigênica com anti-soro OK produzido em coelhos estão apresentados na Tabela 5. Cincoenta e três cepas das 173 de *E. coli* recuperadas foram positivas para a enterotoxina STa e eram portadoras do antígeno de aderência K99. Os resultados dos testes de aglutinação em lâmina das cepas de *E. coli* não enterotoxigênicas, contra os soros anti-O preparados em coelhos, estão na Tabela 6.

Tabela 5 - Número, porcentagem e tipos antigênicos das cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) isoladas de bezerros com diarreia, da região de Ribeirão Preto- SP, no período de agosto de 2001 a maio de 2002.

Tipo Antigênico		Nº de sorotipos/ Total de ETEC	%
O	K		
9	35	21/53	39,6
8	85	17/53	32,0
9	25	9/53	17,0
101	30	5/53	9,4
20	?	1/53	1,9

ETEC = *E. coli* enterotoxigênica. ? = Não determinado.

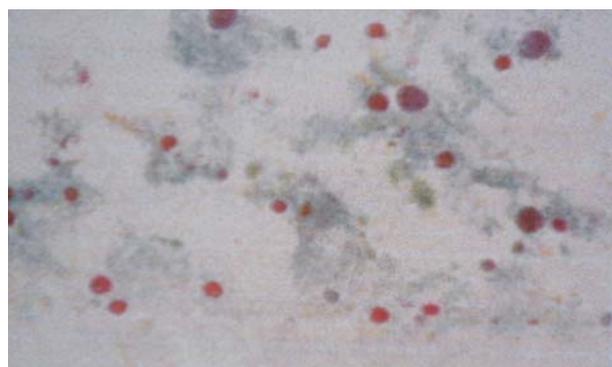
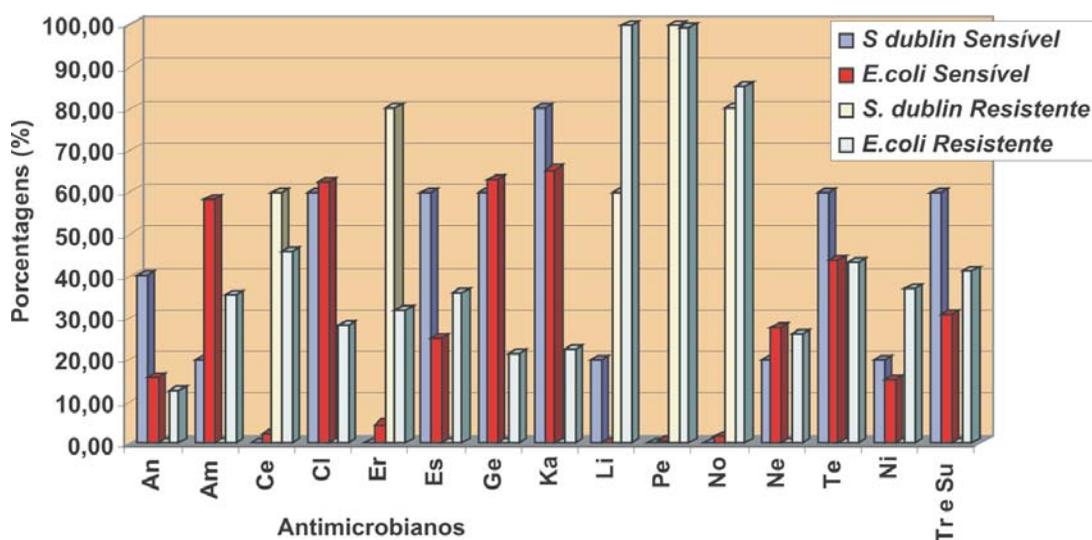


Figura 1 – *Cryptosporidium* sp em esfregaço de fezes diarreica de bezerro em lâmina corada pelo método de HENRICKSEN & POHLENZ (1981). Aumento de 400 x.

Tabela 6 - Número, porcentagem e tipos antigênicos das cepas de *E. coli* não ETEC isoladas de bezerros com diarreia, da região de Ribeirão Preto-SP, no período de agosto de 2001 a maio de 2002.

Tipo Antigênico O	Nº de Sorogrupos/ Total não ETEC	%
114	28/120	23,3
119	27/120	22,5
111	18/120	15,0
86	13/120	10,8
55	8/120	6,7
125	8/120	6,7
126	6/120	5,0
26	4/120	3,3
127	4/120	3,3
128	4/120	3,3

Não ETEC = *E. coli* não enterotoxigênica



An = Ácido nalidíxico; Am= Ampicilina; Ce = Cefalotina; Cl = Cloranfenicol; Er = Eritromicina; Es = Estreptomicina; Ge= Gentamicina; Ka = Kanamicina; Li=Lincomicina; Pe=Penicilina G; No = Novobiocina; Ne = Neomicina; Te = Tetraciclina; Ni = Nitrofurantóina; Tr e Su =Trimetoprim e Sulfadiazina.

Figura 2 – Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das cepas de *S. Dublin* e de *E. coli* isoladas de fezes diarreicas de bezerros da região de Ribeirão Preto - SP no período de maio de 2001 a agosto de 2002.

DISCUSSÃO

Dos 200 espécimes fecais de bezerros com diarreia colhidas em sete municípios na região de Ribeirão Preto/SP (Tabela 2), foram isoladas 53 cepas (26,5%) de *E. coli* enterotoxigênica, 120 cepas (60,0%) de *E. coli* não enterotoxigênica, 12 cepas (6,0%) de *C. perfringens*, cinco (2,5%) de *S. Dublin* e 86 cepas (43,0%) de *Cryptosporidium* sp. Esses resultados concordam com aqueles de outros autores que relatam que são vários os agentes atualmente considerados enteropatogênicos, destacando-se, pela sua frequência e pelo maior volume de informações existentes, as cepas de *E. coli* enterotoxigênicas, *Salmonella* sp, *C. perfringens* tipo C, *Cryptosporidium* sp, *Campylobacter* sp e os rotavírus (CASTRO et al., 1978). As associações de dois ou mais patógenos (Tabela 3) foram identificadas em 44 amostras de fezes diarreicas de bezerros, tendo sido observadas associações de mais de quatro. Segundo Current (1985), as combinações de patógenos intestinais, em bezerros leiteiros recém-nascidos, complicam o tratamento, pioram os sinais clínicos e o prognóstico, e tendem a provocar uma mortalidade mais elevada.

Das 173 cepas de *E. coli*, foram identificadas 53 cepas enterotoxigênicas (Tabela 4) pelo teste do camundongo lactente e estas eram portadoras do antígeno de aderência K99 (F5). Portanto, na colibacilose dos bezerros, ao contrário do que ocorre na colibacilose suína, na qual podemos ter cepas de *E. coli* produzindo diferentes tipos de enterotoxinas, só a enterotoxina STa parece estar relacionada efetivamente com a enteropatogenicidade (CASTRO et al., 1978). Por outro lado, a fimbria K99 constitui um tipo de antígeno importante não só para o diagnóstico quanto para a produção de vacinas (ACRES, 1985). Os tipos antigênicos das cepas de *E. coli* enterotoxigênicas isoladas foram os sorogrupos O9, O8, O101 e O20 (Tabela 5). As *E. coli* responsáveis por doenças entéricas são classificadas em diferentes grupos, de acordo com suas propriedades de virulência, interação com a mucosa intestinal e sintomas clínicos que provocam. Estudos epidemiológicos indicam que mais de 80% dos casos clínicos são causados pela cepa de *E. coli* B41 (O101:K30:K99), que ocorre em bezerros jovens com menos de quatro dias de idade (De GRAAF e ROORDA, 1982), diferindo do sorogrupo mais frequente neste estudo, que foi o O9, em bezerros com um a 90 dias de idade.

O *C. perfringens* tipo C, que também afeta o homem, produz uma enterotoxina indistingüível, biológica, química e sorologicamente da produzida pelo tipo A que acomete o homem. O seu papel na patogenia da doença em bezerros ainda não foi esclarecido. O *C. perfringens* tipo C causa, não só em bezerros, como também em outros animais, um quadro de enterite necrótico-hemorrágica. Apesar de a doença ter sido relatada em países desenvolvidos, o microrganismo é cosmopolita. O

isolamento dessa bactéria de fezes diarreicas, no presente estudo, não indica, necessariamente, ser esta a causadora da doença, já que ela é um habitante natural do intestino de animais clinicamente sadios (TZIPORI, 1985). Com relação às cepas de *Salmonella* isoladas, é importante o fato de elas terem sido recuperadas somente de animais com diarreia, pois chama a atenção o fato de que, na salmonelose bovina, as células bacterianas, no intestino, podem invadir a corrente sanguínea e causar septicemia, tornando-se difícil o isolamento da bactéria a partir das fezes (ANDERSEN et al., 1994 e TZIPORI et al., 1983). Quanto à frequência de isolamento de *Salmonella* sp em outros países, Tzipori et al. (1983) relatam que cerca de 31,9% de infecção em bezerros com diarreia nos Estados Unidos ocorrem aos 60 dias de idade ou mais e que estas infecções poderiam ser atribuídas à *S. Dublin*. No presente estudo, a frequência do sorotipo Dublin foi menor (11,4%), embora a idade dos bezerros estudados fosse semelhante.

No Brasil, existem referências de ocorrência de *Cryptosporidium* sp nas investigações conduzidas por Madruga et al. (1992) em bezerros no Estado do Mato Grosso do Sul. Alguns relatos sobre o papel do *Cryptosporidium* sp são encontrados nos estudos conduzidos por Garcia e Lima (1994) e Garcia et al. (1989) no Estado de Minas Gerais. No Estado de São Paulo existe um estudo de Ortolani et al. (1988) sobre alguns aspectos epidemiológicos da criptosporidiose. No presente estudo, não foi possível determinar a espécie de *Cryptosporidium* das amostras de fezes com presença de oocistos. Entretanto, o *C. parvum* parece ser a principal espécie responsável por diarreia nos bezerros, já que há evidências de duas espécies distintas de *Cryptosporidium* parasitando bezerros, como sugerem Upton e Current (1985), sendo a espécie *C. muris* observada no abomaso e *C. parvum* no intestino delgado. Esse fato é confirmado por Souza (1991), que identificou duas espécies morfológicamente distintas, isoladas de bezerros com e sem diarreia, numa bacia leiteira do Rio de Janeiro.

Com relação à sensibilidade das 173 cepas de *E. coli*, do presente estudo, aos antibióticos e quimioterápicos, verificou-se que a gentamicina foi um dos antibióticos de maior atividade, fato coincidente com os resultados de Mota et al. (2002) obtidos com cepas de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros e leitões. Palmer et al. (1980) consideram a gentamicina como uma escolha razoável, pois a maior parte das infecções por *E. coli* enterotoxigênica em bezerros resultam em alta mortalidade devido à sensibilidade limitada das cepas aos antibióticos. Todas as cepas de *E. coli* apresentaram resistência à lincomicina. Outros antimicrobianos que revelaram um porcentual bastante significativo de resistência foram a penicilina G (99,4%) e novobiocina (85,5%). Todas as cinco cepas de *S. Dublin* foram resistentes à penicilina G. Os antimicrobianos que apresentaram as melhores atividades contra *S. Dublin* foram a da kanamicina (80,0%), a do

cloranfenicol, a da estreptomicina, a da gentamicina, a da tetraciclina e a do trimetoprim-sulfadiazina (60,0%). Esse alto percentual de resistência e multirresistência apresentado pelos enteropatógenos testados, pode ser devido à presença do fator R (NAKANO et al. 1988) que é disseminado por causa da utilização abusiva e indiscriminada dessas drogas.

ARTIGO RECEBIDO: Maio / 2004
APROVADO: Dezembro / 2005

BIBLIOGRAFIA

ACRES, S. D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in new born calves: A review. **Journal Dairy Science**, v.68, p.229-256, 1985.

AMBROSIM, J. A., ALMEIDA, F. S., RIGOBELLO, E. C., CASTRO, A. F. P., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., QUINTANA, J. L., ÁVILA, F. A. Epidemiological, antigenic and pathogenic profile of bovine diarrhea in a Brazilian cattle population. **Revue d'élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux**, v.55, n.1, p.15-20, 2002.

ANDERSON, M., BLACHARD, P. The clinical syndromes caused by *Salmonella* infection. **Veterinary Medicine**, v.85, n.8, p.816, 1989.

AURICH, J. E., DOBRINSKI, I., GRUNERT, E. Intestinal cryptosporidiosis in calves on dairy form. **Veterinary Record**, v.127, p.380-381, 1990.

ÁVILA, F. A., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., ÁVILA, S. H. P., QUINTANA, J. L. Evaluation of the immunizing efficiency of a pili k99 – Bearing vaccine for the protection of cattle against colibacillosis. **ARS Veterinaria**, v.2, n.7, p.217-220, 1986.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. G., TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

CAMPOS, L. C., HOFER, E. Antimicrobial resistance among *Salmonella* serovars isolated from different sources in Brazil during 1978-1983. **Antonie Leeuwenhoek**, v.55, n.4, p.349-359, 1989.

CASTRO, A. F. P., SERAFIM, M. B., RANGEL, H. A., GUERRANT, R. G. Swiss and inbred mice in the infant mouse test for the assay of the *E. coli* thermostable enterotoxin. **Infection Immunity**, v.22, p.972-974, 1978.

CHARLES, T. P., FURLONG, J. (Ed.) **Diarréia dos bezerros**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. p.1-38.

CURRENT, W. I. Cryptosporidiosis. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.187, p.1334-1338, 1985.

DE GRAAF, F. K., ROORDA, I. Production and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from enteropathogenic *Escherichia coli* strains B41 M. **Infection Immunity**, v.36, p.751, 1982.

DEAN, A. G., CHING, Y. C., WILLIAMS, R. G., HARDER, L. B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. **Journal Infection Disease**, v.125, p.407-411, 1972.

EDWARDS, P. R., EWING, W. H. Identification of enterobacteriaceae. 3thed. Minneapolis: Burgess Publishing, 1972. p.85-90.

FAIRBROTHER, J. M., LARIVIERE, S., LALLIER, R. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O155 strains isolated from piglets with diarrhea. **Infection Immunity**, v.51, n.1, p.10-15, 1986.

GARCIA, A. M., LIMA, J. D. Prevalência de *Cryptosporidium* sp em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. **Revista Brasileira Parasitologia**, v.3, p.23-28, 1994.

GARCIA, A. M., LIMA, J. D., FACURI FILHO, E. J., LOSS, A. C. S. Ocorrência de criptosporidiose em bezerros lactentes de Minas Gerais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 6., 1989, Bagé, RS. **Anais...** p.122.

GLANTZ, P. J., DUNNE, H. W., HEIST, C. E., HOKANSON, J. F. Bacteriological and serological studies of *Escherichia coli* serotypes associate with calf scours. **Pennsylvania State University Bulletin**, v.654, p.1-22, 1959.

HENRIKSEN, S. A., POHLENS, J. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.22, p.594-596, 1981.

KIRKPATRICK, C. E. *Cryptosporidium* infection as a cause of calf diarrhea. **Veterinary Clinical American Food Animal Practical**, v.1, n.3, p.515,528, 1985.

KROGH, H. V. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with acute neonatal diarrhea. **Nordland Veterinary Medicine**, v.35, p.346-352, 1983.

KUCHEMUCK, M. R. G., SADATSUNE, T., FIGUEIREDO, G., LOPES, C. A. Estudo clínico de enterites bacterianas de bezerros com isolamento, identificação dos agentes e tratamento dos animais doentes com sulfato de apromicina em Botucatu, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19., 1984, Belém, PA. **Anais...** p.68.

LARIVIERE, S., LALLIER, R., MORIN, M. Evaluation of various methods for detection of enteropathogenic *Escherichia coli* in diarrheic calves. **American Journal Veterinary Research**, v.40, n.1, p.130-134, 1979.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **Journal Infection Disease**, v.155, n.2, p.377-389, 1987.

MADRUGA, C. R., SCHENK, M. A. M., GOMES, A., SCHENK, J. A. P., KESSLER, R. H., GOMES, R., FARIA FILHO, T. T., GALLES, M. E. T., DIEDERICHSEN, W. M., ANDREASI, M. S. A., MELO, H. J. H., RIBEIRO, O. C., MIGUITA, M. Identificação das principais causas de morbidade e mortalidade de bezerros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 1992, Florianópolis, SC. **Anais...** p.35.

MOON, H. W., Mc LURKIN, H. W., ISAACSON, R. E., POHLENZ, J., SKARTVEDT, S. M., GILLETTE, K. G., BAETZ, A. L. Pathogenic relationship os rotavirus, *Escherichia coli* and other agent in mixed infections in calves. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.173, p.577-583, 1978.

MORRIS, J. A., THORNS, C. J., SOJKA, W. J. Evidence for two adhesive antigens on the K99 references strains *Escherichia coli* B41. **Journal General Microbiology**, v.118, p.107-113, 1980.

MOTA, R. A. Eficácia do Nuflor no tratamento de diarreias em bezerros e leitões. **Veterinary News**, v.48, n.1, p.9-17, 2002

NAKANO, T., HAMAOKA, H., TERAKADO, N. Drug resistance and R plasmids os the *Salmonella* isolated from calves in 1984-1987. **Japan Veterinary Medical Association**, v.41, n.11, p.806-808, 1988.

ORSKOV, I. F., SMITH, H. W., SOJKA, W. J. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strain. **Acta Pathology Microbiology Scandinave**, v.83, p.31-36, 1975.

ORTOLANI, E. L. Padronização da técnica de Ziehl Neelsen para pesquisa de oocisto de *Cryptosporidium*. Estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerros de rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo. São Paulo. 85p. (Tese doutorado - em Parasitologia). Universidade de São Paulo.

PALMER, G., WARD, D., BALDWIN, B. H., TENANT, B. Effect of flunixin meglumine on fecal volume in experimental enteric colibacillosis of calves. In: CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS AN ANIMAL DISEASES, 11., 1980, Chicago. **Proceeding...** p.234-238.

RIBEIRO, O. C., SILVA, J. A. H. Isolamento e identificação de bactérias em bezerros na MRH Piemonte Damantina-Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17. 1982, Florianópolis. **Resumos...** p.48-52

SMITH, H. W., HALLS, S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation on *Escherichia coli* infections in pig, calves, lambs and rabbits. **Journal Pathology**, v.93, p.499-529, 1967.

SOUZA, P. J. C. Importância do *Cryptosporidium tyzzer*, 1907 (Aplicomplexa: *Cryptosporidiidae*) nas diarreias de bezerros da Bacia leiteira do Sul Fluminense. Rio de Janeiro, 1991. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

TZIPORI, S. The relative importance of enteric pathogens affecting of domestic animals. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.29, p.103-203, 1985.

TZIPORI, S., SMITH, M., HALPIN, C. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. **Veterinary Record**, v.112, p.116-120, 1983.

UPTON, S. J., CURRENT, W. L. The species of *Cryptosporidium* (Aplicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting mammals. **Journal Protozoology**, v.71, n.1, p.625-629, 1985.