

Monalisa de Sousa Moura Souto

Sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* patogênica e *Salmonella* spp. isoladas de fezes de bezerros do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Andrey Pereira Lage

Coorientadora: Ana Paula Reinato Stynen

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária/UFMG
2011**

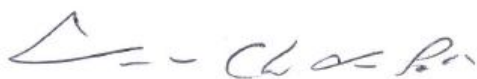
S728s. Souto, Monalisa de Sousa Moura, 1985-
Sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* patogênica e *Salmonella spp.*
isoladas de fezes de bezerros do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais /
Monalisa de Sousa Moura Souto. – 2011.
64 p. : il.

Orientador: Andrey Pereira Lage
Co-orientadora: Ana Paula Reinato Stynen
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

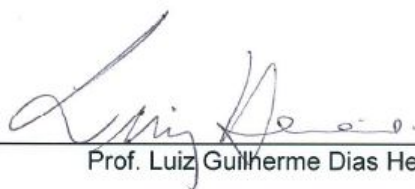
1. Bezerro – Doenças – Teses. 2. Diarreia em bezerro – Teses. 3. *Escherichia coli* –
Teses. 4. *Salmonella* – Teses. 5. Antimicrobianos – Teses. I. Lage, Andrey Pereira.
II. Stynen, Ana Paula Reinato. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.214 089 693

Dissertação defendida e aprovada em 18 de fevereiro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente



Prof. Luiz Guilherme Dias Heneine



Prof. Elias Jorge Facury Filho

Dedico à minha mãe pelo apoio incondicional, minha mestra, verdadeiro modelo de perseverança, dedicação e paciência. Mais do que para mim, esse é um sonho dela.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela oportunidade, força e coragem dada para mais esta vitória.

À minha mãe, Rosângela, por toda batalha dedicada a mim, pela compreensão, carinho, palavras de ânimo, incessantes incentivos e pela certeza da vitória.

Ao meu pai, Dásio, pela confiança, expressões demonstradas e às vezes caladas, mas sempre com orgulho no coração.

Aos meus irmãos, Leandro e Pedro Lucas, pelo carinho, incentivo, amor. Pelos choros nas despedidas, pelas contagens regressivas para o encontro. Eu os amo muito e digo que apesar de tudo, valeu à pena.

Ao Ernesto, meu noivo, por ter me dado força, carinho e amor. Por ter suportado todos meus momentos de estresse, de desânimo, de tristeza, por ter resistido a distância. Te amo.

À vovó Nair e toda a família pelo carinho, amor, orgulho, almoços e jantares especiais que tornaram meus dias de folga muito agradáveis e me deram ânimo para continuar a caminhada.

Ao Alex e a Daiane pelo companheirismo, carinho e generosidade, se tornando uma extensão da minha família.

À Telma, por ter me iniciado no laboratório, me acolhido em sua casa, em seu quarto. Obrigada pela amizade, carinho e ensinamentos.

À Juliana que me ajudou no laboratório e principalmente, na vida, me escutando e aconselhando em vários momentos difíceis que passei.

À Jordana que foi meu braço direito no laboratório e tornou meus dias e finais de semana bem mais divertidos.

Agradeço a todos do laboratório, Giovanna, Ana Paula, Telma, Juliana, Jordana, Fernanda, Elaine, Danilo, Karina, Ethiene, Clarice. E não poderia deixar de esquecer a Rebequinha. Vocês me ensinaram muito, me fizeram crescer e adquirir uma enorme experiência. Esses com certeza foram os anos que mais aprendi em toda minha vida. Muito obrigada!

À minha coorientadora, Ana Paula, por me guiar, ensinar.

Ao meu orientador, Andrey, por ter me acolhido, ajudado, ensinado, no laboratório e em todos os momentos difíceis que passei longe de casa.

Ao professor Marcos, por nos acolher sempre e por todo carinho.

Aos professores e funcionários da Escola de Veterinária – UFMG.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS DA DIARREIA EM BEZERROS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	10
1. DIARREIA EM BEZERROS	11
1.1. AGENTES ETIOLÓGICOS E FISIOPATOGENIA	11
1.1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
1.1.2. <i>SALMONELLA</i>	15
1.2. TRATAMENTO	16
1.3. CONTROLE E PREVENÇÃO	18
2. ANTIMICROBIANOS	18
2.1. CLASSE DOS ANTIMICROBIANOS	19
2.1.1. ANTIMICROBIANOS QUE INTERFEREM NA SÍNTESE OU AÇÃO DO FOLATO	19
2.1.2. ANTIMICROBIANOS B-LACTÂMICOS	20
2.1.3. AGENTES ANTIMICROBIANOS QUE AFETAM A SÍNTESE DAS PROTEÍNAS BACTERIANAS	21
2.1.4. AGENTES ANTIMICROBIANOS QUE AFETAM A TOPOISOMERASE II	24
2.2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	25
2.3. USO DE ANTIMICROBIANOS EM MEDICINA VETERINÁRIA	29
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

CAPÍTULO 2

SENSIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>SALMONELLA</i> SPP. DIARREIOGÊNICAS ISOLADAS DE BEZERROS EM MINAS GERAIS	43
RESUMO	44
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
3. RESULTADOS	48
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÃO.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

Cap. 2: Sensibilidade aos agentes antimicrobianos de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. diarreiogênicas isoladas de bezerras em Minas Gerais

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade a nove antimicrobianos de 62 amostras de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica isoladas de bezerras do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2006 a janeiro de 2007	50
Tabela 2: Prevalência de resistência a várias classes de antimicrobianos de 62 amostras de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica isoladas de bezerras do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2006 a janeiro de 2007.	51
Tabela 3: Resistência aos antimicrobianos de 62 amostras diarreiogênicas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerras do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2006 a janeiro de 2007, a nove antimicrobianos.....	53
Tabela 4: Perfil de susceptibilidade a nove antimicrobianos de 26 amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de bezerras do Centro Oeste de Minas Gerais, Brasil, no período de junho a outubro de 2008.....	55
Tabela 5: Prevalência de resistência a várias classes de antimicrobianos de 26 amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de bezerras do Centro Oeste de Minas Gerais, Brasil, no período de junho a outubro de 2008.....	56

Tabela 6: Resistência aos antimicrobianos de 26 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de bezerras no Estado de Minas Gerais, Brasil, no período de junho a outubro de 2008, a nove antimicrobianos.57

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS DA DIARREIA EM BEZERROS

Resumo

Esta atualização sobre diarreia em bezerros tem como objetivo abordar sobre os principais agentes bacterianos causadores de diarreia (*Escherichia coli* e *Salmonella* spp.), sua fisiopatogenia, tratamento e prevenção. Além disso, aborda o uso de antimicrobianos na Medicina Veterinária, características das classes dos antimicrobianos e seus mecanismos de resistência.

Palavras-chave: diarreia, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., antimicrobianos, resistência.

Abstract

This update on diarrhea in calves aims to approach on the main bacterial causes of diarrhea (*Escherichia coli* and *Salmonella* spp.), their pathogenesis, treatment and prevention. Approaching use of antimicrobials in veterinary medicine, the characteristics of classes of antimicrobials and their mechanisms of resistance.

Keywords: diarrhea, *Escherichia coli*, *Salmonella* pp., antimicrobial, resistance.

Introdução

A diarreia em bezerros é uma das mais importantes enfermidades, sendo responsável por significativas perdas econômicas na atividade agropecuária, resultante de mortalidade, custos com tratamento, perda de peso, baixa conversão alimentar (Bruning-Fann e Kaneene, 1996; Barrington et al., 2002).

A diarreia ocorre nos primeiros meses de vida e é devido a uma alteração da função gastrointestinal com hipersecreção intestinal ou má absorção e digestão, caracterizada por aumento na frequência de defecação ou aumento do volume das fezes (Radostits, 2007). Pode ser causada por enteropatógenos bacterianos, virais e parasitários ou pode ter etiologia não infecciosa, devido principalmente a erros de manejo alimentar e higiênico (Alves, 1997; Benesi, 1999; Langoni et al., 2004).

Os principais enteropatógenos causadores de diarreia de origem bacteriana são a *Escherichia coli* (*E. coli*) e a *Salmonella* e apesar de ambas provocarem diarreia, a doença causada pelas duas espécies possui algumas características diferentes. A infecção por *E. coli* acomete bezerros mais jovens, nos primeiros dias de vida, causando infecções principalmente, no intestino delgado superior. A salmonelose, por outro lado, acomete bezerros mais velhos, sendo comum até os três meses de idade, localizando-se principalmente, no íleo-cólon, cuja mucosa é invadida pela bactéria ocasionando diarreia do tipo inflamatória.

As diarreias resultantes de infecções por *E. coli* são não inflamatórias, do tipo aquosa, também chamada de secretória. Este tipo de diarreia resulta do aumento da secreção de cloreto para o lúmen intestinal. Além disso, ocorre o comprometimento da absorção de sódio e o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal (Pawlowski et al., 2009).

A salmonelose em bezerros é provocada, principalmente, por dois sorotipos de *Salmonella*, *S. Typhimurium* e *S. Dublin*, e a infecção causada por estes sorotipos possui algumas características distintas. A *S. Typhimurium* permanece localizada no intestino e linfonodos mesentéricos, enquanto *S. Dublin* é mais invasiva e pode levar à infecção sistêmica provocando septicemia (Santos et al., 2002).

A identificação do agente infeccioso causador da diarreia em bezerros é de extrema importância, assim como a pesquisa sobre a sensibilidade e resistência das amostras aos antimicrobianos. O diagnóstico correto direciona a tomada de decisão em relação ao uso de antimicrobianos eficazes e minimiza a ocorrência de resistência bacteriana. Esta é uma preocupação nos tratamentos devido ao crescente desenvolvimento de resistência a estes, e por ser zoonoses, aumentam o risco para saúde pública, com a possibilidade de transferência de bactérias com genes de resistência antes não observados em humanos. Além disso, a identificação do perfil de sensibilidade e resistência de amostras aos antimicrobianos pode ser usado como marcador epidemiológico.

1. Diarreia em bezerros

A diarreia em bezerros é considerada uma síndrome, pois decorre de uma interação entre fatores como a imunidade, o ambiente, a nutrição e a infecção por diferentes microrganismos com potencial patogênico (Benesi, 1999). Independente dos fatores associados haverá sempre uma alteração da função gastrointestinal com hipersecreção ou má absorção e digestão, resultando em diarreia.

A diarreia é uma das mais importantes doenças de bezerros neonatos da produção de leite e de carne. Ela é responsável por grandes prejuízos econômicos na atividade agropecuária devido aos índices de mortalidade dos animais afetados, os custos com tratamentos e ainda, à perda de peso e o menor desenvolvimento dos bezerros doentes em relação aos sadios (Bruning-Fann e Kaneene, 1996; Barrington et al., 2002).

No Brasil, a diarreia é uma das doenças que mais provocam prejuízos na criação de bezerros. Nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, a diarreia, a tristeza parasitária e a pneumonia são responsáveis pelas maiores perdas econômicas, seja pela mortalidade ou pelo gasto com o tratamento dos animais doentes (Leite e Lima, 1982; Feitosa et al., 2001; Botteon et al., 2001). Estudos mostram que a frequência de bezerros com fezes características de diarreia é alta (19,75%) na região do Médio Paranaíba – Rio de Janeiro e Minas Gerais (Botteon et al., 2008), onde estão localizados grandes rebanhos produtores de leite.

1.1. Agentes etiológicos e fisiopatogenia

Enteropatógenos de origem bacteriana, viral e parasitária podem estar envolvidos isoladamente ou associados na patogênese da diarreia, com destaque para *E. coli*, *Salmonella spp.*, rotavírus, coronavírus, *Eimeria spp.*, *Giardia* e *Cryptosporidium spp.* (Alves, 1997; Langoni et al., 2004). A diarreia também pode ser de etiologia não infecciosa ocorrendo em decorrência, principalmente, de erros de manejo alimentar e de higiene. Essa condição pode ser precursora das diarreias infecciosas, uma vez que os animais ficam debilitados e susceptíveis a infecções (Benesi, 1999).

Os microrganismos bacterianos mais comumente encontrados e de maior importância econômica para diarreia em bezerros são a *E. coli* e a *Salmonella* spp., que causam a colibacilose e a salmonelose, respectivamente (House, 1978; Radostits, 2007).

1.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bastonete Gram-negativo, anaeróbico facultativo, móvel ou imóvel. É um importante comensal da microbiota intestinal dos mamíferos saudáveis, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro (Nataro e Kaper, 1998; Wu et al., 2008). No entanto, ao adquirirem e expressarem uma combinação de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposons e ilhas de patogenicidade, além de bacteriófagos, torna-se um patógeno altamente adaptado, capaz de causar uma variedade de doenças, desde gastroenterites a infecções extraintestinais como os do trato urinário, septicemia e do sistema nervoso central (Pizarro-Cerdá e Cossart, 2006; Croxen e Finlay, 2010).

Existem seis patótipos de *E. coli* causadoras de infecções intestinais: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga/*E. coli* enterohemorrágica (STEC/EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (Nataro e Kaper, 1998; Kaper et al., 2004; Croxen e Finlay, 2010). Em bovinos os patótipos ETEC, EPEC e STEC/EHEC são os principais causadores de diarreia e disenteria, sendo o primeiro o mais comumente associado com diarreia em bezerros (Franck et al., 1998; DebRoy e Maddox, 2001; Ok et al., 2009).

***E. coli* enterotoxigênica (ETEC)**

As *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) são consideradas a principal causa de diarreia em bezerros (Acres, 1985; Qadri et al., 2005; Ok et al., 2009). Produzem citotoxinas e causam diarreia aquosa aguda em bezerros recém-nascidos nos primeiros dias de vida de coloração amarela, branca-acinzentada, sendo 80% dos casos de diarreia por ETEC em bezerros de até quatro dias de vida. Raramente provoca diarreia em bezerros mais velhos ou em animais adultos (Acres, 1985; Butler e Clarke, 1994; Ok et al., 2009). Pode levar a bacteremia e morte do animal infectado se este não for rapidamente tratado com fluido, eletrólitos e antimicrobianos (DebRoy e Maddox, 2001).

Após ingestão, as ETEC colonizam a mucosa do jejuno distal e íleo proximal via fatores de colonização (CF) como fímbrias ou outras adesinas (DebRoy e Maddox, 2001; Qadri et al., 2005; Croxen e Finlay, 2010). Algumas infecções podem resultar em atrofia das vilosidades e bacteremia ou podem causar poucos danos estruturais ao enterócito, porém, a presença de enterotoxinas levam a graves alterações fisiológicas nas funções dos enterócitos, como hipersecreção de fluidos dentro do lúmen intestinal (Acres, 1985; DebRoy e Maddox, 2001).

Adesinas e toxinas são dois fatores de virulência importantes em amostras de ETEC (Mitchell et al., 1974). As adesinas de maior importância são a K99 e a F41, elas podem estar combinadas ou não na mesma amostra ETEC de bezerros (Acres, 1985; Jay et al., 2004). O pili K99 liga-se ao receptor N-glicolilneuramínico-GM3 presente nas células do intestino delgado do hospedeiro possibilitando a aderência da bactéria que se multiplica e secreta toxinas que causam a diarreia (Jay et al., 2004).

As enterotoxinas são peptídeos ou proteínas extracelulares classificadas como termolábil (LT) ou termoestável (ST). As

ST podem ainda ser classificadas em STa e STb, sendo a primeira de grande importância no desenvolvimento de doença em bezerros e em seres humanos (Foster e Smith, 2009; Croxen e Finlay, 2010). A toxina LT é uma proteína de alto peso molecular com estrutura e função similares à da toxina da cólera e que é encontrada em ETEC isoladas de humanos e suínos (Acres, 1985; Qadri et al., 2005). Ela liga-se aos receptores presentes no enterócito e uma vez interiorizada, modifica o componente α da proteína G (Gsa), que regula a atividade da adenil ciclase que, por sua vez, provoca aumento do conteúdo de cAMP e consequente perda de íons-cloro e água (Argenzio, 1985). A toxina ST é uma proteína de baixo peso molecular e atua sobre a guanilato ciclase, levando ao aumento do cGMP e ativa o CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), resultando em falha na absorção de Na^{+2} e efluxo de água para dentro do lúmen (Croxen e Finlay, 2010; Krause et al., 1994). A produção de toxinas é dependente do pH do meio e se torna limitada quando este é menor do que 7,0 (Foster e Smith, 2009). Ambas as toxinas atuam como segundo mensageiro para ativar proteína quinase II que induz secreção de cloreto que por sua vez, atrai osmoticamente a água para o lúmen intestinal, superando a capacidade de absorção das vilosidades, resultando em diarreia (Argenzio, 1985; Golin-Bisello et al., 2005).

***E. coli* enteropatogênica (EPEC)**

As *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) pertencem a família de patógenos que formam lesões conhecidas como *attaching and effacing* (A/E) nas células epiteliais intestinais, esta família também inclui as EHEC. As bactérias aderidas às células epiteliais destroem as microvilosidades e subvertem a actina celular do hospedeiro para formar uma estrutura semelhante a um pedestal, em

cima do qual permanecem intimamente ligadas (Kaper, 1994; Kenny et al., 1997; DebRoy e Maddox, 2001).

As moléculas requeridas para indução da lesão de A/E são codificadas na ilha de patogenicidade LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), que é organizada em 5 operons policistrônicos LEE1 a LEE5. Os produtos codificados por ela são: o sistema de secreção tipo III (TTSS) (LEE1 a LEE3); o sistema de translocação de proteínas (LEE4) e os genes do operon *eae* e *tir* no operon LEE5 (Barba et al., 2005; Gyles, 2007). O TTSS é injetado dentro da célula alvo do hospedeiro onde é fosforilado e então inserido na membrana citoplasmática do enterócito passando a translocar diretamente proteínas efetoras da bactéria para dentro do citoplasma da célula do hospedeiro num único passo (DebRoy e Maddox, 2001).

A adesina intimina, uma proteína de 94 kDa da membrana externa da bactéria é codificada pelo gene *eae* e é responsável pela aderência às células hospedeiras. O receptor epitelial para a intimina recebe o nome de Tir (*translocated intimin receptor*) e é uma proteína também codificada pela LEE que é translocado pelo TTSS e inserido na membrana citoplasmática do enterócito onde também funciona como um receptor para outras moléculas codificadas pelo LEE (Kenny et al., 1997; Oswald et al., 2000). Além disso, após a fosforilação, a proteína Tir recruta Nck que ativa proteína da síndrome neural Wiskott-Aldrich (N-WASP) e o complexo de proteína 2/3 relacionado à actina (ARP2/3) para mediar o rearranjo de actina e formação do pedestal (Croxen e Finlay, 2010).

As EPEC possuem um grande repertório de proteínas efetoras que são translocadas para dentro da célula do hospedeiro pelo TTSS subvertendo assim, o processo celular do hospedeiro, como por

exemplo, a formação do rearranjo do citoesqueleto e modulação imune, bem como contribuem para a diarreia. Algumas dessas proteínas efetoras translocadas são: a Map (proteína associada à mitocôndria) que pode atuar regulando o dinamismo da actina e quebrar a estrutura e função da mitocôndria; EspF que desencadeia morte mitocondrial, inibe a fagocitose e destrói junções intercelulares; EspB que tem duplo papel, uma como proteína de translocação de TTSS e outra como efetora que previne a fagocitose; Cif que é responsável pela prevenção da progressão do ciclo celular e induz a apoptose; BFP (*bundle-forming pili*) que forma adesões localizadas (Croxen e Finlay, 2010).

A diarreia provocada por EPEC, frequentemente crônica e mucóide, ocorre pela perda de superfície absorptiva ocasionada pela formação dos pedestais e consequente destruição das microvilosidades. Essas modificações provocam a perda da capacidade de transdução de sinal e alterações no transporte eletrolítico celular (DebRoy e Maddox, 2001). Além disso, as infecções por EPEC provocam a destruição da função da barreira epitelial, através da perda da resistência epitelial, e aumento da permeabilidade da monocamada, que ocorre através da destruição das junções apertadas e aderentes (Muza-Moons et al., 2004).

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**

As amostras de *E. coli* classificadas como enterohemorrágicas (EHEC) caracterizam-se pela produção de no mínimo um membro da classe de citotoxinas denominadas Shiga e da lesão do tipo A/E. Amostras que produzem a toxina Shiga, mas que não são capazes de produzir lesão do tipo A/E estão incluídas nesse grupo, mas são chamadas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) (Gyles et al., 2007; Croxen e Finlay, 2010).

As EHEC colonizam o íleo distal e o intestino grosso causando gastroenterites graves. Possuem várias ORFs (*open reading frame*) que codificam fatores de virulência. Um dos principais genes de virulência é o *stx* que codifica a chamada toxina Shiga (Stx), que é semelhante à toxina produzida por espécies de *Shigella* e que inicialmente foi chamada de Verotoxina devido à observação de sua ação tóxica em células VERO, que é uma linhagem celular derivada de rim de macaco verde africano. As Stx são subdivididas em Stx1 e Stx2 e as amostras de EHEC podem produzir apenas um ou os dois subtipos da toxina Shiga (Nataro e Kaper, 1998; Pruiimboom-Brees et al., 2000).

O processo de ligação inicial de EHEC não está bem definido, mas pode envolver um pilus tipo IV, chamado de pilus coli hemorrágico, que favorece a ligação das bactérias nas células do hospedeiro. Da mesma forma que EPEC, a ligação íntima de EHEC nas células do hospedeiro ocorre através de interação de intimina e Tir. Esta aderência pode ser aumentada pela ligação da intimina com outro receptor, a nucleolina, localizada na superfície da célula hospedeira, cuja expressão é aumentada pela presença da Stx2 (Robinson et al., 2006).

O genoma de EHEC possui o mesmo LEE de EPEC, porém o mecanismo de formação da estrutura semelhante ao pedestal é ligeiramente distinto das EPEC, não ocorrendo fosforilação do Tir e a formação de pedestal é independente de Nck. O rearranjo de actina que é necessário para a formação do pedestal é mediado por TccP (*Tir cytoskeleton-coupling protein*), que se liga ao Tir através de proteínas do hospedeiro IRTKS (*insulin receptor tyrosine kinase substrate*) e interage com N-WASP para ativar o complexo ARP2/3. Outros fatores como ECP (*E. coli common pilus*) e HCP (*haemorrhagic coli pilus*) também estão ligados. As EHEC também

injetam muitas das mesmas proteínas efetoras de EPEC dentro das células do hospedeiro para manipular o processo de infecção, no qual é possível quebrar a estrutura e função da mitocôndria, inibir a fagocitose, induzir apoptose (Croxen e Finlay, 2010).

Amostras de EHEC colonizam o cólon onde causam necrose das extremidades das vilosidades. Em bezerros, a infecção por essas amostras está associada à diarreia da primeira à oitava semana de idade (China et al., 1998), é do tipo mucoide e, às vezes hemorrágica, frequentemente recorrente apesar do tratamento, resultando em desidratação, enfraquecimento e uma reduzida taxa de crescimento, mas raramente é fatal (DebRoy e Maddox, 2001).

1.1.2. *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é constituído por bactérias Gram-negativas em forma de bastonete pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São microrganismos aeróbios, em sua maioria móveis com flagelos peritríquios, não esporulados e não capsulados, oxidase negativa e catalase positiva (Uzzau e Fasano, 2000; Ibarra e Steele-Mortimer, 2009).

A *Salmonella* é uma importante causa de diarreia nos bovinos, seus sinais clínicos incluem diarreia sanguinolenta, anorexia, febre, desidratação e prostração dentro de 18 a 48 horas (Waray e Sojka, 1978; Tsois et al., 1999). As diarreias bovinas causadas por *S. Typhimurium* são do tipo inflamatória, ocorrem em animais com até três meses de idade e a infecção permanece localizada no intestino e linfonodos mesentéricos. A infecção por *S. Dublin* é invasiva e sistêmica, podendo resultar em meningoencefalite, poliartrite, osteomielite ou pneumonia em bezerros, com ou sem presença de diarreia. Em vacas e novilhas prenhes a infecção por *S. Dublin* pode

provocar abortos, assim como o sorovar *S. Newport* (Hinton et al., 1975; Rings et al., 1985; Bispham et al., 2001). A doença por *S. Dublin* está associada à morbidade em bovinos jovens e adultos (Sojka e Field, 1970; Waray e Sojka, 1978).

As diferenças observadas entre as infecções causadas por *S. Typhimurium* e *S. Dublin* ocorrem provavelmente devido a características genóticas distintas existentes entre os dois sorotipos, incluindo diferenças nos Sistemas de Secreção tipo 1 (TTSS-1) e tipo 2 (TTSS-2), codificados respectivamente pela Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 1 (SPI-1) e pela Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 2 (SPI-2), dois grandes grupos de genes associados com a invasão e a sobrevivência da bactéria dentro das células hospedeiras (Wallis et al., 1999; Tsois et al., 1999; Santos et al., 2002).

O TTSS-1 é essencial à invasão bacteriana e também promove o acúmulo de fluido e influxo de neutrófilos. É igualmente importante na fase intestinal da infecção por *S. Typhimurium* e por *S. Dublin* em bezerros. Entretanto TTSS-2 é de pouca ou nenhuma importância na infecção de *S. Typhimurium*, mas contribui para a infecção por *S. Dublin* se tornar sistêmica (Tsois et al., 1999; Wallis et al., 1999; Santos et al., 2002).

Após a ingestão e colonização intestinal de *Salmonella* pelo hospedeiro, a bactéria invade os enterócitos no epitélio intestinal alcançando a submucosa por basicamente dois processos distintos: pode ser fagocitada por fagócitos profissionais, como macrófagos, que a reconhecem efetivamente internalizando-a; ou pode também invadir células fagocíticas e não fagocíticas usando o TTSS-1, onde proteínas efetoras induzem o rearranjo do citoesqueleto de actina resultando em uma membrana ondulada localizada e rápida internalização da bactéria (Salcedo et al.,

2001; McGhie et al., 2009). Este processo é conseguido pelo complexo de translocação, através do TTSS-1, de algumas proteínas, como SipB, SipC e SipD, na membrana da célula hospedeira, que é requerido para entrega de outras proteínas para dentro do citoplasma da célula eucariótica (Fu e Galán, 1998). Em adição ao TTSS-1, adesinas fimbriais e afimbriais da superfície da *Salmonella* podem também mediar adesão e internalização da bactéria via independente do TTSS-1 (Guo et al., 2007).

Após sua internalização, a *Salmonella* sobrevive e replica dentro do fagossoma modificado, o SCV (vacúolo contendo *Salmonella*). Este processo é mediado por TTSS-1 e TTSS-2 (Ibarra e Steele-Mortimer, 2009; McGhie et al., 2009). Um conjunto de proteínas efetoras liberadas por SPI-1 (SipA, SipC, SopB, SopD, SopE e SopE2) tem a função de induzir deformação da membrana e rearranjo do citoesqueleto de actina subjacente, desencadeando internalização da bactéria dentro do SCV. O TTSS-2 tem papel na sobrevivência e replicação de *Salmonella* após invasão, evita fusão do SCV com o lisossomo e ainda parecem suprimir a apresentação de antígenos pelas células dendríticas, limitando o reconhecimento e a resposta imune do hospedeiro para as células infectadas. Os SCVs migram da borda luminal da célula para a membrana basal onde a *Salmonella* interage e entra nos macrófagos associados com as placas de Peyer's no espaço da submucosa. Os SCVs são importantes para sobrevivência e transporte da *Salmonella* nas células epiteliais e tem papel chave na sobrevivência dentro das células fagocíticas. Portanto, a habilidade de sobrevivência e proliferação nos SCVs é o principal fator de virulência para *Salmonella* (Foley e Lynne, 2007)

Ao atingir a lâmina própria da parede intestinal dos bovinos, a *Salmonella* estimula uma reação inflamatória

caracterizada por enterite fibrinopurulenta necrosante, que pode resultar na formação de uma pseudomembrana no íleo terminal e cranial (Tsolis et al., 1999). Existem dois mecanismos pelos quais *S. Typhimurium* pode estimular essa resposta inflamatória. Uma possibilidade é que quando o TTSS-1 invade e migra através das células epiteliais, ele pode facilitar o reconhecimento pelo NOD (*Nod-like receptors*) e TLR (*Toll-like receptors*), desencadeando ou estimulando diretamente eventos de sinalização pró-inflamatórios nas células do hospedeiro (Inhora et al., 2002; Sieling e Modlin, 2002). Um segundo mecanismo, é a produção, dependente de TTSS-1, de quimiocinas como da interleucina-8 (CXCL8-IL8), iniciando a cascata de sinalização (McCormick et al., 1998; Alexander et al., 2009). A resposta inflamatória pode ser também devido à morte celular de macrófagos (McGhie et al., 2009).

Após estimular a cascata de sinalização pró-inflamatória ocorre um aumento na expressão de muitas quimiocinas, como IL-8, GCP-2, GRO- α , GRO- γ no tecido intestinal e isto promove uma infiltração severa e aguda de neutrófilos para o local (Santos et al., 2002; Zhang et al., 2003). Esta reação inflamatória causa a secreção de fluido, que resulta em liberação de proteínas do soro para o lúmen intestinal e é atribuída à perda da barreira da permeabilidade intestinal (Santos et al., 2002).

1.2. Tratamento

O tratamento de diarreia com antimicrobianos nem sempre apresenta bons resultados, tornando o tratamento suporte essencial para a recuperação do animal. No entanto, o uso de um antimicrobiano específico pode diminuir a ocorrência de resistência dos microrganismos. Para tal, é necessário selecionar um agente antimicrobiano com um espectro de

atividade adequada, utilizar um protocolo de dose que atinja e mantenha concentração terapêutica eficaz no local da infecção, tratar por um período adequado, evitar resíduos e efeitos locais ou sistêmicos adversos e, minimizar o potencial para transferência de genes de resistência a antimicrobianos (Constable, 2009).

Os medicamentos devem ser administrados somente nos bezerros que apresentem sinais sistêmicos da doença como inapetência, desidratação, letargia e piroxia ou que tenham sangue ou fragmentos de mucosa nas fezes, o que é indicativo da quebra da barreira hemato-intestinal e supõe risco aumentado de bacteremia (Constable, 2009). Não é indicada a administração de antimicrobiano para bezerros diarreicos que têm apetite, nível de atividade, temperatura retal e estado de hidratação normais e ausência de infecções concomitantes tais como pneumonia ou onfaloflebite (Ortman e Svensson, 2004). Neste caso, os animais doentes devem ser separados dos saudáveis e monitorados frequentemente.

O tratamento do quadro de diarreia em bezerros consiste na eliminação do microrganismo do trato intestinal e no combate à desidratação para que a absorção normal seja restaurada o quanto antes (Foster e Smith, 2009). Para isto, pode-se fazer uso de antimicrobianos e uma adequada fluidoterapia, além destes, também pode-se usar agentes analgésicos e anti-inflamatórios, alimentação continuada de leite de vaca, vitaminas B e lipossolúveis (Constable, 2009).

Os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento de diarreia em bezerros sistematicamente doentes incluem: amoxicilina ou ampicilina (10mg/Kg, IM, 12/12h), sulfonamida (25mg/Kg, IV ou IM, 1X/dia), e amoxicilina oral (10mg/Kg, 12/12h), administrados sozinhos ou combinados com inibidor de clavulanato de

potássio (12,5mg/Kg, 12/12h) (White et al., 1981; Constable, 2004).

Antimicrobianos de segunda escolha são as cefalosporinas de terceira e quarta geração, como o ceftiofur e cefquinona; e o de terceira escolha é a fluorquinolona. A administração de fluorquinolona para animais produtores de alimentos nos Estados Unidos é proibida por lei por facilitar a emergência de bactérias com múltipla resistência a antimicrobianos (Constable, 2009).

A diarreia em bezerros pode ser acompanhada de cólicas intestinais e dor abdominal. Portanto, a administração de um analgésico eficaz pode ser benéfica como parte do tratamento, desde que os efeitos colaterais não sejam deletérios. O meloxicam e o fluxine meglumine (anti-inflamatório não esteroideal) são indicados quando utilizados em conjunto com reidratação oral (Philip et al., 2003).

Também é indicada a alimentação do bezerro com leite de vaca, pois este é uma excelente fonte de nutrição, é barato, facilmente disponível, e ainda, possui fatores de crescimento que facilitam a reparação do intestino danificado, assim como mantem o crescimento de bezerros diarreicos, desenvolvimento de maior depósito de gordura, melhor regeneração intestinal e menor atrofia tímica. A administração de eletrólitos oral é o tratamento auxiliar para muitos bezerros com diarreia. Baseado na patofisiologia dos organismos, duas características da terapia de reposição de líquidos são críticas: a primeira é maximizar a absorção de sódio e assim, melhorar o grau de hidratação do bezerro; o segundo ponto crítico é a reposição de fluidos adequados, uma vez que o bicarbonato, que é um agente alcalinizante, pode favorecer a proliferação dos microrganismos patogênicos, desta forma deve-se retirar o bicarbonato das soluções eletrólitas (Heath et al., 1989;

Foster e Smith, 2009). No entanto, formulações de fluidoterapia com bicarbonato são usadas e apresentam bons resultados.

É importante ressaltar que não somente os animais doentes devem ser tratados em uma propriedade, mas o controle e a prevenção da infecção são essenciais para a diminuição dos custos de produção associados à diarreia em bezerros.

1.2.1. Controle e prevenção

A exposição aos agentes infecciosos causadores da diarreia em bezerros pode ser diminuída pelo isolamento dos animais doentes, construção de piquete maternidade e uso de boas práticas de higiene. A resistência a doenças também pode ser aumentada assegurando alta qualidade nutricional para a mãe e o bezerro e ingestão de quantidade suficiente de colostro pelo neonato. Em um estudo realizado por Berge et al. (2006) foi demonstrado que a falha na transferência de imunidade passiva está significativamente associada ao aumento da mortalidade, ao nascimento de bezerros fracos e à grande necessidade de tratamentos terapêuticos. Além disso, a propagação de patógenos foi menor entre os bezerros que receberam quantidade adequada de colostro, que foram criados em ambiente limpo e ventilado e que receberam suporte nutricional apropriado.

A vacinação como forma de controle e prevenção de diarreias em bezerros também é uma alternativa, conseguindo reduzir o número de bezerros de uma semana que necessitam de tratamento (Khare et al., 2010). Também deve-se controlar os surtos de diarreia, reduzindo o tamanho dos lotes do rebanho para minimizar a contaminação ambiental e potencial para infecção, e implementando medidas de controle de roedores e de animais selvagens.

As medidas de prevenção e controle, bem como um adequado manejo das vacas prenhes e dos bezerros recém-nascidos são importantes para uma significativa diminuição do custo de produção da propriedade. Em um experimento realizado por Gow et al. (2005), onde utilizaram manejo sanitário e higiênico adequados, foi observado uma diminuição na taxa de mortalidade de 8,9% (32/360) em 2002 para 3,1% (7/225) em 2003, e ainda, o número de animais tratados de 90,3% para somente 20,9%. Este ganho no custo de produção é devido não somente ao menor gasto inicial do tratamento ou baixa taxa de mortalidade dos bezerros, como também ao melhor ganho de desempenho ao desmame e redução do risco de doenças no rebanho.

2. Antimicrobianos

A ação dos antimicrobianos é focada em quatro principais mecanismos biológicos: biossíntese da coenzima folato, biossíntese da parede celular, biossíntese de proteína e replicação e reparo de DNA (Walsh, 2003).

A escolha de um antimicrobiano para o tratamento de uma infecção bacteriana deve seguir determinados critérios. Em geral, dois importantes princípios são: a identificação, quando possível, do organismo infectante e a determinação de sua sensibilidade aos agentes antimicrobianos. Além disso, deve-se levar em consideração alguns aspectos do hospedeiro, como a exposição prévia a antibióticos, a idade, as funções hepática e renal, o local da infecção, a administração concomitante de outras drogas que possam interagir negativamente com o antibiótico e o fato do paciente estar prenhe ou com o

sistema imunológico comprometido (Rang et al., 1997).

A escolha do antimicrobiano deve ser baseada em características do agente etiológico e no mecanismo de ação do medicamento, uma vez que são formulados para agir especificamente em determinado alvo e que existem diferenças estruturais e metabólicas entre os microrganismos. Um bom exemplo é a classificação dos microrganismos em Gram-positivo ou Gram-negativo que é baseada na estrutura de sua parede celular e que é de fundamental importância na escolha do antimicrobiano, onde drogas que tenham baixa lipossolubilidade não conseguem atravessar a parede celular de microrganismos Gram-negativo. Outro exemplo é o tipo de membrana externa, que pode ser compacta em alguns microrganismos e em outros não, dificultando a penetração dos antimicrobianos (Chambers e Sande, 1996a ; Rang et al., 1997).

2.1. Classe dos antimicrobianos

De acordo com o mecanismo de ação dos antimicrobianos, eles são agrupados em quatro classes diferentes: os agentes antimicrobianos que interferem com a síntese ou com a ação do folato, os β -lactâmicos, os que afetam a síntese de proteínas bacterianas e os que afetam a topoisomerase II.

2.1.1. Antimicrobianos que interferem na síntese ou ação do folato

Os antimicrobianos que interferem na síntese ou na ação do folato são representados pelas sulfonamidas e pelo trimetoprim. As sulfonamidas são drogas sintéticas testadas desde 1930 por Domagk, que conseguiu demonstrar seu efeito antimicrobiano. Foram os primeiros antimicrobianos eficazes utilizados por via sistêmica na prevenção e cura das infecções

bacterianas no homem e no animal. São análogos estruturais ao ácido p -aminobenzóico (PABA), que bloqueiam diferentes passos do metabolismo do ácido fólico e interferem, portanto, na síntese de nucleotídeos (Rang et al., 1997; Walsh, 2003). São antimicrobianos bacteriostáticos com amplo espectro de ação, amplamente usados até mesmo no período do advento das penicilinas. Entretanto, devido ao aparecimento da resistência microbiana e dos vários relatos de seus efeitos adversos (salivação, diarreia, excitação, fraqueza muscular, ataxia, cristalúria sulfonamídica), seu uso tornou-se limitado, principalmente na medicina humana (Mandell e Petri Jr, 1996b).

Na década de 70, as sulfonamidas voltaram a ser usadas, mas em associação com o trimetoprim, uma diaminopirimidina. Chamada de co-trimoxazol, essa associação de drogas tem ação bactericida e age inibindo a síntese de folato e a biossíntese de DNA. Na primeira etapa, as sulfonamidas competem com o ácido PABA pela enzima diidropteroato-sintetase, que é uma enzima bacteriana responsável pela incorporação de PABA no ácido diidropteróico, precursor imediato do ácido fólico. Na segunda etapa, o trimetoprim compete com o folato pela enzima diidrofolato-redutase, que é uma enzima bacteriana que reduz o folato a tetraidrofolato. Esta redução no ácido tetraidrofolóico metabolicamente ativo, que é um cofator necessário nas reações de biossíntese dos ácidos nucleicos, diminui a síntese de DNA e proliferação celular (Mandell e Petri Jr, 1996b; Rang et al., 1997). Portanto, as sulfonamidas potencializam a ação do trimetoprim, uma vez que elas atuam na mesma via metabólica do trimetoprim, embora seja em uma fase anterior.

As sulfonamidas são rapidamente absorvidas pela via gastrointestinal. Após serem biotransformadas, principalmente no

fígado por acetilação, e conjugadas com ácido glicurônico, são excretadas na urina por filtração glomerular (Rang et al., 1997). Uma pequena proporção pode ser eliminada através de secreções como suor, saliva e leite e, por isso, preconiza-se que a utilização do leite de vacas tratadas com este quimioterápico só deva ocorrer, em média, quatro dias após a última administração (Mandell e Petri Jr, 1996b).

O emprego das sulfonamidas foi, em grande parte, substituído por outros antimicrobianos, visto que muitos dos microrganismos inicialmente sensíveis a estes quimioterápicos desenvolveram resistência. Por outro lado, na ausência da resistência, as sulfonamidas têm grande vantagem sobre vários antimicrobianos. Atualmente, elas ocupam destacado papel no tratamento de diversas infecções dos animais domésticos. Além disso, estes quimioterápicos são amplamente usados na ração de animais de criação, com o objetivo de prevenir as denominadas “doenças de confinamento” (Rang et al., 1997; Górnaiak, 2002).

O uso na medicina veterinária das sulfonamidas possui algumas vantagens, dentre elas, o baixo custo e a administração oral para ruminantes, pois, ao contrário de outros antimicrobianos de amplo espectro, elas não causam alterações na microbiota ruminal (Górnaiak, 2002).

2.1.2. Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos fazem parte de uma ampla classe de antimicrobianos, que inclui a penicilina e seus derivados, sendo o grupo de quimioterápicos mais usado. As cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a gerações têm o maior número de moléculas semi-sintéticas disponibilizadas para tratamento. Há também, os carbapenêmicos como o imipenem, o meropenem, o ertapenem e o panipenem, e os monobatâmicos, como o

aztreonam, que foram desenvolvidos para tratamentos de infecções por microrganismos Gram-negativo produtores de β -lactamases que apresentaram resistência às penicilinas de espectro ampliado (Rang et al., 1997).

O mecanismo de ação de todos os antibióticos β -lactâmicos é baseado na inibição da síntese dos peptidoglicanos da parede celular das bactérias. Eles se ligam às proteínas de ligação das penicilinas (PLP), existentes na parede celular bacteriana, responsáveis pelas ligações cruzadas entre as diferentes fitas de peptidoglicanos que dão sustentação e rigidez às bactérias. A interferência na rigidez da parede celular causa posteriormente a lise bacteriana devido às diferenças de pressão osmótica entre os meios intracelular e extracelular (Spinosa, 2002b).

As penicilinas ligam-se, preferencialmente, às PLP-1B e, as cefalosporinas e carbapenêmicos às PLP-2 e PLP-3. A ligação às PLP-4 e PLP-5 não é letal para a bactéria. Algumas das β -lactamases codificadas são específicas para as penicilinas (penicilinas), para cefalosporinas (cefalosporinas) ou para os dois grupos de antimicrobianos (mistos). A eliminação dos β -lactâmicos é principalmente renal (Mandell e Petri Jr, 1996a; Rang et al., 1997).

A penicilina foi descoberta em 1928 por Fleming que observou que uma substância solúvel originária de culturas de *Penicillium notatum* tinha ação antibacteriana. Florey, Chain e Abraham, em 1939, foram os primeiros a isolar a penicilina a partir de um extrato não purificado. Em 1940, Abraham descobriu que cepas de *E. coli* eram capazes de produzir penicilases. Em 1943, a penicilina começou a ser utilizada clinicamente. Kirby descreveu, em 1944, as primeiras falhas no tratamento causadas pela produção de β -

lactamases. Em 1945, Abraham e Chain elucidaram a estrutura da penicilina. Já em 1954, é lançada no mercado a primeira penicilina semi-sintética, a penicilina V. Em 1984, o primeiro agente bloqueador de β -lactamases, o ácido clavulânico, torna-se disponível (Rang et al., 1997).

Atualmente, as penicilinas são obtidas a partir do ácido 6-aminopenicilânico, originário do sobrenadante de culturas do fungo *Penicillium chrysogenum*. As penicilinas são bactericidas com espectro de ação amplo, cuja estrutura básica contém um anel β -lactâmico ligado a um anel tiazolidínico. Elas podem ser destruídas por enzimas β -lactamases (penicilases) que quebram o anel β -lactâmico na região do grupo carbonila, ou por amidases, que hidrolizam a ligação amídica lateral, tornando-as inativas (Mandell e Petri Jr, 1996a).

As penicilinas semi-sintéticas são derivadas da penicilina por métodos químicos industriais e surgiram na busca de medicamentos cada vez mais eficientes que pudessem atingir a grande maioria dos agentes infecciosos. Dentre elas estão amoxicilina, ampicilina, pivampicilina, flucloxacilina, carbenacilina, aziocilina e ticarcilina. Todas são sensíveis às penicilases.

Em 1948, Giuseppe Brotzu isolou a primeira fonte de cefalosporina a partir do sobrenadante das culturas de um fungo encontrado na saída de um esgoto na Sardenha, o *Cephalosporium acremonium*. Em 1961, isolou-se o núcleo central, o ácido 7-amino-cefalosporâmico (7-ACA). Atualmente, todas as cefalosporinas são derivadas do 7-ACA que possui um anel tiazolidínico ligado ao anel β -lactâmico. As cefalosporinas que possuem o radical imino metoxi são mais resistentes às β -lactamases e possuem maior atividade contra bactérias Gram-negativas. A única cefalosporina de

segunda geração que possui este radical é a cefuroxina, enquanto todas as de terceira e quarta geração, exceto a cefoperazona, possuem este radical (Spinosa, 2002b).

As cefalosporinas são, primariamente, bactericidas em concentrações terapêuticas, provocando a lise osmótica das bactérias sensíveis em crescimento. O espectro de ação de todas as cefalosporinas é amplo, sendo ativas contra cocos Gram-positivos e bactérias Gram-negativas. Assim como nas penicilinas, uma vez atingida a concentração inibitória mínima, não se aumenta mais o efeito bactericida com o aumento da concentração. As cefalosporinas induzem a produção de β -lactamases através da ativação de genes para a produção destas enzimas, que atuam contra todos os β -lactâmicos, inclusive contra elas mesmas (Mandell e Petri Jr, 1996a; Walsh, 2003;).

A excreção das cefalosporinas é feita basicamente pelo rim, principalmente pela secreção tubular. Seu uso em medicina veterinária amplia-se cada vez mais, embora o seu alto custo seja um fator limitante (Spinosa, 2002b).

2.1.3. Agentes antimicrobianos que afetam a síntese das proteínas bacterianas

A classe de antimicrobianos que interferem na síntese de proteínas bacterianas é composta pelas tetraciclinas, os aminoglicosídeos, o cloranfenicol, os macrolídeos, as lincosamidas e o ácido fusídico.

A primeira tetraciclina descoberta, a aeromicina, foi desenvolvida em 1948 por Duggar, a partir de culturas de *Streptomyces aureofaciens*. Em 1950, Finlay et al. apresentam uma segunda opção de tetraciclina, a terramicina, produzida a partir do *Streptomyces rimosus*. Logo após foram desenvolvidas tetraciclinas semi-

sintéticas, como a metaciclina, a doxiciclina em 1967 e a minociclina em 1972 (Rang et al., 1997). Nos últimos 30 anos, não houve novas inclusões de antimicrobianos a essa classe. Isto promoveu um declínio na terapia de primeira linha pelo gradual desenvolvimento de resistência bacteriana após décadas de uso.

As tetraciclinas atuam por inibição da síntese protéica pelo bloqueio da fixação do complexo aminoacil-RNA-transportador ao ribossomo 30S, o que impede a síntese de enzimas e de componentes celulares fundamentais para a célula. Elas são transportadas para o meio intracelular por um sistema especial, onde uma vez dentro da célula, não conseguem sair. Desta forma, atingem altas concentrações nas células do hospedeiro, sendo bacteriostáticas para bactérias extracelulares e bactericidas para bactérias intracelulares (Rang et al., 1997).

O espectro de ação é amplo e são eficazes contra bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* e *Salmonella* são resistentes), clamídias, riquetsias e até mesmo, contra alguns protozoários (Rang et al., 1997). Os organismos sensíveis à tetraciclina também são considerados sensíveis a doxiciclina e minociclina. Entretanto, alguns organismos de sensibilidade intermediária ou resistente à tetraciclina podem ser sensíveis a doxiciclina, minociclina ou a ambas (Performance, 2009).

Apesar de seu alto grau de resistência, as tetraciclinas ainda são muito usadas na medicina humana e animal, principalmente pelo seu baixo custo, por ser administrado por via oral e ainda, pela possibilidade de uso como promotor de crescimento em suínos e bovinos, principalmente (Sawant et al., 2007). No entanto, novas gerações de tetraciclinas estão sendo desenvolvidas a partir de modificações em sua estrutura, como a

gliciliclina que foi sintetizada em 1993, e em 2005 foi aprovada pelo FDA, sendo ativa contra inúmeras bactérias resistentes a tetraciclinas (Pereira-Maia et al., 2010). A excreção da maioria destes quimioterápicos é realizada pelas vias biliar e renal, sendo esta última por filtração glomerular (Kapusnik-Uner et al., 1996; Spinosa, 2002c).

Os aminoglicosídeos fazem parte de um grupo de fármacos compostos de um grupo amino e um grupo glicosídeo. Os medicamentos desta classe são bactericidas, inibidores da síntese proteica das bactérias sensíveis. Diversos aminoglicosídeos funcionam como antibióticos que são efetivos contra certos tipos de bactérias. Eles incluem amicacina, arbecacina, gentamicina, canamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodostreptomina, estreptomina, tobramicina e apramicina. As antraciclinas são outro grupo de aminoglicosídeos, usados na quimioterapia (Chambers e Sande, 1996b; Spinosa, 2002a).

A estreptomina foi o primeiro aminoglicosídeo introduzido na terapêutica, em 1943, pelo grupo de pesquisadores liderados por Waksman. A seguir, outros foram surgindo, como a neomicina (1949), paramomicina (1956), canamicina (1957), espectinomina (1961), gentamicina (1963), tobramicina (1968), sisomicina e ribostamicina (1970), netilmicina (1975), entre outros.

Os aminoglicosídeos são divididos em natural ou em semi-sintéticos, de acordo com sua origem. Dentre os naturais estão a estreptomina (*Streptomyces griseus*), a neomicina (*Streptomyces fradiae*), a gentamicina (*Micromonospora purpúrea*), a tobramicina (*Streptomyces tenebrarius*) e a canamicina (*Streptomyces kanamyceticus*). Entre os semi-sintéticos estão a netilmicina (sisomicina) e a amicacina (canamicina).

Esses medicamentos têm sido amplamente usados desde sua descoberta por possuírem ação bactericida e sinergismo com outros antibióticos (Chambers e Sande, 1996a).

A destruição bacteriana provocada pelos aminoglicosídeos depende da sua concentração, quanto maior, mais eficiente. Além disso, este grupo de antimicrobianos possui um efeito pós-antibiótico, isto é, persistência da atividade bactericida residual após a queda da concentração plasmática abaixo da concentração inibitória mínima. Esta duração da atividade também depende da concentração do fármaco e deve-se à retenção do aminoglicosídeo na célula bacteriana (Rang et al., 1997).

Os aminoglicosídeos têm como alvo o ribossomo e ligam-se às aminoacil-tRNA sintetase inibindo, consequentemente, a síntese de proteínas (Carter et al., 2000). São potentes drogas contra bactérias Gram-negativas e, em combinações sinérgicas com agentes antimicrobianos ativos na parede celular, podem ser efetivas contra bactérias Gram-positivas resistentes (Rang et al., 1997; Walsh, 2003; Methods, 2009). A gentamicina é o aminoglicosídeo mais comumente usado e o de primeira escolha em virtude de seu baixo custo e sua atividade confiável contra todos os aeróbios Gram-negativos. A ampicilina tem o mais amplo espectro antimicrobiano e, juntamente com a metilmicina, é eficaz em infecções por microrganismos resistentes à gentamicina e à tobramicina. A neomicina e a frameticina são muito tóxicas para serem usadas por via parenteral, sendo administradas apenas topicamente. Os aminoglicosídeos não são absorvidos na via gastrointestinal, exceto pelo uso em neonatos com enterocolite necrosante, sendo geralmente administrados por via intramuscular ou endovenosa (Rang et al., 1997).

Os aminoglicosídeos são inicialmente transportados através da parede celular e da membrana citoplasmática, ligando-se, posteriormente, aos receptores nas unidades ribossomais 30S. O antimicrobiano associa-se com a superfície aniônica da bactéria Gram-negativa e, na sequência, passa pelo canal porínico da membrana externa. Após atravessar as membranas, a droga se liga à unidade ribossomal 30S provocando erro na leitura do RNAm e impedindo o deslocamento do ribossomo pelo filamento de RNAm, o que resulta na inibição da síntese de proteínas (Chambers e Sande, 1996b). Devido ao transporte do aminoglicosídeo através da membrana citoplasmática ser um processo ativo e dependente de oxigênio, as bactérias anaeróbicas estritas são resistentes a essa classe de antimicrobianos. Eles não interferem na síntese proteica das células dos animais superiores por não conseguirem se ligar às subunidades ribossomais 40S e 60S (Spinosa, 2002a).

O cloranfenicol é um antibiótico que se liga à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, mesmo sítio de ação da eritromicina e da clindamicina. É de amplo espectro, eficaz no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e por riquetsias. São bacteriostáticos e seu uso clínico deve ficar reservado para infecções graves, nas quais os benefícios do antimicrobiano sejam maiores que o risco de toxicidade (Kapusnik-Uner et al., 1996). Na medicina veterinária está limitado a animais de estimação e animais não destinados ao consumo. Seu uso foi banido na União Européia, Estados Unidos, Canadá e em muitos outros países, inclusive no Brasil, para proteção do consumidor dos potenciais efeitos adversos resultantes de resíduos de cloranfenicol em carcaças de animais (Ferguson et al., 2005).

Os macrolídeos são representados pela eritromicina, claritromicina e azitromicina. Eles inibem a síntese de proteína, no entanto, por terem ação bactericida ou bacteriostática, dependem da concentração do antimicrobiano e do microrganismo. O sítio de ação é o mesmo do cloranfenicol e da clindamicina e, os três agentes podem competir entre si quando administrados simultaneamente (Kapusnik-Uner et al., 1996).

As lincosamidas, como por exemplo, a clindamicina, são usadas clinicamente no tratamento das infecções causadas por *Bacteróides* sp. e nas infecções ósseas e articulares por estafilococos. Seus efeitos indesejáveis consistem, basicamente, em distúrbios gastrointestinais.

O ácido fusídico tem um espectro restrito de ação, sendo ativo, principalmente, contra bactérias Gram-positivas, provocando efeitos indesejáveis como distúrbios gastrointestinais, erupções e icterícia (Rang et al., 1997; Spinoso, 2002c).

2.1.4. Agentes antimicrobianos que afetam a topoisomerase II

Esta classe de antimicrobianos é representada pelas quinolonas e fluorquinolonas, ambas derivadas do ácido nalidíxico. Porém, as fluorquinolonas apresentam um átomo de flúor ligado ao seu anel, o que não é observado nas quinolonas. Elas possuem uma estrutura de anel básico, no qual se liga um ácido carboxílico na posição três e, no caso das fluorquinolonas, um flúor na posição seis. Muitos destes componentes também possuem uma piperazina na posição sete.

As quinolonas foram descobertas por Leshner em 1962, mas seu uso permaneceu latente por mais de duas décadas. O ácido nalidíxico foi o primeiro

antimicrobiano dessa classe a ser usado clinicamente. Na década de 1980, as fluorquinolonas foram introduzidas no tratamento contra agentes infecciosos (Acar e Goldstein, 1997).

São bactericidas para a maioria das bactérias Gram-negativas e atuam inibindo as enzimas de replicação e reparo do DNA, como a topoisomerase II (girase do DNA) e IV, que são enzimas responsáveis pela manutenção de um DNA funcional (Walsh, 2003). Takei et al. (2001) mostraram que algumas fluorquinolonas como norfloxacin, ciprofloxacina e levofloxacin apresentam preferência para alvo a topoisomerase tipo IV, enquanto esparfloxacina e nadifloxacina para a topoisomerase tipo II (DNA girase). Gatifloxacina, moxifloxacina e outras têm preferência para alvo a topoisomerase tipo II e IV, igualmente. As fluorquinolonas têm excelente distribuição nos tecidos e fluidos corporais. Dentre elas, a ciprofloxacina é a que apresenta maior espectro de ação contra bastonetes aeróbios Gram-negativos (Rang et al., 1997).

As quinolonas de primeira geração estão, cada vez mais, caindo em desuso com a descoberta de novas substâncias. Quando comparadas com as fluorquinolonas, possuem menor espectro de ação e o desenvolvimento de resistência microbiana ocorre bem mais rapidamente. Elas possuem pequeno espectro de ação, agindo somente contra *E. coli*, *Proteus sp.* e *Pseudomonas*, enquanto as fluorquinolonas possuem largo espectro de ação e são usadas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Staphylococcus*, incluindo aqueles resistentes à metilicina (Górniak, 2002).

As vias de eliminação diferem entre as quinolonas. A secreção renal predomina para a ofloxacina, a lomefloxacina, a norfloxacina, a

ciprofloxacina e a cinoxacina. A perfoxacina e o ácido nalidíxico são, predominantemente, eliminados por via não-renal (Górniak, 2002).

Há diferenças nas propriedades farmacodinâmicas de cada fluorquinolona e, provavelmente, devido a isso, pode-se observar uma grande variação na concentração inibitória mínima e na sensibilidade aos antimicrobianos (Boyd et al., 2009).

2.2. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

O surgimento de drogas eficazes e seguras contra infecções bacterianas foi um grande avanço que tornou o tratamento médico mais efetivo, bem como diminuiu, drasticamente, a morbidade e a mortalidade relacionadas às doenças microbianas (Rang et al., 1997; Mota et al., 2005).

Infelizmente, juntamente com o desenvolvimento de defesas quimioterápicas contra os microrganismos, estes também desenvolveram mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Esses mecanismos surgem, basicamente, devido à capacidade de adaptação genética dos microrganismos às alterações ambientais (Khachatryan et al., 2005).

A resistência aos antimicrobianos está relacionada não somente ao uso desses, mas também com o notável número de mecanismos genéticos para desenvolvimento de resistência presentes nas bactérias, como a possibilidade de sofrer mutação cromossômica, de manifestar um gene latente de resistência cromossomal, de adquirir novo material de resistência genética através de troca direta de DNA por conjugação, através de bacteriófago (transdução), através de plasmídeo extracromossomal de DNA (também por conjugação) ou ainda por

aquisição de DNA, via transformação (Khachatryan et al., 2005).

Os mecanismos genéticos de resistência bacteriana aos antimicrobianos são classificados como intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo e é transmitida somente de modo vertical à prole, como por exemplo, os microrganismos que não possuem parede celular. Desta forma, agentes antimicrobianos que têm como alvo a parede celular, como as penicilinas, são ineficazes. Outro fator a ser considerado é a localização do microrganismo dentro do hospedeiro, como as bactérias intracelulares, uma vez que antimicrobianos que não conseguem penetrar na célula hospedeira, conseqüentemente não terão ação sobre os microrganismos intracelulares (Martínez e Baquero, 2002; Vaz, 2009). Esse problema é facilmente resolvido, quando se conhece o agente infeccioso e o mecanismo de ação do antimicrobiano.

A resistência adquirida reflete uma verdadeira modificação na composição genética de uma bactéria, fazendo com que um antimicrobiano outrora eficaz deixe de ser ativo (Kaye et al, 2000). As resistências adquiridas devem-se às modificações genéticas por mutação, aquisição exógena de DNA e rearranjos intramoleculares no DNA (Kaye et al., 2000; Khachatryan et al., 2005).

Essas modificações genéticas de resistência a antimicrobianos podem ser por determinantes cromossômicos e extracromossômicos. Nos determinantes cromossômicos, temos as mutações, que apesar de pouco frequentes (1/10 bilhões), numa infecção onde o número de células é muito alto, a probabilidade de uma mutação resultar em uma resistência antimicrobiana pode ser grande para algumas espécies

bacterianas e algumas drogas (Ojo et al., 2008; Vaz, 2009).

Outro exemplo são os integrons que também conferem resistência às bactérias. Sepp et al. (2009) mostraram que amostras de *E. coli* positivas para o gene *intl-1* apresentaram um valor da concentração inibitória mínima (MIC) significativamente superior às amostras que não o continham. Esses genes foram encontrados em populações de *E. coli* intestinal de indivíduos que não haviam recebido antimicrobiano, mostrando que esse genótipo não ocorreu devido a uma pressão antimicrobiana. Como exemplos de determinantes extracromossômicos, temos os plasmídeos, que são elementos genéticos que estão livres no citoplasma, são componentes genéticos distintos do cromossomo e são capazes de se replicarem sozinhos. A maior parte da resistência a antimicrobianos é determinada por aquisição de plasmídeos (Rang et al., 1997).

Após adquirirem os genes de resistência a antimicrobianos, estes podem ser transferidos entre os elementos genéticos móveis no interior da bactéria e entre bactérias. Dentro da bactéria, alguns segmentos de DNA, os transposons, podem ser transferidos de um plasmídeo para outro e ainda para o cromossomo e vice-versa, ou ainda para uma nova espécie bacteriana quando são inseridos nos plasmídeos e, mesmo que este não seja capaz de se replicar na nova espécie, o transposon é capaz de transferir genes para o cromossomo da nova espécie ou ainda para seus plasmídeos (Rang et al., 1997; Whittle et al., 2001). Este mecanismo é provavelmente responsável pela ampla distribuição de genes de resistência em diferentes plasmídeos e em espécies não relacionadas.

A transferência de genes de resistência entre bactérias se dá por conjugação, transdução e transformação. A

conjugação envolve um contato célula a célula, através de uma fimbria sexual, durante o qual o DNA cromossômico ou extracromossômico é transferido de uma bactéria para outra. A transdução é o processo pelo qual o plasmídeo de DNA é envolvido num vírus bacteriano, denominado fago, e transferido para outra bactéria da mesma espécie. A transformação se dá quando a espécie pode, em condições naturais, sofrer uma mudança, captando um DNA livre em seu ambiente e incorporando-o ao seu genoma, através do mecanismo normal de entrecruzamento. Isto só é possível quando o DNA que chega vem de uma célula pertencente à mesma cepa da bactéria hospedeira ou de uma cepa estreitamente relacionada com esta (Vaz, 2009; Rang et al., 1997). Desta forma, a co-transferência de genes de resistência ao mesmo tempo entre bactérias é possível. Assim, se uma cepa de *E. coli* de animal, por exemplo, é ingerida em quantidade suficiente e, se a amostra é apta a colonizar o intestino humano, há a possibilidade de transferência de genes de resistência da bactéria residente para a microbiota intestinal humana (Trobos et al., 2009).

As bactérias podem desenvolver múltiplos mecanismos contra um agente único ou classes de agentes, sendo que uma única alteração pode resultar no desenvolvimento de resistência a antimicrobianos diferentes, denominado multiresistência (Kaye et al., 2000).

Em relação às classes de antimicrobianos, temos alguns mecanismos de resistência mais comumente encontrados em cada grupo. A resistência para os antimicrobianos inibidores do ácido fólico é normalmente mediada por plasmídeos, podendo resultar em produção de enzimas que são menos afetadas pelas sulfonamidas, desenvolvimento de vias metabólicas alternativas, produção aumentada do PABA, diminuição da permeabilidade ou

efluxo ativo das sulfonamidas (Mandell e Petri Jr, 1996b; Rang et al., 1997; Edrington et al., 2008).

Dentre os β -lactâmicos, a resistência às penicilinas é significativamente maior que às cefalosporinas. Provavelmente, isto ocorre devido às penicilinas serem bastante usadas e, ainda, por algumas cefalosporinas serem mais resistentes à ação das β -lactamases. A resistência às penicilinas é muito comum, tendo como principal causa a inativação enzimática das penicilinas pela produção de β -lactamases. Há outras formas como a redução da permeabilidade aos antimicrobianos devido aos lipopolissacarídeos de membrana, mais comumente observado em microrganismos Gram-negativos e alterações estruturais nas PLPs (Spinosa, 2002b; Walsh, 2003; Alexander et al., 2009).

As cefalosporinas são altamente resistentes as penicilases e, em muitos países, ela foi marcada como um grupo de antimicrobianos que dispensa teste de susceptibilidade. Porém, algumas bactérias produzem β -lactamases capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico das cefalosporinas, inativando-as. Em contrapartida, algumas cefalosporinas, principalmente de terceira e quarta geração, são mais resistentes à ação dessas enzimas, com exceção de algumas bactérias que produzem β -lactamases de amplo espectro (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*), capazes de hidrolisar até mesmo esses antimicrobianos mais recentes (Spinosa, 2002b; Hendrisken et al., 2008). Um estudo realizado por Edrington et al. (2008) mostrou que de 18 amostras de *Salmonella* isoladas de bezerros, 7 foram resistentes à cefoxitina, 11 ao ceftiofur e nenhuma resistência foi observada para ceftriaxona.

Para a classe de antimicrobianos que interferem com a síntese de proteínas

bacterianas temos um número muito baixo de amostras resistentes para aminoglicosídeos, enquanto que para tetraciclina a resistência é, em muitos casos, quase que total. O mecanismo de resistência dos aminoglicosídeos pode ocorrer por transporte inadequado através da membrana citoplasmática bacteriana, produção de enzimas que modificam ou inativam o fármaco, sendo codificados por genes adquiridos basicamente por conjugação e transferência de DNA sob a forma de plasmídeos. Outro mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos pode ser por receptores ribossomais sem afinidade para estes quimioterápicos e, ainda, por incapacidade da droga atravessar a membrana citoplasmática (Chambers e Sande, 1996b; Spinosa, 2002a). Amicacina, estreptomicina e gentamicina mostraram alta efetividade para amostras de *E. coli* isoladas de bezerro e animais adultos (Filho et al., 2007; Carson et al., 2008; Gow et al., 2008).

Determinantes de resistência a tetraciclinas são amplamente espalhados entre espécies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Em muitas espécies Gram-negativas, a resistência à tetraciclina é devido à aquisição de operon que consiste em um gene efluxo *tet(A)* e um repressor *tet(R)* (Sawant et al., 2007). A forma mais comumente observada de resistência às tetraciclinas é a mediada pela transferência de plasmídeo, mas também ocorre por alteração do transporte de membrana de célula (Spinosa, 2002c; Cagnacci et al., 2008; Trobos et al., 2009). Isolados de *Salmonella* de bezerros mostraram uma resistência de 94,4% à tetraciclina (Edrington et al., 2008). Alexander et al. (2009) mostraram que 92,9% das *E. coli* foram resistentes a este medicamento. Amostras de *E. coli* apresentaram altas taxas de resistência para tetraciclina, variando de 27% a 68,5% (Filho et al., 2007; Cagnacci et al., 2008; Checkley et al., 2008; Gow et al., 2008; Trobos et al.,

2009). Em um estudo realizado por Sawant et al. (2007), observa-se resistência à tetraciclina em 82% das fazendas, 42% das vacas e 14% das bactérias entéricas Gram-negativas. Isolados de *Salmonella* de bezerros apresentaram 33,3% de resistência à canamicina, 61,1% de resistência à gentamicina e estreptomicina, e 100% foram sensíveis à amicacina (Edrington et al., 2008).

A resistência aos antimicrobianos que afetam a topoisomerase II é muito observada nas quinolonas de 1ª geração, onde o aparecimento de resistência se desenvolve bem mais rapidamente que para os das gerações seguintes. Os mecanismos mais frequentes incluem alterações nos genes que codificam subunidades de alvos de quinolonas DNA girase (genes *gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (genes *parC* e *parE*), encontradas principalmente em amostras de *E. coli*, ou ainda, por repetições pentapeptídicas de proteínas que bloqueiam a ação das quinolonas na topoisomerase II e IV (Hopkins et al., 2005; Robicsek et al., 2006; Cagnacci et al., 2008). Outros mecanismos como a baixa expressão de porinas de membrana externa ou a alta expressão de bombas de efluxo de multidrogas são também importantes na resistência a antimicrobianos (Hopkins et al., 2005).

Além de todos estes fatores discutidos acima, existem outros aspectos que também estão relacionados à resistência a antimicrobianos. Um deles é a virulência. Tanto a virulência quanto a resistência são mecanismos adaptativos selecionados para possibilitar a sobrevivência sobre condições de estresse. Muitos determinantes virulentos estão localizados nas ilhas de patogenicidade ou em elementos acessórios genéticos. Esses fatores são inseridos no microrganismo, seja por aquisição ou até mesmo por deleção, tornando-o patogênico (Sokurenko et al., 1999). Desta forma, em alguns casos, a resistência antimicrobiana e

os genes de virulência podem estar ligados no mesmo replicon ou, eventualmente, num mesmo determinante (Martínez e Baquero, 2002).

Outros mecanismos de virulência das bactérias que podem prevenir a ação dos antimicrobianos são as toxinas que levam à necrose ou à formação de abscesso. Neste caso, a disponibilidade de antimicrobiano no local diminuirá significativamente, devido a redução na chegada do antimicrobiano ao local ou por causa da inativação local dos fármacos por pH alterado e proteínas livres (Martínez e Baquero, 2002). Da mesma forma ocorrem com as bactérias que colonizam o trato intestinal. Elas tiveram que se adaptar a crescer na presença dos sais de bile, sendo necessário selecionar mecanismos de expulsão desses sais. Thanassi et al. (1997) relataram que *E. coli* expulsa sais de bile através do sistema *acrAB*, primeiramente caracterizado como um determinante de multirresistência a drogas (MDR). O mesmo ocorre com *Salmonella* Typhimurium (Ma et al., 1995).

Certas condições durante a infecção podem induzir a expressão de ambos os genes de virulência e de resistência a antimicrobianos, assim como, uma comum regulação de ambos, podendo estar na mesma rede regulatória ou no mesmo regulador. É o que ocorre com a proteína MarA de *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium que regula a expressão de mais de 60 genes cromossômicos. Estes genes incluem tanto determinantes de MRD, quanto os genes com potencial papel na virulência (Barbosa e Levy, 2000).

Dados epidemiológicos têm mostrado que, em alguns casos, microrganismos resistentes a antimicrobianos podem apresentar uma diminuição na patogenicidade. Isto é baseado no fato de que microrganismos virulentos são mais aptos a produzirem

sinais clínicos de infecção, e assim, são mais frequentemente expostos a antimicrobianos, tendo maior risco de desenvolverem resistência. Entretanto o oposto também ocorre. Patógenos como *Neisseria meningitidis*, *Salmonella Typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Bordetella pertussis*, *Leptospira icterohaemorrhagica* e *Brucella melitensis* são raramente resistentes a antimicrobianos (Martínez e Baquero, 2002).

A relação de epidemia e resistência também está ligada, onde bactérias epidêmicas são mais propensas a adquirirem resistência antimicrobiana. Este fato pode ser explicado por elas serem encontradas em um grande número de indivíduos alcançando grandes populações, ou ainda, por serem bactérias com alta taxa de migração. Desta forma, estão em contato com vários tipos de microrganismos habitando diferentes habitats em que os genes de resistência podem ser adquiridos por transferência horizontal. Assim, uma vez que o fenótipo de resistência é adquirido, ele pode ser amplamente disseminado (Martínez e Baquero, 2002).

A microbiota, apesar de inicialmente possuir a função de defesa contra infecções, elas também podem proteger bactérias patogênicas da ação dos antimicrobianos. Isso pode ocorrer de duas formas: quando elas produzem β -lactamases e rapidamente inativam os antimicrobianos β -lactâmicos, onde as bactérias patogênicas, que a princípio eram susceptíveis a esses antimicrobianos, conseguem crescer e se multiplicar; e através da transferência de genes de resistência das bactérias da microbiota para as bactérias patogênicas (Sokurenko et al., 1999; Martínez e Baquero, 2002).

O tipo de criação e a utilização de antimicrobianos como terapêuticos, profiláticos e promotores de crescimento também influenciam no aparecimento de

resistência a antimicrobianos. Em suínos, por exemplo, a resistência é muito observada pelo fato dos antimicrobianos serem frequentemente utilizados como método profilático e como promotor de crescimento. Isto ocorre devido ao amplo número de enterobactérias patogênicas presentes e à maior probabilidade de disseminação em ambientes de criação intensiva, cada vez mais utilizada pelos criadores (Vaz, 2009).

As bactérias mais comumente encontradas nestes ambientes são *E. coli* e *Salmonella Typhimurium*. A *E. coli* possui uma resistência elevada aos antimicrobianos, principalmente, em suínos, acometendo também, os bezerros. As tetraciclina, sulfonamidas e estreptomicinas são praticamente inúteis em distribuição mundial, pois conferem resistência plasmidial e podem, potencialmente, promover a transferência de genes de virulência entre as bactérias, produzindo um efeito inverso ao desejado. Quanto à *Salmonella Typhimurium*, há uma ampla gama de amostras resistentes a múltiplos antimicrobianos amplamente utilizados em bovinos, principalmente bezerros, e em suínos, podendo acometer também, os seres humanos (Hirsh e Zee, 2003).

2.3. Uso de antimicrobianos em Medicina Veterinária

Há mais de meio século que antimicrobianos são usados para tratar, prevenir e controlar infecções reduzindo a morbidade e a mortalidade de animais. Além disso, esses medicamentos são adicionados continuamente na alimentação de animais, servindo como promotores de crescimento, aumentando a eficácia alimentar e diminuindo a perda na produção (Bogaard e Stobberingh, 2000).

Hoje, no mercado veterinário brasileiro, existem mais de 50

antimicrobianos registrados para tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana. Apesar dos comprovados benefícios, seu uso deve ser feito de forma prudente para evitar resíduos nos alimentos de consumo humano, maximizar sua eficácia e minimizar o desenvolvimento de bactérias resistentes tanto em animais como em seres humanos. Somente no ano de 2009 foram gastos mais de R\$ 2,8 milhões com antimicrobianos para animais (Sindicato, 2009).

Na medicina veterinária, a escolha do antimicrobiano deve ser baseada na identificação do microrganismo infectante, na classe do medicamento, na sensibilidade dos microrganismos aos agentes escolhidos e nas características do hospedeiro como raça, idade, exposição prévia a antibióticos, prenhez e administração concomitante de outras drogas. O objetivo é obter sucesso no tratamento e evitar o desenvolvimento de microrganismos resistentes (Rang et al., 1997; Mota et al., 2005).

O uso cauteloso de antibióticos é um dos grandes desafios para os médicos veterinários, pois pode ocorrer a transferência de amostras resistentes do animal para o ser humano, seja por contaminação direta ou pelo consumo de alimentos de origem animal. Assim, a segurança alimentar é também de responsabilidade dos médicos veterinários, uma vez que ela pode ser afetada negativamente pela contaminação microbiológica e toxicológica do animal pelo manejo (higiênico, densidade de estocagem, limpeza e desinfecção), pelo tratamento veterinário (uso de antimicrobianos) e pela reciclagem dos dejetos. Esta é uma preocupação para a saúde pública, pois a transferência de resistências entre microrganismos pode reduzir ou anular o efeito terapêutico de antimicrobianos na medicina humana (World, 2000; Sugiura et al., 2009).

Existem evidências que mostram que o uso de antimicrobianos na medicina veterinária contribui para a ocorrência de infecções bacterianas resistentes aos antimicrobianos na espécie humana (Bogaard e Stobberingh, 2000; Mota et al., 2005; Trobos et al., 2009). Como resultado, a Organização Mundial da Saúde recomenda que agências governamentais criem programas estratégicos de risco para controlar o surgimento e a propagação de patógenos humanos resistentes a antimicrobianos. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou a Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV) (link: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7276>) que tem como objetivo principal a fiscalização da fabricação, do comércio e do uso de produtos veterinários.

Para obter eficácia futura de antimicrobianos na medicina veterinária e proteção da saúde pública, é necessário reduzir a quantidade de antimicrobianos usados nos animais, minimizar o requerimento de antimicrobianos na terapia e prevenir as infecções. Isto é possível através do melhoramento dos métodos de criação dos animais, erradicação de doenças, otimização e desenvolvimento de novas vacinas. Além disso, caso seja necessário o uso de antimicrobianos, deve-se dar preferência às moléculas de pequeno espectro de ação com uma política veterinária de antimicrobiano sensível, e descontinuidade da prática de aditivos alimentares (Bogaard e Stobberingh, 2000).

Recentes pesquisas têm demonstrado que após um longo período de tempo de exposição a antimicrobianos, algumas espécies bacterianas podem adaptar-se ao ambiente de forma a manter seus genes de resistência estáveis mesmo após a remoção do antimicrobiano. Felizmente, há estudos contrários

mostrando que após banir o uso de tetraciclina como promotor de crescimento, há uma redução significativa de 60% para 8% na resistência de tetraciclinas de isolados de *S. Typhimurium* de bovinos (Bogaard e Stobberingh, 2000).

Os antimicrobianos também são usados na medicina veterinária na prevenção de doenças. Um exemplo desse uso é a adição de antibióticos tais como tetraciclina e neomicina no sucedâneo do leite, que tem a finalidade de prevenir doenças e levantar bezerros, diminuir mortalidade, melhorar o ganho de peso e, consequentemente, a saúde global (Quigley et al., 1997; Berge et al., 2005).

Os antimicrobianos são usados não somente na terapia e prevenção de infecções bacterianas, mas também são adicionados continuamente na alimentação animal como promotor de crescimento para aumentar a eficácia alimentar e diminuir a perda na produção (Bogaard e Stobberingh, 2000). Teve início no século XX, quando diversos experimentos foram realizados a fim de testar a suplementação de vitamina B₁₂ com o objetivo de suprir carências humanas. Os primeiros testes foram realizados em animais de produção e a vitamina era obtida a partir de caldos fermentados por *Streptomyces griseus* e *S. aureofaciens*, dois microrganismos usados para produção de antimicrobianos. Em 1950, Stokstad e Jukes conseguiram comprovar que a adição de antimicrobianos na alimentação era capaz de estimular o crescimento dos animais. Após estes estudos, diversos outros foram realizados, ampliando-se o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (Morril et al., 1977; Quigley et al., 1997; Gorbach, 2001).

A resistência a antimicrobianos tem sido muito estudada em propriedades que os usam como promotores de crescimento, onde se tem observado que eles são capazes

de induzir e transferir genes de resistência (Bogaard e Stobberingh, 2000; Mota et al., 2005; Sugiura et al., 2009). Além disso, bactérias comensais e ambientais podem adquirir esses genes de resistência, transformando-se em reservatórios para transferência de genes de resistência bacteriana para outras bactérias patogênicas, bem como para bactérias da microbiota e bactérias patogênicas de seres humanos (Smith et al., 2007). Apesar dos efeitos benéficos que os promotores proporcionam na produção de animais, seu uso deve ser feito com prudência, evitando o uso indiscriminado, com monitoramento da quantidade usada e do desenvolvimento de patógenos importantes. Os antimicrobianos iniciam uma seleção de bactérias resistentes e, uma vez que haja a descontinuidade do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, na maioria das vezes, ocorre um significativo decréscimo na prevalência da resistência (Lathers, 2002; Sugiura et al., 2009).

Durante infecções agudas e surtos de doenças infecciosas, é importante o uso de um tratamento antimicrobiano efetivo o mais cedo possível. Como nem sempre é possível diagnosticar o agente microbiano e nem testar a sua susceptibilidade, este tratamento inicial é indicado baseado no conhecimento e na experiência do médico veterinário, considerando os padrões de resistência esperados dos diferentes patógenos bacterianos aos agentes antimicrobianos normalmente usados na região e na espécie animal. (Hendriksen et al., 2008). No entanto, esse conhecimento é limitado, devido à pequena proporção de diferentes patógenos de animais infectados dos quais são feitos padrão de resistência antimicrobiana e, por ser um padrão normalmente regional, não podendo ser aplicado a todo o país.

O antibiograma é um método que pode ser dispensado quando o perfil da amostra for conhecido, além da exclusão da

hipótese de existência de amostras resistentes. Entretanto, é de extrema importância para avaliar bactérias que costumam apresentar resistência a um ou vários antibióticos ou quando houver processos supurativos crônicos ou infecções urinárias que levam à alta troca de agentes etiológicos. Também é importante nos casos de insucesso de um produto teoricamente eficaz no combate a uma infecção ou desejo de corrigir uma técnica terapêutica já em uso que não demonstra a mesma eficiência (Vaz, 2009).

Todavia, com a emergência de microrganismos com grupos de clones virulentos e multirresistentes que podem ser espalhados rapidamente na comunidade, a pesquisa da sensibilidade das bactérias torna-se importante no que se diz respeito à escolha do tratamento indicado, obtendo-se sucesso na terapêutica e minimizando a ocorrência deste fenômeno em animais e seres humanos, atendendo à necessidade e importância deste tema amplamente associado à saúde pública (Vaz, 2009).

Atualmente, tanto na bovinocultura como na suinocultura, há uma maior tendência em se usar métodos de criação intensivos. Estes sistemas aumentam a probabilidade de infecção devido ao maior contato entre os animais, assim como o nível de estresse entre eles, favorecendo o aparecimento de doenças infecciosas, induzindo o uso dos antimicrobianos essenciais à produção (Sobestiansky e Barcellos, 2007). Desta forma, alta densidade populacional favorece uma maior interação entre microrganismos diferentes, aumentando a taxa de doença no rebanho e, conseqüentemente, o uso de antimicrobianos no tratamento. Isso favorece uma troca rápida de genes de resistência e resulta em uma maior ocorrência de resistência e multirresistência (Pantozzi et al., 2010).

Como principais conseqüências, destacam-se as infecções resistentes com maiores índices de mortalidade, doenças persistentes com maior probabilidade de propagação de microrganismos resistentes a outros indivíduos, maiores encargos financeiros com tratamentos e menor número de fármacos novos em concepção e desenvolvimento (World, 2000).

A contaminação de seres humanos com bactérias de origem animal é muito comum. Os indivíduos mais expostos, como veterinários, peões, magarefes, entre outros, costumam apresentar um grau de resistência maior que a população em geral. Mas, com a automedicação, é improvável que se quantifique a transferência desta resistência, pois o mesmo princípio ativo pode ter sido usado em homens e animais (Prescott, 2000).

Outro problema que existe na transferência de genes de resistência é no consumo de leite com resíduos de antimicrobianos. Onde o uso difundido de antibióticos pelos produtores e médicos veterinários no tratamento de doenças infecciosas de vacas de leite, principalmente no caso das mamites, leva a uma alteração da composição química do leite, assim como a utilização de drogas na alimentação animal, como suplementos de dietas têm contribuído para a presença de resíduos de antimicrobianos no leite (Silva e Sena, 1984; Nascimento et al., 2001). A presença destes resíduos também pode ser determinada pela higienização de equipamentos e utensílios da indústria e/ou a adição proposital de drogas para mascarar a deficiência na qualidade do leite e aumentar seu tempo de vida útil (Brasil, 1993; Borges et al., 2000).

Mesmo em doses terapêuticas as substâncias ativas e seus metabólitos, ainda podem permanecer, em teor residual, no leite, carne, ovos e outros alimentos. Sabe-se que assim como a biodisponibilidade do

medicamento depende da via de aplicação, posologia, formulação, forma de apresentação, além de outros fatores, a carência e o teor residual também estão condicionados a estes fatores (Fulgêncio, 1993). Além disso, é importante ressaltar que estas substâncias não são eliminadas no beneficiamento podendo representar perigo até nos derivados fabricados com essa matéria-prima (Musser et al., 2001; Nero et al., 2007).

A presença desses resíduos no leite, que é um alimento consumido diariamente, acarreta uma série de problemas para a classe médica, agrícola e a população em geral, como: aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos, ocorrência de reações alérgicas, tóxicas e mutagênicas, alterações genéticas com atividade oncogênica ou teratogênica, além da interferência no crescimento das culturas microbianas utilizadas na tecnologia de alimento e conseqüências econômicas para os produtores (Fulgêncio, 1993; Biacchi et al., 2004).

O monitoramento frequente de medicamentos e seus derivados metabólicos e o controle de resíduos de agentes antimicrobianos no leite é muito importante à indústria de produtos lácteos e conseqüentemente ao consumidor, que incapaz de perceber se o leite consumido está livre de antimicrobianos se torna mais susceptível a enfermidades (Brito, 2006).

É evidente que para maior segurança no consumo de leite de boa qualidade, tanto no que diz respeito à manutenção de sua composição natural, como também a ausência de substâncias que possam levar a problemas de saúde, é necessário o estabelecimento de políticas públicas efetivas de fiscalização dos alimentos (Nascimento et al., 2001).

A FAO/OMS, através do Codex Alimentarius vem estabelecendo e

sugerindo aos países membros dessa entidade internacional, limites máximos de resíduos (LMR) de numerosos medicamentos nos alimentos, como medidas profiláticas a saúde humana.

No intuito de avaliar e prevenir riscos, o Ministério da Saúde implantou no Brasil, em 2000, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA, que tem como objetivo, através de análise laboratorial, monitorar no país os resíduos de agrotóxicos em alimentos. Da mesma forma, objetivando controlar resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos, foi criado, em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos - PAMvet. Na implantação do Programa Nacional, o leite foi escolhido como o primeiro alimento a ser pesquisado, com base nos dados do IBGE, nos quais o leite é a proteína de origem animal mais consumido pela população brasileira (Souza, 2006).

No Brasil a Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002) exige a pesquisa periódica de resíduos de antibióticos em leite, que não devem ser superiores aos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) (Programa, 2003), previstos para cada grupo químico específico. Vários kits analíticos de detecção de resíduos de antibióticos foram aprovados e são autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA – Brasil (Brasil, 2004) para o controle da presença dessas substâncias em leite, utilizando diferentes princípios de ação e detecção.

3. Referências bibliográficas

ACAR, J.F.; GOLDSTEIN, F.W. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones.

Clin. Infect. Dis. v. 24, suppl 1, p. S67-S73, 1997.

ACRES, S.D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Newborn calves: a review. *J. Dairy Sci.*, v. 68, n. 1, p. 229-256, 1985.

ALEXANDER, K.A.; WARNICK, L.D.; WIDEMANN, M. Antimicrobial resistant *Salmonella* I dairy cattle in the United States. *Vet. Res. Commun.* v. 33, n. 3, p. 191-209, 2009.

ALVES, A.J. *Ocorrência de enteropatógenos em bezerros diarreicos em fazendas de exploração leiteira.* 1997. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP.

ARGENZIO, R.A. Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. *Vet. Clin. North Am Food Animal. Pract.* v. 1, n. 3, p. 461-469, 1985.

BARBA, J.; BUSTAMANTE, V.H.; FLORES-VALDEZ, M.A. et al. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* v. 187, n. 23, p. 7918-7930, 2005.

BARBOSA, T.M.; LEVY, S.B. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J. Bacteriol.* v. 182, n. 12, p. 3467-3474, 2000.

BARRINGTON, G.M.; GAY, J.M.; EVERMANN, J.F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal disease. *Vet. Clin. Of North American: Food Anim. Pract.* v. 18, n.1, p. 7-34, 2002.

BENESI, F.J. Síndrome diarreia dos bezerros. *Rev. Do CRMV-ES.* v. 2, n. 3, p. 10-13, 1999.

BERGE, A.C.; LINDEQUE, P.; MOORE, D.A. et al. A clinical trial evaluating prophylactic and therapeutic antibiotic use on health and performance of calves. *J. Dairy Sci.* v. 88, n. 8, p. 2166-2177, 2005.

BERGE, A.C.; MOORE, D.A.; SISCHO, W.M. Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. *App. and Environ. Microbiol.* v. 72, n. 6, p. 3872-3878, 2006.

BIACCHI, N.C.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Detecção de resíduos antibióticos em bovino na região do Vale do Paraíba, São Paulo. *Rev. Biocien.* v.10, n. 1-2, p. 47-49, 2004.

BISPHAM, J.; TRIPATHI, B.N.; WATSON, P.R. et al. *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect. Immun.* v. 69, n. 1, p. 367-377, 2001.

BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and human. *Internat. J. of Antimicrob. Agents.* v. 14, n. 4, p. 327-335, 2000.

BORGES, G.T.; SANTANA, A.P.; MESQUITA, A.J. et al. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás. *Ciênc. Anim. Bras.* v.1, n.1, p.59-63, 2000.

BOTTEON, R.C.C.M.; BOTTEON, P.T.L.; LÓSS, Z.G. Aspectos sanitários da pecuária leiteira na região do Médio Paranaíba- RJ e MG. *Rev. Bras. de Ciencia Vet.* v. 8, n. 3, p. 141-143, 2001.

BOTTEON, R.C.C.M.; BOTTEON, P.T.L.; SANTOS JR, J.C.B. et al. Frequência de

diarréia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo na região do médio Paranaíba – Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.* v. 45, n. 2, p. 153-160, 2008.

BOYD, L.B.; MAYNARD, M.J.; MORGAN-LINNELL, S.K. et al. Relationships among ciprofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, and norfloxacin MICs for fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob. Agents and Chemot.* v. 53, n. 1, p. 229-234, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União*. Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 101, de 17.08.93. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. 1991/1992 – 2ª. revisão. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Autorização de uso de produto para kits analíticos. Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/aup_kits.htm>. Acesso em 01 agosto 2009.

BRITO, M.A.V.P. Resíduos de antibióticos no leite: um problema que tem solução. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br>>. Acesso em: 03 ago. 2009

BRUNING-FANN, C.; KANEENE, J.B. Environmental and management risk factors associated with morbidity and mortality in perinatal and pre-weaning calves: a review from an epidemiological perspective. *J. of American Vet. Med. Assoc.* v. 208, p. 2043-2046, 1996.

BUTLER, D.G.; CLARKE, R.C. Diarrhoea and dysentery in calves. In: Gyles CL. *Escherichia coli in Dom. Anim. And Hum.* Wallingford: CAB International. 1994, p. 91-116.

CAGNACCI, S.; GUALCO, L.; DEBBIA, E. et al. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J. of Clin. Microbiol.* v. 46, n. 8, p. 2605-2612, 2008.

CARSON, C.A.; REID-SMITH, R.; IRWIN, R.J. et al. Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* from 29 beef farms in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* v. 72, n. 2, p. 119-128, 2008.

CARTER, A.P.; CLEMONS, W.M.; BRODERSEN, D.E. et al. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature.* v. 407, n. 6802, p. 340-348, 2000.

CHAMBERS, H.F.; SANDE, M.A. Fármacos antimicrobianos: considerações gerais. In: Goodman, L.S.; Gilman, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill. 1996a, p. 757-776.

CHAMBERS, H.F.; SANDE, M.A. Fármacos antimicrobianos: os aminoglicosídeos. In: Goodman, L.S.; Gilman, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill. 1996b, p. 812-825.

- CHECKLEY, S.L.; CAMPBELL, J.R.; CHIRINO-TREJO, M. et al. Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* obtained from beef cattle on arrival at the feedlot and prior to slaughter, and associations with volume of total individual cattle antimicrobial treatments in one western Canadian feedlot. *Canadian J. of Vet. Res.* v. 72, n. 2, p. 101-108, 2008.
- CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Prevalence and molecular typing of attachment and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. *Vet. Microb.* v. 63, n. 2-4, p. 249-259, 1998.
- CONSTABLE, P.D. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.* v. 18, n. 1, p. 8-17, 2004.
- CONSTABLE, P.D. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. *Vet. Clin. Food Anim.* v. 25, n. 1, p. 101-120, 2009.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O. et al. *In vitro* interference of *Hyptis martiusii* e chlorpromazine against na aminoglycoside – resistance *Escherichia coli*. *Ind. J. Med. Res.* v. 129, p. 566-568, 2009.
- CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Rev.* v. 8, p. 26-37, 2010.
- DEBROY, C.; MADDOX, C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim. Health Res. Rev.* v. 2, n. 2, p. 129-140, 2001.
- EDRINGTON, T.S.; CALLAWAY, T.R.; ANDERSON, R.C. et al. Prevalence of multidrug-resistant *Salmonella* on commercial dairies utilizing a single heifer raising facility. *J. Food. Protect.* v. 71, n. 1, p. 27-34, 2008.
- FEITOSA, F.L.F.; BIRGEL, E.H.; CIARLINI, P.C. et al. Transferência de imunidade passiva colostrar e a morbidade e mortalidade de bezerros neonatos. *Rev. Do CRMV-SP.* v. 4, p. 9-15, 2001.
- FERGUSON, J.; BAXTER, A.; YOUNG, P. et al. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol. *Anal. Chim. Acta.* v. 529, n. 1-2, p. 109-113, 2005.
- FILHO, J.P.O.; SILVA, D.P.G.; PACHECO, M.D. et al. Diarréia em bezerros da raça nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesq. Vet. Bras.* v. 27, n. 10, p. 419-424, 2007.
- FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J. Anim. Sci.* v. 86, suppl 14, p. E173-E187, 2007.
- FOSTER, D.M.; SMITH, G.W. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. Food Anim.* v. 25, n. 1, p. 13-36, 2009.
- FRANCK, S.M.; BOSWORTH, B.T.; MOON, H.W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J. of Clin. Microbiol.* v. 36, n. 6, p. 1795-1797, 1998.
- FU, Y.; GALÁN, J.E. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol.* v. 27, n. 2, p. 359-368, 1998.
- FULGÊNCIO, A.M. Fármacos residuais em alimentos. Controle, importância na saúde pública e sua política internacional.

- Caderno de Farmácia*. v. 9, n.1, p.23-26,1993.
- GOLIN-BISELLO, F.; BRADBURY, N.; AMEEN, N. Sta and cGMP stimulate translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* v. 289, n. 3, p. 708-716, 2005.
- GORBACH, S.L. Antimicrobial use in animal feed-time to stop. *N. Engl. J. Med.* v. 345, n. 16, p. 1202-1203, 2001.
- GÓRNIK, S.L. Quimioterápicos. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 398-408.
- GOW, S.; WALDER, C.; ROSS, C. The effect of treatment on weaning weights in a cow-calf herd with a protracted severe outbreak of diarrhea in calves. *Can. Vet. J.* v. 46, n. 5, p. 418-425, 2005.
- GOW, S.P.; WALDNER, C.L.; RAJIÉ, A. et al. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* isolated in western Canadian cow-calf herds. Part I – Beef calves. *The Canadian J. of Vet. Res.* v. 72, n. 2, p. 82-90, 2008.
- GUO, A.; LASARO, M.A.; SIRAD, J.C. et al. Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium by dendritic cells. *Microbiol.* v. 153, Pt 4, p. 1059-1069, 2007.
- GYLES, C.L. Shiga toxins-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* v. 85, suppl 13, p. E45-E62, 2007.
- HEATH, S.E.; NAYLOR, J.M.; GUEDO, B.L. et al. The effect of feeding milk to diarrheic calves supplemented with oral electrolytes. *Can. J. Res.* v. 53, n. 4, p. 477-485, 1989.
- HENDRISKEN, R.S.; MEVIUS, D.J.; SCHROETER, A. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Act. Vet. Scand.* v. 50, n. 28, p. 1-10, 2008.
- HINTON, M. *Salmonella* Dublin abortion in cattle: incidence and epidemiology. *Br. Vet. J.* v. 131, n. 1, p. 94-101, 1975.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.446, 2003.
- HOPKINS, K.L.; DAVIES, R.H.; THRELFALL, E.J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v. 25, n. 5, p. 358-373, 2005.
- HOUSE, J.A. Economic impact of rotavirus and other neonatal agents of animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 173, 5 Pt 2, p. 573-576, 1978.
- IBARRA, J.A.; STEELE-MORTIMER, O. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell. Microbiol.* v. 11, n. 11, p. 1579-1586, 2009.
- INHORA, N.; OGURA, Y.; NUNEZ, G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 5, n. 1, p. 76-80, 2002.
- JAY, C.M.; BHASKARAN, S.; RATHORE, K.S. et al. Enterotoxigenic K99⁺ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. *Vet. Microbiol.* v. 101, n. 3, p. 153-160, 2004.
- KAPER, J.B. Molecular genetics of attaching and effacing *E. coli*. In: Karmali, M.A.; Goglio, A. (ed). *Recent advances in*

- verocytotoxins-producing Escherichia coli* infectious. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 1994. P. 233-234.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 2, p. 123-140, 2004.
- KAPUSNIK-UNER, J.E.; SANDE, M.A.; CHAMBERS, H.F. Fármacos antimicrobianos: tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e outros fármacos antimicrobianos. In: Goodman, L.S.; Gilman, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill. 1996, p. 826-848.
- KAYE, K. S.; FRAIMOW, H. S.; ABRUTYN, E. Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect. Dis. Clin. of North America*, v. 14, n. 2, p. 293-319, 2000.
- KENNY, B.; DEVINEY, R.; STEIN, M. et al. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*. v. 91, n. 4, p. 511-520, 1997.
- KHACHATRYAN, A.R.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. et al. Antimicrobial drug resistance genes do not convey a secondary fitness advantage to calf-adapted *Escherichia coli*. *App. and Environ. Microbiol.* v. 72, n. 1, p. 443-448, 2005.
- KHARE, S.; ALALI, W.; ZHANG, S. et al. Vaccination with attenuated *Salmonella enteric Dublin* expressing *E. coli* O157:H7 outer membrane protein intimin induces transient reduction of fecal shedding of *E. coli* O157:H7 in cattle. *BMC Vet. Res.* v. 6, n. 35, p. 1-9, 2010.
- KRAUSE, W.J.; CULLINGFORD, G.L.; FREEMAN R.H. et al. Distribution of heat-stable enterotoxin/guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals. *J. Anat.* v. 184, Pt 2, p. 407-417, 1994.
- LANGONI, H.; LINHARES, A.C.; AVILA, F.A. et al. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. *Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 41, n. 5, p. 131-319, 2004.
- LATHERS, C.M. Clinical pharmacology of antimicrobial use in humans and animals. *J. Clin. Pharmacol.* v. 42, n. 6, p. 587-599, 2002.
- LEITE, R.C.; LIMA, J.D. Fatores sanitários que influenciam na criação de bezerras. *Arq. Esc. Vet. Da UFMG.* v. 34, n. 3, p. 485-492, 1982.
- LOSTROH, C.P.; LEE, C.A. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microb. Infect.*, v. 3, n. 14-15, p. 1281-1291, 2001.
- MA, D.; COOK, D.N.; ALBERTI, M. et al. Genes AcrA and AcrB encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* v. 16, n. 1, p. 45-55, 1995.
- MANDELL, G.L.; PETRI JR, W.A. Fármacos antimicrobianos: penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos B-lactâmicos. In: Goodman, L.S.; Gilman, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 1999a, p. 790-811.
- MANDELL, G.L.; PETRI JR, W.A. Fármacos antimicrobianos: sulfonamidas, trimetoprima-sulfametoxazol, quinolonas e agentes para infecções das vias urinárias. . In: Goodman, L.S.; Gilman, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 1996b, p. 777-789.
- MARTÍNEZ, J.L.; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity,

epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microb. Rev.* v. 15, n. 4, p. 647-679, 2002.

METHODS for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 8. Ed. *Clin. and Lab. Stand. Ins.* v. 29, n. 2, p. M07-M08, 2009.

McCORMICK, B.A.; PARKOS, C.A.; COLGAN, S.P. et al. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* v. 160, n. 1, p. 455-466, 1998.

McGHIE, E.; BRAWN, L.C.; HUME, P.J. et al. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 12, n. 1, p. 117-124, 2009.

MITCHELL, I.D.; TAME, M.J.; KENWORTHY, R. Conditions for the production of *Escherichia coli* enterotoxin in a defined medium. *J. Med. Microbiol.* v. 7, n. 3, p. 395-400, 1974.

MORRIL, J.L.; DAYTON, A.D.; MICKELSEN, R. Cultured milk and antimicrobials for young calves. *J. Dairy Sci.* v. 60, n. 7, p. 1105-1108, 1977.

MOTA, R.A.; SILVA, H.P.C.; FREITAS, M.F.L. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.* v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MUSSER, J.M.; ANDERSON, K.L.; RUSHING, J.E. et al. Potential for milk containing penicillin G or amoxicillin to cause residues in calves. *J. of Dairy Sci.* Savoy. v. 84, n. 1, p. 126-133, 2001.

MUZA-MOONS, M.M.; SCHNEEBERGER, E.E.; HECHT, G.A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection

leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* v. 6, n. 8, p. 783-793, 2004.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Rev. Nutr.* v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Cienc. Tecnol. Aliment.* v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

OJO, K.K.; SAPKOTA, A.R.; OJO, T.B. et al. Antimicrobial resistance gene distribution: a socioeconomic and sociocultural perspective. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär.* v. 3, n. 3, p. 1-6, 2008.

OK, M.; GÜLER, L.; TURGUT, K. et al. The studies on the aetiology of diarrhea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoon. and Pub. Healt.* v. 56, n. 2, p. 94-101, 2009.

ORTMAN, K.; SVENSSON, C. Use of antimicrobial drugs in Swedish dairy calves and replacement heifers. *Vet. Rec.* v. 154, n. 5, p. 136-140, 2004.

OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S. et al. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. and Immun.* v. 68, n. 1, p. 64-71, 2000.

- PANTOZZI, F.L.; MOREDO, F.A.; VIGO, G.B. et al. Resistencia a los antimicrobianos em bacterias indicadoras y zoonóticas aislada de animales domésticos em Argentina. *Ver. Argent. Microbiol.* v. 42, p. 49-52, 2010.
- PAWLOWSKI, S.W.; WARREN, C.A.; GUERRANT, R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterol.* v. 136, n. 6, p. 1-23, 2009.
- PEREIRA-MAIA, E.C; SILVA, P.P; ALMEIDA, W.B. et al. Tetraciclina e glicilicilinas: uma visão geral. *Quim. Nova.* v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.
- PERFORMANCE standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth information supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute.* v. 29, n. 3, p. M100-S19, 2009.
- PHILLIP, H; SCHIMIDT, H; DURING, F. et al. Efficacy of meloxicam (Metacam®) as adjunct to a basic therapy for the treatment of diarrhea in calves. *Acta Vet. Scand.* v. 98, p. 273, 2003.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell,* v. 124, n. 4, p. 715-727, 2006.
- PRESCOTT, J. F. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In: PRESCOTT, J. F.; BARGGOT, J. D.; WALKER, R. D. (Eds). *Antimicrob. Therapy in Vet. Med.* 3. ed. Ames: Iowa University Press, 2000, p. 27-49.
- PROGRAMA nacional de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos expostos ao consumo - PAMVet. Brasília: ANVISA, 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>>. Acesso em 01 agosto 2009.
- PRUIMBOOM-BREES, I.M.; MORGAN, T.W.; ACKERMANN, M.R. et al. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157/H7 shiga toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* v. 97, n. 19, p. 10325-10329, 2000.
- QADRI, F.; SVENNERHOLM, A.; FARUQUE, A.S.G. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 18, n. 3, p. 465-483, 2005.
- QUIGLEY, J.D.; DREWRY, J.J.; MURRAY, L.M. et al. Body weight gain, feed efficiency, and fecal scores of dairy calves in response to galactosyl-lactose or antimicrobials in milk replacers. *J. Dairy Sci.* v. 80, n. 8, p. 1751-1754, 1997.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. 2156p.
- RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. Agentes antimicrobianos. In: *Farmacologia.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. p. 572-592.
- RINGS, D.M. Salmonellosis in calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v. 1, p. 529-539, 1985.
- ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D.F. et al. Prevalence in ceftazidime-resistant *Esterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 50, n. 8, p. 2872-2874, 2006.
- ROBINSON, C.M.; SINCLAIR, J.F.; SMITH, M.J. et al. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 103, n. 25, p. 9667-9672, 2006.

- SALCEDO, S.P.; NOURSADEGI, M.; COHEN, J. et al. Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages *in vivo*. *Cell Microbiol.* v. 3, n. 9, p. 587-597, 2001.
- SANTOS, R.L., ZHANG, S., TSOLIS, R.M. et al. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Vet. Pathol.* v. 39, n. 2, p. 200-215, 2002.
- SAWANT, A.A.; HEGDE, N.V.; STRALEY, B.A. et al. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *App. and Environm. Microbiol.* v. 73, n. 1, p. 156-163, 2007.
- SEPP, E.; STSEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K. et al. The occurrence of antimicrobial resistance and class I integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. *Annals of Clin. Microb. and Antimicrob.* v. 8, n. 34, p. 1-6, 2009.
- SIELING, P.A.; MODLIN, R.L. Toll-like receptor: mammalian 'taste receptor' for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 5, n. 1, p. 70-75, 2002.
- SILVA, T.J.P.; SENA, M.C. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e especial 3,2% de gordura consumido em Belo Horizonte: 1982-83. *Rev. Inst. de Latic. Cândido Tostes.* v. 39, n. 235, p.7-12, 1984.
- SINDICATO nacional da indústria de produtos para saúde animal, 2009. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Acesso em: 25.09.2010.
- SMITH, J.L.; DRUM, D.J.V.; DAI, Y. et al. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl. And Environm. Microbiol.* v. 73, n. 5, p. 1404-1414, 2007.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. Doenças dos Suínos. *Goiânia: Palotti*, 2007. p.768.
- SOJKA, W.J.; FIELD, H.I. Salmonellosis in England and Wales 1958-1967. *Vet. Bull.* v. 40, p. 515-531, 1970.
- SOKURENKO, E.V.; HASTY, D.L.; DYKHUIZEN, D.E. Pathoadaptative mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* v. 7, n. 5, p. 191-195, 1999.
- SOUZA, R. C. *Resíduos de antibiótico no leite*. 2006. Curso de Especialização "Lato Sensu" em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal/Vigilância Sanitária de Alimentos.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos: aminoglicosídeos, polimixinas, bacitracina e vancomicina. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002a. p. 416-419.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos beta-lactâmicos: penicilinas e cefalosporinas. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002b. p. 409-415.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol e análogos. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002c. p. 420-424.
- SUGIURA, K.; ASAI, T.; TAKAGI, M. et al. Control and monitoring of antimicrobial resistance in bacteria in food-producing

- animals in Japan. *Vet. Ital.* v. 45, n. 2, p. 305-315, 2009.
- TAKEY, M.; FUKUDA, H.; KISHIJ, R. et al. Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target anhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 45, n. 12, p. 3544-3547, 2001.
- THANASSI, D.G.; CHENG, L.W.; NIKAIDO, H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* v. 179, n. 8, p. 2512-2518, 1997.
- TROBOS, M.; LESTER, C.H.; OLSEN, J.E. et al. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. *J. of Antimicrobial Chemoth.* v. 63, n. 1, p. 80-86, 2009.
- TSOLIS, R.M.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A. et al. Contribution of *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* v. 67, n. 9, p. 4879-4885, 1999.
- UZZAU, S.; FASANO, A. Cross-talk between enteric pathogens and the intestine. *Cell. Microbiol.* v. 2, n. 2, p. 83-89, 2000.
- VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae.* v.37, suppl 1, p. 147-150, 2009.
- WALLIS, T.S.; WOOD, M.; WATSON, P. et al. Sips, sops, and SPIs but not Stn influence *Salmonella* enteropathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* v. 473, p. 275-280, 1999.
- WALSH, C. *Antibiotics: action, origins, resistance.* Washington, DC: ASM PRESS, 2003. 335p.
- WARAY, C., SOJKA, W.J. Experimental *Salmonella typhimurium* infection in calves. *Res. Vet. Sci.* v. 25, n. 2, p. 139-143, 1978.
- WHITE, G.; PIERCY, D.W.; GIBBS, H.A. Use of a calf salmonellosis model to evaluated the therapeutic properties of trimetoprim and sulphadiazine and their mutual potentiation in vivo. *Res. Vet. Sci.* v. 31, n. 1, p. 27-31, 1981.
- WHITTLE, G.; HUND, B.D.; SHOEMAKER, N.B. et al. Characterization of the 13-kilobase ermF region of the Bacteroides conjugative transposon CtnDOT. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 67, n. 8, p. 3488-3495, 2001.
- WORLD health organization report on infectious diseases 2000 – Overcoming antimicrobial resistance. World Health Organization 2000 Publication Code: WHO/CDS/2000.2. Acesso on-line: <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000>
- WU, S.; CHOULIARA, E.; JENSEN, L.B. et al. Evaluation of petrifilm™ select *E. coli* count plate medium to discriminate antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Acta Vet. Scand.* v. 50, n. 38, p. 1-7, 2008.
- ZHANG, S., KINGSLEY, R.A., SANTOS, R.L. et al. Molecular pathogenesis of *Salmonella enteric* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* v. 71, n. 1, p. 1-12, 2003.

CAPÍTULO 2

Sensibilidade aos agentes antimicrobianos de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreio gênica isoladas de bezerros do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais

Resumo

A diarreia em bezerros é decorrente de uma alteração da função gastrointestinal com hipersecreção intestinal ou má absorção e digestão, que acarreta prejuízos significativos na produção de carne e de leite. Tem como principais agentes etiológicos bacterianos a *Escherichia coli* e a *Salmonella* spp. que causam uma hipersecreção devido a presença de toxinas e ainda provocam inflamação, que pode levar o animal a desidratação, letargia, inapetência, piroxia, e assim há a necessidade de tratamento com o uso de antimicrobianos. O perfil de susceptibilidade de 62 amostras de *E. coli* e 26 amostras de *Salmonella* spp. provenientes de fezes de bezerras das regiões Centro Oeste e Alto Paranaíba do Estado de Minas Gerais foi determinado pelo método de diluição em ágar para nove antimicrobianos: ácido nalidíxico, amicacina, amoxicilina, ampicilina, cefoxitina, gentamicina, norfloxacina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina. Cada antimicrobiano foi testado em 14 diferentes diluições, de 0,03 a 256 µg/mL. Dentre as amostras de *E. coli* testadas, todas foram sensíveis a amicacina, porém apresentaram alta resistência ao ácido nalidíxico (53,2%), a amoxicilina (64,5%), a ampicilina (75,8%), a tetraciclina (91,9%) e a sulfametoxazol/trimetoprim (66,1%) e ainda 88,7% das amostras foram resistentes a pelo menos duas classes de antimicrobianos, sendo que dois isolados (3,2%) foram resistentes a todas as classes de antimicrobianos. Para as amostras de *Salmonella* spp. houve uma sensibilidade de 100% para a gentamicina, norfloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim, no entanto, o ácido nalidíxico e a cefoxitina apresentaram 15,4% de resistência. A sensibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. foi de 69,3% e 7,6% foram resistentes a mais de duas classes de antimicrobianos.

Palavras-chave: *E. coli*, *Salmonella* spp., bezerros, antibiograma, concentração inibitória mínima, Minas Gerais.

Abstract

Diarrhoea in calves is a result from an alteration in gastrointestinal function with intestinal hypersecretion, with poor absorption, which causes significant loss in the production from meat and milk. Has the main etiological agents *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. that cause a hypersecretion because of the presence of toxins and also cause inflammation that can take the animal to dehydration, lethargy, anorexia, pyrexia, requiring treatment with antibiotics. The susceptibility profile from 62 strains of *E. coli* and 26 of *Salmonella* spp. originated from calves at Minas Gerais was determined by the agar dilution method to nine antimicrobial nalidixic acid, amikacin, amoxicillin, ampicillin, cefoxitin, gentamicin, norfloxacin, trimethoprim / sulfamethoxazole, and tetracycline. Each antimicrobial was tested at 14 different dilutions, from 0.03125 to 256 mg / mL. Among the strains of *E. coli* tested, all were sensitive to amikacin, but showed high resistance to nalidixic acid (53.2%), amoxicillin (64.5%), ampicillin (75.8%), tetracycline (91.9%) and sulfamethoxazole / trimethoprim (66.1%) and even 88.7% of samples were resistant to at least two classes of antimicrobials, and two isolates (3.2%) were resistant to all classes of antimicrobials. For the the strains of *Salmonella* spp. there were a sensibility of 100% for gentamicin, norfloxacin and trimethoprim / sulfamethoxazole, however, nalidixic acid and cefoxitin showed 15.4% of resistance. Of strains isolated from *Salmonella*, 69.3% were sensible and 7.6% were resistant to more than two classes of antimicrobials.

1. **Keywords:** *E. coli*, *Salmonella* spp., calves, antibiogram, minimum inhibitory concentration, Minas Gerais.

2. Introdução

A diarreia em bezerros, juntamente com a tristeza parasitária e a pneumonia são as principais doenças de neonatos na produção de leite e de carne, causando grandes perdas econômicas pela mortalidade, baixa conversão alimentar e custos com tratamento e profilaxia (Leite e Lima, 1982; Feitosa et al., 2001; Barrington et al., 2002). Em São Paulo, a morbidade de diarreia alcança 90 a 100% dos neonatos e a mortalidade atinge cerca de 50% (Langoni et al., 2004). Em Minas Gerais, a frequência gira em torno de 19,75% (Botteon et al., 2008), e na região Centro Oeste e Alto Paranaíba, foi demonstrado que a diarreia é responsável por 60% e 100%, respectivamente, das enfermidades que acometem bezerros (Ferreira, 2009).

Alguns fatores epidemiológicos favorecem a maior susceptibilidade dos animais aos agentes infecciosos, influenciando no aumento da prevalência da diarreia. Tais condições são: colostragem inadequada promovendo uma falha de transferência de imunidade passiva; manejo alimentar, onde o animal não recebe alimento em quantidade e qualidade adequada, predispondo-o a infecções; manejo higiênico, onde instalações e utensílios estão em precárias condições sanitárias; mudanças climáticas, em que temperaturas elevadas e tempo úmido favorecem a disseminação dos agentes infecciosos; e aumento da densidade populacional nos bezerreiros aumentando a taxa de infecção (Benesi, 1999; Radostits et al., 2007).

As bactérias, os vírus e os protozoários estão envolvidos isoladamente ou associados na patogênese da diarreia em bezerros. As bactérias mais comumente encontradas são *Escherichia coli*, dos patótipos *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC),

E. coli enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras de toxinas semelhantes às de *Shigella* (STEC), que acometem animais mais jovens e a infecção localiza-se principalmente no intestino delgado; e *Salmonella* spp., geralmente causada pelos sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Dublin* acomete principalmente animais mais velhos, até três meses de idade, onde a infecção localiza-se no íleo e cólon. A infecção por *S. Typhimurium* permanece localizada no intestino e linfonodos mesentéricos e a por *S. Dublin* é mais invasiva podendo se tornar sistêmica e provocar aborto, meningoencefalite, poliartite, osteomielite ou pneumonia (Hinton et al., 1975; Rings et al., 1985; Bispham et al., 2001; Radostits et al., 2007). Elas causam diarreia por hipersecreção intestinal em função de enterotoxinas bacterianas ou inflamação causada na mucosa intestinal, que por provocar injúrias nas células absorptivas, promove ainda alterações na digestão e absorção de nutrientes (Argenzio, 1985).

Animais infectados que apresentem desidratação, inapetência, letargia e piroxia ou que tenham sangue ou fragmentos de mucosa nas fezes é recomendado o tratamento com antimicrobiano (Constable, 2009). Nestes casos os agentes antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento são: amoxicilina ou ampicilina e sulfonamida via intramuscular ou amoxicilina via oral, administrados sozinhos ou combinados com clavulanato de potássio, que é um inibidor de β -lactamase (White et al., 1981; Constable, 2004). Os antimicrobianos de segunda escolha são as cefalosporinas de terceira e quarta geração, e os de terceira opção, a fluorquinolona (Constable, 2009).

O uso de antimicrobianos contra infecções bacterianas foi um grande avanço e tornou o tratamento médico mais efetivo, assim como diminuiu a morbidade e a mortalidade das doenças (Mota et al.,

2005). No entanto, com o aparecimento da resistência microbiana aos antimicrobianos, seja devido a capacidade de adaptação genética dos microrganismos, erro no diagnóstico da doença, subdosificações dos fármacos, uso de antimicrobianos de largo espectro em detrimento daqueles de menor espectro, falta de programas educativos e de informação adequada, utilização inadequada dos antimicrobianos (dose, via de administração e tempo de tratamento), uso de antimicrobianos como profiláticos e como promotores de crescimento, tornou o uso de antimicrobianos uma preocupação global para a saúde pública e animal (World, 2000; Khachatryan et al., 2005). Uma vez que, patógenos outrora sensíveis ao tratamento deixam de responder ao mesmo e se adaptam e multiplicam na presença de alguns antimicrobianos. Assim, põe em risco a saúde do animal e dos seres humanos em decorrência da capacidade de transferência de genes de resistência dentro da espécie e entre espécies diferentes, bem como para espécies de hospedeiros diferentes (Mota et al., 2005; Trobos et al., 2009; Hunter et al., 2010).

Como principais consequências da resistência bacteriana aos antimicrobianos temos infecções resistentes com maiores índices de mortalidade dos animais, doenças persistentes com maior probabilidade de propagação de microrganismos resistentes a outros indivíduos, prolongamento do tratamento, necessidade de fármacos alternativos e mais caros, maior encargos financeiros e menor número de fármacos novos em concepção e desenvolvimento (World, 2000). Desta forma, é primordial que se tenha cuidado quanto ao uso de antimicrobianos, a fim de minimizar a resistência microbiana. A escolha do antimicrobiano deve ser baseada na identificação do microrganismo infectante, na classe de antimicrobiano, na sensibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos e nas

características do hospedeiro (Rang et al., 1997; Mota et al., 2005).

Para uma escolha acertada do tratamento é desejável que se conheça, se possível, o perfil de sensibilidade dos microrganismos da propriedade ou da região. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos antimicrobianos e a vigilância continuada são estratégias eficazes para avaliar e monitorar os agentes isolados das infecções, uma vez que evidenciam tendências de evolução temporal da susceptibilidade de cada espécie, e com isso, auxiliam na escolha da terapia (Gould, 2008).

Os valores de MIC permitem analisar as concentrações necessárias para um antimicrobiano eliminar com eficiência um microrganismo. Estes valores de concentração são de extrema importância para a escolha de um antimicrobiano adequado, pois permite constatar se a dose recomendada do fármaco é efetiva contra o agente infectante e ainda, se a dose necessária para ser obtida uma boa atividade bactericida ou bacteriostática pode ser administrada com segurança. O MIC também é uma ferramenta utilizada como marcador epidemiológico, visto que a identificação de novos ou incomuns padrões de resistência pode ser o primeiro indicativo de surto (Schwarz et al., 2010).

A determinação do perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de *E. coli* e *Salmonella* spp. é importante pois permite a identificação de drogas para as quais os microrganismos são sensíveis, possibilitando o emprego destas no tratamento antimicrobiano na diarreia. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil de susceptibilidade de isolados de *E. coli* patogênica e *Salmonella* spp. isoladas de fezes de bezerros do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, aos agentes antimicrobianos mais

comumente indicados e usados no tratamento de diarreia em bezerras.

3. Material e Métodos

Amostras

Foram utilizadas 98 amostras bacterianas, com 62 amostras de *E. coli* e 26 amostras de *Salmonella* spp, que já haviam sido coletadas, isoladas e identificadas em experimentos anteriores.

As 62 amostras de *E. coli* foram isoladas de fezes de bezerras com cinco a 90 dias de idade, no período de dezembro de 2006 a janeiro de 2007, em 20 propriedades com regime de criação semi-intensivo das regiões Centro Oeste e Alto Paranaíba do Estado de Minas Gerais (Ferreira, 2009). Após o isolamento, Andrade et al. (2009) genotipificaram as amostras de *E. coli*, e as classificaram em STEC (49/72), ETEC (5/72), EPEC (1/72) e outras (7/72).

As 26 amostras de *Salmonella* spp. foram isoladas de fezes de bezerras com até 120 dias de idade que apresentavam diarreia, de duas localidades da região Centro Oeste de Minas Gerais. Dezesete amostras foram coletadas em uma propriedade de gado leiteiro pertencente ao município de Martinho Campos, Minas Gerais, coletadas no período de junho a outubro de 2008 (Freitas, 2009). Outras nove amostras foram coletadas nas instalações da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária – UFMG, no período de outubro de 2009 a fevereiro de 2010 (Lasmar, 2010). Após as coletas, o isolamento foi realizado por Coura et al. (2010) segundo Waray e Waray (2000) e a fenotipificação dos isolados foi

realizada no Laboratório de Referência de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, que as identificaram em *S. Agona* (17/26), *S. Typhimurium* (4/26), *S. Enteritidis* (2/26), *S. enterica enterica* (2/26) e um isolado *Salmonella* spp., que até a realização do experimento não havia sido fenotipificada.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A padronização das concentrações estoques dos antimicrobianos foi realizada segundo as recomendações do manual do CLSI M100-S18 (Performance, 2009). Foram testados os antimicrobianos ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), amicacina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), amoxicilina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), ampicilina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), cefoxitina (Fluka, Saint Louis, USA), gentamicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), norfloxacin (Fluka, Saint Louis, USA), tetraciclina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), sulfametoxazol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) e trimetoprim (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (19 partes de sulfametoxazol para 1 parte de trimetoprim). Estes foram diluídos em solventes e diluentes específicos conforme a pureza ou potência de cada antimicrobiano e preparado as concentrações estoques, 5120 µg/mL, 640 µg/mL, 80 µg/mL, 10 µg/mL e 1,25 µg/mL, as quais eram armazenadas a -20°C.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi realizada segundo as recomendações do manual do CLSI M07-A8 (Methods, 2009). Para o preparo das placas de ágar Muller Hinton (Difco, Destroit, USA) acrescido dos antimicrobianos nas 14 concentrações variando de 0,03125 µg/mL a 256 µg/mL, foi feito pesagem do ágar para 50 mL, acrescido 47 mL de água destilada e autoclavada (127°C por 15 minutos). Após

autoclavação os meios foram resfriados a 37°C, adicionado 3 mL da concentração adequada do antimicrobiano e distribuído em duas placas, esse processo era feito para cada concentração de cada antimicrobiano. Para o preparo do inóculo, as amostras bacterianas foram crescidas em ágar MacConkey (Difco, Detroit, USA) por 24 horas a 37° C. Após incubação, as bactérias foram suspensas em PBS estéril (pH 7,2) em uma concentração equivalente à escala 0,5 de Mac Farland.

As suspensões bacterianas foram transferidas para os poços do repicador de Steers e posteriormente inoculadas em placas contendo ágar Mueller Hinton (Difco, Detroit, USA) acrescido dos antimicrobianos nas concentrações testadas. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas, quando foi realizada a leitura dos resultados.

Controle de qualidade

Todos os antimicrobianos foram testados com as amostras de referência: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35918, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para garantir que os resultados obtidos estivessem dentro dos limites aceitáveis de controle de qualidade para a determinação da concentração inibitória mínima pelo manual CLSI, documento M100-S19 (Performance, 2009).

Em todas as determinações, as amostras de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 foram utilizadas como controles de qualidade. Além da utilização das amostras controle também foram empregadas, em cada ensaio, quatro placas de ágar Mueller-Hinton sem antibiótico como controle do crescimento das amostras, sendo duas no início da sequência de placas com antimicrobiano e duas ao final desta sequência.

Critérios interpretativos para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados da concentração inibitória mínima 50% (MIC₅₀) e 90% (MIC₉₀), que são as concentrações mínimas necessárias para inibir 50% e 90% das amostras respectivamente, e o intervalo dos resultados foram computados para cada antimicrobiano testado. As amostras foram classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes seguindo os critérios utilizados para interpretação dos resultados para *Enterobacteriaceae*, conforme manual CLSI, documento M100-S19 (Performance, 2009).

Para a associação trimetoprim/sulfametoxazol (1/19) só existe classificação das amostras como sensível ($\leq 2/38$) ou resistente ($\geq 4/76$), no entanto as diluições padronizadas pelo manual diferem deste ponto de corte, desta forma não existiria classificação para resultados intermediários. Assim, para uma padronização dos resultados, em nosso estudo, valores de MIC entre esses pontos foram classificados como intermediários.

4. Resultados

Escherichia coli

Os resultados obtidos mostraram que as amostras de *E. coli* isoladas de bezerros apresentaram uma alta porcentagem de resistência aos antimicrobianos, sendo a tetraciclina o antimicrobiano que apresentou maior resistência (91,9%), e a amicacina o antimicrobiano mais eficiente com 100% de sensibilidade das amostras.

A Tabela 1 apresenta a variação encontrada nas 62 amostras de *E. coli* aos

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade a nove antimicrobianos de 62 amostras de *Escherichia coli* diarreio gênica isoladas de bezerras do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2006 a janeiro de 2007

Agente Antimicrobiano	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)					Resistente			Intermediário			Sensível		
	Variação	MIC50 ^a		MIC90 ^b		PC ^d	N ^c	% ^e	PC	N ^c	% ^e	PC	N ^c	% ^e
		Valor	N ^c	Valor	N ^c									
Inibidor Folato														
Trimetoprim /Sulfametoxazol	0,025/0,475 - >12,8/243,2	>12,8/243,2	62	>12,8/243,2	62	≥4/76	41	66,1	- ^f	3	4,9	≤2/38	18	29
Penicilina														
Amoxicilina	4,0 - >128	>128	62	>128	62	≥32	40	64,5	16	1	1,6	≤8	21	33,9
Ampicilina	0,5 - >128	>128	62	>128	62	≥32	47	75,8	16	1	1,6	≤8	14	22,6
Cefalosporina														
Cefoxitina	2,0 - 32	4	49	16	58	≥64	4	6,5	32	3	4,8	≤8	55	88,7
Aminoglicosídeo														
Amicacina	1,0 - 16	2	44	4	58	≥64	0	0	32	0	0	≤16	62	100
Gentamicina	0,5 - >64	1	44	32	60	≥16	11	17,7	8	0	0	≤4	51	82,3
Tetraciclina														
Tetraciclina	1,0 - >64	>64	62	>64	62	≥16	57	91,9	8	1	1,6	≤4	4	6,5
Quinolona														
Ácido Nalidíxico	2,0 - >128	128	33	>128	62	≥32	33	53,2	0	0	0	≤16	29	46,8
Norfloxacina	0,03 - >64	0,03	33	64	62	≥16	13	21	8	0	0	≤4	49	79

a - MIC₅₀: Concentração Inibitória Mínima 50%; b - MIC₉₀: Concentração Inibitória Mínima 90%; c - N: Número de amostras; d - PC: Ponto de Corte segundo Performance (2009); e - %: Porcentagem de amostras; f - conforme Performance (2009) as referências para Trimetoprim/Sulfametoxazol não possuem padrão para intermediária, porém encontramos valores entre a referência de sensível e resistente, então a consideramos como intermediária.

antimicrobianos, assim como os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ e a porcentagem de resistência e sensibilidade das amostras. Podemos observar que os antimicrobianos que mostraram menor resistência foram a amicacina (0%), a cefoxitina (6,5%), a gentamicina (17,7%) e a norfloxacina (21%), enquanto que o ácido nalidíxico, a amoxicilina, a ampicilina, a tetraciclina e o sulfametoxazol/trimetoprim tiveram uma

alta resistência, de 53,2%, 64,5%, 75,8%, 91,9% e 66,1%, respectivamente. A variação entre MIC₅₀ e MIC₉₀ foi grande para os antimicrobianos gentamicina e norfloxacina. Uma alta frequência de multirresistência foi observada nas amostras de *E. coli*, onde 88,7% das amostras foram resistentes a no mínimo duas classes diferentes de antimicrobianos, esses dados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Prevalência de resistência a várias classes de antiimicrobianos de 62 amostras de *Escherichia coli* diarréiogênica isoladas de bezerras do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2006 a janeiro de 2007

Classe de antimicrobiano ^a	Amostra ^b (N)	% Resistência ^c
PEN	2	3,2
TET	5	8,1
PEN + TET	2	3,2
TET + INF	2	3,2
QIN + INF	1	1,6
QIN + PEN + TET	5	8,1
QIN + TET + INF	4	6,5
PEN + TET + INF	12	19,4
QIN + PEN + INF	1	1,6
PEN + AMN + TET + INF	5	8,1
QIN + PEN + TET + INF	15	24,2
QIN + PEN + CEF + TET + INF	2	3,2
QIN + PEN + AMN + TET + INF	4	6,4
QIN + PEN + CEF + AMN + TET + INF	2	3,2
Total	62	100

a – abreviações das classes de antimicrobianos: PEN: penicilina; TET: tetraciclina; INF: inibidor do folato; QIN: quinolona; AMN: aminoglicosídeo; CEF: cefalosporina; b – número de amostras resistentes; c – porcentagem de amostras resistentes.

A análise da resistência em relação aos patótipos de *E. coli* está representada na Tabela 3, onde observamos que o maior número (79%) de amostras pertence ao sorotipo *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e, como estão em uma proporção muito maior que os outros patótipos, determinaram o perfil de resistência mencionado na Tabela 1 e 2. Os dados epidemiológicos referentes a estas amostras que estão apresentados nessa tabela foram retirados de Ferreira (2009).

Salmonella

Os resultados encontrados para as 26 amostras de *Salmonella* spp. de bezerros apresentaram uma alta sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos testados, com 100% de sensibilidade à gentamicina, à norfloxacina e ao sulfametoxazol/trimetoprim. O ácido nalidíxico e a cefoxitina mostraram maior resistência (15,4%) em relação aos outros antimicrobianos testados. Para a cefoxitina foi observado que 19,2% das amostras exibiram perfil de isolados com resultado intermediário, demonstradas na Tabela 4.

As amostras de *Salmonella* spp. mostraram uma sensibilidade de 69,3% aos antimicrobianos e somente 7,6% foram resistentes a mais de duas classes de antimicrobianos (Tab. 5).

A análise da resistência em relação aos patótipos de *Salmonella* spp. esta representada na Tabela 6.

Tabela 3: Resistência aos antimicrobianos de 62 amostras diarreiológicas de *Escherichia coli* isoladas de bezerras do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, Brasil, no período de dezembro de 2006 a janeiro de 2007, a nove antimicrobianos

Patotipo ^a	Idade (dias)	N ^b	Propriedade ^c	% Amostras Resistentes								
				Nal ^d	AMK ^e	AMOX ^f	AMP ^g	Cfx ^h	GEN ⁱ	NOR ^j	TET ^l	SXT ^m
STEC	12 - 28	5	1	100	0	100	100	0 ⁿ	0	0	100	80
	30 - 56	14	4	7,1	0	64,3	71,4	0	21,4	0	85,7	57,1 ⁿ
	24 - 57	6	5	50	0	100	100	0 ⁿ	0	0	100	33,3 ⁿ
	26 e 27	3	8	33,3	0	100	100	0	33,3	0	100	66,7
	24 - 57	18	9	66,7	0	44,4	66,7	5,6	5,6	38,9	94,4 ⁿ	77,8 ⁿ
	24	1	17	100	0	100	100	0	0	100	100	100
	31	1	19	0	0	0	0	0	0	0	100	100
	31	1	20	0	0	100	100	0	100	0	100	100
Subtotal		49		46,9	0	67,3	77,6	2,0	14,3	16,3	93,9	61,2
ETEC	19	1	8	100	0	100	100	0	100	0	100	100
	60	1	13	0	0	0 ⁿ	0	0	0	0	100	0
	9	3	17	100	0	0	33,3	33,3	0	100	100	100
Subtotal		5		80	0	20	40	20	20	60	100	80
EPEC	28	1	1	100	0	0	100	0	0	100	100	100
Subtotal		1		100	0	0	100	0	0	100	100	100
Outros	42	2	4	50	0	100	100	0	0	0	100	100
	22 - 43	4	5	75	0	100	100	50	75	25	75	75
	31	1	20	100	0	0	0	0	0	0	0	100
Subtotal		7		71,4	0	85,7	85,7	28,6	42,9	14,3	71,4	85,7
Total		62		20,5	0	24,8	29,1	2,5	6,3	6,3	35,3	25,4

a – Patotipos: STEC: *E. coli* produtora de toxina Shiga; ETEC: *E. coli* enterotoxigênica; EPEC: *E. coli* enteropatogênica, Outros: amostras que possui genes de virulência, porém não se encaixam nos sorotipos; b – N: número de amostras; c – Propriedades 1 a 10 pertence a região Centro-Oeste e de 11 a 20 à região Alto Paranaíba; d – Nal: ácido nalidíxico; e – AMK: amicacina; f – AMOX: amoxicilina; g – AMP: ampicilina; h – Cfx: cefoxitina; i – GEN: gentamicina; j – NOR: norfloxacin; l – TET: tetraciclina; m – SXT: sulfametoxazol/trimetoprim; n – foi encontrada uma amostra com valores intermediários para os respectivos antimicrobianos.

Tabela 4: Perfil de susceptibilidade a nove antimicrobianos de 26 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de bezerros do Centro Oeste de Minas Gerais, Brasil, no período de junho a outubro de 2008

Agente Antimicrobiano	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{L}/\text{mL}$)					Resistente			Intermediário			Sensível		
	Variação	MIC50 ^a		MIC90 ^b		PC ^d	N ^c	% ^e	PC	N ^c	% ^e	PC	N ^c	% ^e
		Valor	N ^c	Valor	N ^c									
Inibidor Folato														
Trimetoprim /Sulfametoxazol	0,1/1,9 – 0,8/15,2	0,2/3,8	25	0,2/3,8	25	$\geq 4/76$	0	0	0	0	0	$\leq 2/38$	26	100
Penicilina														
Amoxicilina	1 - >256	1	14	2	24	≥ 32	2	7,7	16	0	0	≤ 8	24	92,3
Ampicilina	1 - >128	4	24	4	24	≥ 32	1	3,8	16	0	0	≤ 8	25	96,2
Cefalosporina														
Cefoxitina	2 - >256	4	14	32	24	≥ 64	4	15,4	32	5	19,2	≤ 8	17	65,4
Aminoglicosídeo														
Amicacina	2 – 32	4	25	4	25	≥ 64	0	0	32	1	3,8	≤ 16	25	96,2
Gentamicina	1	1	26	1	26	≥ 16	0	0	8	0	0	≤ 4	26	100
Tetraciclina														
Tetraciclina	1 – 64	2	22	8	25	≥ 16	1	3,8	8	2	7,7	≤ 4	23	88,5
Quinolona														
Ácido Nalidíxico	4 - >128	8	21	32	24	≥ 32	4	15,4	0	0	0	≤ 16	22	84,6
Norfloxacina	0,06 - 1	0,12	20	0,5	24	≥ 16	0	0	8	0	0	≤ 4	26	100

a - MIC₅₀: Concentração Inibitória Mínima 50%; b – MIC₉₀: Concentração Inibitória Mínima 90%; c – N: Número de amostras; d – PC: Ponto de Corte segundo Performance (2009); e - %: Porcentagem de amostras.

Tabela 5: Prevalência de resistência a várias classes de antimicrobianos de 26 amostras de *Salmonella* isoladas de bezerros do Centro Oeste de Minas Gerais, Brasil, no período de junho a outubro de 2008

Classe de antimicrobiano ^a	Número de Amostras (N=26)	% Resistência ^c
QIN	4/26	15,4
CEF	2/26	7,7
PEN + CEF	1/26	3,8
PEN + CEF + TET	1/26	3,8
INF + AMN	26/26	0
Total	26	30,7

a – abreviações das classes de antimicrobianos: QIN: quinolona; CEF: cefalosporina; PEN: penicilina; TET: tetraciclina; INF: inibidor do folato; AMN: aminoglicosídeo; c – porcentagem de amostras resistentes.

Tabela 6: Resistência aos antimicrobianos de 26 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de bezerras no Estado de Minas Gerais, Brasil, no período de junho a outubro de 2008, a nove antimicrobianos

Sorotipo	N ^a	% Amostras Resistentes ^b								
		Nal	AMK	AMOX	AMP	Cfx	GEN	NOR	TET	SXT
	1	0	0	5,9	5,9	5,9	0	0	5,9	0
	2	11,8	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	5,9	0	0	0	0
<i>S. Agona</i>	1	0	0	0	0	5,9	0	0	0 ^c	0
	1	0	0	0	0	0 ^c	0	0	0 ^c	0
	1	0	0	0	0	0 ^c	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal	17	11,8	0	5,9	5,9	5,9	0	0	5,9	0
<i>S. Typhimurium</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i>	2	11,8	0	0	0	0 ^c	0	0	0	0
Subtotal	2	11,8	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Enterica</i>	1	0	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	1	0	0	5,9	0	5,9	0	0	0	0
Subtotal	1	0	0	5,9	0	5,9	0	0	0	0
Total	26	1,0	0	0,5	0,3	1,0	0	0	0,3	0

a – N: número de amostras; b – % de amostras resistentes aos antimicrobianos: Nal: ácido nalidíxico; AMK: amicacina; AMOX: amoxicilina; AMP: ampicilina; Cfx: cefoxitina; GEN: gentamicina; NOR: norfloxacina; TET: tetraciclina; SXT: sulfametoxazol/trimetoprim; c – foi encontrada uma amostra com valores intermediários para os respectivos antimicrobianos.

5. Discussão

A diarreia é uma das principais causas de prejuízos na criação de bezerros, seja pelos índices de mortalidade dos animais afetados, pelos custos com tratamento ou ainda pelo menor desenvolvimento dos animais acometidos (Leite e Lima, 1982; Botteon et al., 2001; Feitosa et al., 2001; Barrington et al., 2002). Assim, com o frequente aumento na resistência a antimicrobianos observados nas amostras de *E. coli* e, em menor proporção, de *Salmonella* spp., o estudo da sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos tem importante papel na eficácia do tratamento escolhido para a diarreia, bem como na diminuição da ocorrência de resistência bacteriana (Khachatryan et al., 2005; Berge et al., 2006; Gow et al., 2008; Alexander et al., 2009). Uma vez que esta resistência pode ser transferida de bactérias infectando animais para patógenos humano, ela se torna ainda mais importante, pois a alta prevalência de multiresistência em amostras de origem animal pode representar um risco para aquisição de amostras com esse perfil de multiresistência pelo homem, tornando um risco para saúde pública (Trobos et al., 2009; Hunter et al., 2010).

Analisando os resultados encontrados neste estudo (Tab. 4 e 7), verifica-se que a amplitude de variação dos resultados dos isolados de *E. coli* foi grande para todos os antimicrobianos, destacando-se a ampicilina, a gentamicina e a sulfametoxazol/trimetoprim. Estes dados indicam uma heterogeneidade das amostras, possivelmente, em função de uma adaptação inicial de resistência dos microrganismos a esses antimicrobianos. Nas amostras de *Salmonella*, essa variação destaca-se somente para os antimicrobianos amoxicilina, ampicilina e cefoxitina. No entanto, esse resultado foi influenciado por

amostras com resultados extremos, visto que o MIC₅₀ e MIC₉₀ não apresentaram ampla variação, exceto para cefoxitina onde se observa uma prevalência de 19,2% das amostras com resultado intermediário para MIC, que indica uma tendência desses isolados a resistência. Não houve variação entre as amostras para a gentamicina, mostrando uma alta homogeneidade dos isolados de *Salmonella*.

Todas as amostras de *E. coli* testadas neste estudo foram resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobiano. As principais classes foram o inibidor do folato, a penicilina, a tetraciclina e a quinolona. Estes antimicrobianos são frequentemente usados para o tratamento de diversas infecções na criação de bovinos, como diarreia, mastite, endometrite, pneumonia, tristeza parasitária, manqueira, enterite bacteriana, artrite infecciosa entre outras. Normalmente estes antimicrobianos são escolhidos devido ao seu baixo custo e amplo espectro de ação, atuando contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e protozoários e, com este amplo uso dos agentes antimicrobianos, possivelmente, torna o tratamento ineficaz e ainda, favorece a disseminação de isolados multiresistentes.

Outros fatores que podem explicar a grande quantidade de propagação de agentes microbianos resistentes são o manejo sanitário, as instalações dos bezerreiros e a idade dos animais (Tab. 2 e 3). Quanto ao manejo sanitário das propriedades amostradas, 95% delas não faziam vacinação contra agentes da diarreia nas vacas no período pré-parto; 45% dos piquetes maternidade não apresentavam condições higiênicas adequadas; 50% das propriedades não monitoravam o nascimento dos bezerros e, em 60% dos casos, estes permaneciam no mínimo 48 horas com a mãe, o que favorece o risco de contaminação. Além disso, em 45% das propriedades a colostragem era realizada

sem qualquer monitoramento, não havendo controle da quantidade e qualidade ingerida pelo bezerro, idade em que a imunidade passiva é essencial para saúde e sobrevivência do animal (Radostits et al., 2007). Apesar da maioria das instalações da fase de aleitamento (até 60 dias de idade) serem individuais, o que poderia diminuir o risco de transmissão de doenças, elas, na maioria das vezes, estavam localizadas abaixo dos lotes das categorias de animais mais velhos, aumentando o risco de infecção dos bezerros, principalmente pelo escoamento da água contaminada dos outros lotes (Ferreira, 2009), este fator, pode ter contribuído para a grande porcentagem de isolados resistentes a antimicrobianos.

No estudo de Ferreira (2009) é possível notar que quanto às características do piquete maternidade (localização, sombreamento, higiene e densidade) e do manejo mãe-cria (limpeza corporal da vaca, colostragem e parto) os resultados obtidos são melhores para as propriedades da região do Alto Paranaíba (propriedade 11 a 20) do que para região Centro-Oeste (propriedade 1 a 10) (Tab. 1 e 2), que, provavelmente, reflete na maior proporção de isolados de *E. coli* patogênicos na região Centro-Oeste (87,1% dos isolados pertenciam a esta região). Outro fator que pode ter favorecido a resistência encontrada é a idade dos animais, de 9 a 60 dias de idade, uma vez que trabalhos mostram que bezerros com mais de 14 dias de idade têm maior porcentagem de *E. coli* multirresistentes do que os animais mais jovens (Berge et al., 2005; Berge et al., 2006; Gow et al., 2008).

As amostras foram classificadas como multirresistentes quando apresentaram resistência a no mínimo duas classes de antimicrobianos, desta forma, em nosso estudo foi encontrada uma multirresistência de 88,7% das amostras de *E. coli*, estes resultados são superiores aos encontrados por Checkley et al. (2008) e

Sawant et al. (2007), que encontraram 63,4 e 48,88% respectivamente. Vale ressaltar que dois desses isolados (3,2%) foram resistentes a todas as classes de antimicrobianos usadas neste experimento. Estes isolados são oriundos de uma única propriedade, e os animais estavam com 43 dias de idade.

A diferença de resistência encontrada, às vezes, dentro da mesma classe de antimicrobianos, como o que ocorre com os β -lactâmicos, resultado encontrado também por Alexander et al. (2009) e Gunn et al. (2003), pode ser explicada pelo fato das penicilinas serem menos resistentes às penicilases do que as cefalosporinas. Além do custo, onde as penicilinas são mais baratas, fator que normalmente é preponderante na escolha do antimicrobiano pelo produtor, e outras possíveis formas de aquisição de genes de resistência, como plasmídeos e integrons (Spinosa, 2002a).

Com os antimicrobianos que afetam a síntese das proteínas bacterianas, a maior porcentagem de resistência para as amostras de *E. coli* foi para tetraciclina (91,9%), que apresenta determinantes de resistência amplamente espalhados entre bactérias Gram-negativas (Spinosa, 2002b). Sawant et al. (2007) mostra que essa resistência acontece por aquisição de gene de efluxo (*tetA*) e repressor (*tetR*), e este achado esta de acordo com outros estudos que mostraram uma resistência variando de 27% a 92,9% (Filho et al., 2007; Cagnacci et al., 2008; Checkley et al., 2008; Gow et al., 2008; Alexander et al., 2009; Trobos et al., 2009).

O uso dos aminoglicosídeos é bem menor devido, provavelmente, ao seu maior custo e menor espectro de ação, tendo como alvo bactérias Gram-negativas e isto pode ter refletido na menor porcentagem de amostras resistentes a esta classe para as *E. coli*. Onde para amicacina a resistência foi

de 0% e para gentamicina 17,7%, este dado é maior que os encontrados por outros pesquisadores que encontraram valores menores que 1% (Gow et al., 2008a,b). A porcentagem de resistência para gentamicina na Bélgica alcançou 53,3% em 2002, porém em 2004 este valor foi reduzido para 7,6% (Hendriksen et al. 2008).

Dentro das quinolonas, classe de antimicrobianos que afetam a topoisomerase II, o que podemos observar é que o ácido nalidíxico (1ª geração) tem porcentagem maior de resistência do que a norfloxacina (2ª geração). Isto pode ser explicado pelo fato da resistência a quinolona de 1ª geração se desenvolver bem mais rapidamente que em outras gerações, sendo o mecanismo mais frequente as alterações nos genes *gyrA* e *gyrB* (DNA girase) e *parC* e *parE* (topoisomerase II), ou por repetições de proteínas que bloqueiam a ação das quinolonas nas topoisomerases II e IV (Hopkins et al., 2005; Robcsek et al., 2006; Cagnacci et al., 2008).

Essa alta taxa de multirresistência encontrada nos isolados de *E. coli*, provavelmente é devido a mecanismos comuns de resistência a vários antimicrobianos, como por exemplo, a bomba de efluxo, ou aquisição de vários mecanismos de resistência específica a um antimicrobiano, como o que ocorre quando há alteração no sítio de ação do antibiótico desenvolvido pelas amostras. Pode ser ainda devido ao sistema de produção, onde temos uma exposição maior dos animais à antimicrobianos, a falta de diagnóstico da doença e controle na aquisição do medicamento, mal dosagem, tempo de aplicação inadequado e uso contínuo.

Para *Salmonella* spp. 69,2% dos isolados mostraram-se sensíveis aos antimicrobianos testados e somente 7,6% das amostras foram resistentes a duas ou

mais classes de antimicrobianos. Outros estudos mostram que a multirresistência encontrada foi de 16,6% (Edrington et al., 2008) e 0% (Pereira et al., 2004). Para os antimicrobianos sulfametoxazol/trimetoprim, amicacina, gentamicina e norfloxacina a prevalência da resistência foi de 0% estes resultados corroboram com os encontrados por outros pesquisadores (Pereira et al., 2004; Edrington et al. 2008), no entanto divergem de Douadi et al. (2010) e Harbottle et al. (2006) que encontraram de 12 a 20% de resistência para gentamicina e sulfametoxazol/trimetoprim. Os resultados para ampicilina (3,8%), tetraciclina (3,8%) e ácido nalidíxico (15,4%) encontrados neste estudo foram inferiores a outros, onde a resistência variou de 24 a 80% para ampicilina, 64 a 95% para tetraciclina e de 0 a 36% para o ácido nalidíxico (Harbottle et al., 2006; Edrington et al., 2008; Douadi et al., 2010; Perugini et al., 2010).

Os resultados encontrados neste experimento para *Salmonella* spp. podem ser explicados pelo manejo que se utilizava na propriedade em que foi coletada maior parte das amostras (65,4%), onde após o nascimento dos bezerros era feito a cura do umbigo e, em seguida eram levados aos bezerreiros onde permaneciam até completarem 60 dias de idade. Ao chegarem ao bezerreiro eram dados dois litros de *pool* de colostro (Freitas, 2009). O restante das amostras (34,6) foram coletadas de animais que estavam alojados no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária - UFMG, que só recebiam antibioticoterapia caso apresentassem quadro febril. Outro fator que pode estar relacionado com a baixa prevalência de isolados de *Salmonella* resistentes é o fato delas serem microrganismos intracelulares de células fagocíticas (macrófagos) e não fagocíticas (vacúolos) (Salcedo et al., 2001; McGhie et al., 2009), diminuindo a chance de contato com o antimicrobiano, que muitas vezes, não consegue entrar na célula

do hospedeiro para alcançar o alvo microbiano. Desta forma, teoricamente, não há pressão seletiva para bactérias que expressem mecanismos de resistência à antimicrobianos e estas não precisam gastar energia para manter esses mecanismos expressos.

Existem vários fatores que contribuem para aquisição de mecanismos de multirresistência, sejam determinantes intrínsecos dos microrganismos, como por exemplo, o que é encontrado em *E. coli* e *Salmonella*, que possuem sistema *acrAB* com importante papel tanto para adaptação da bactéria no trato gastrointestinal, quanto para expulsão de antimicrobianos (Ma et al., 1995; Thanassi et al., 1997); sejam determinantes adquiridos, como genes de resistência obtidos por elementos genéticos móveis, capazes de se disseminarem rapidamente dentro e entre populações microbianas, gerando uma multirresistência dos isolados. Normalmente, amostras de *E. coli* possuem uma elevada resistência aos antimicrobianos adquirida por plasmídeo, onde as tetraciclina, sulfonamidas e estreptomicinas são praticamente ineficazes em distribuição mundial (Hirsh e Zee, 2003).

Fazendo uma associação entre os patótipos encontrados e o perfil de resistência, podemos observar que para *E. coli* as maiores prevalências de resistência para norfloxacina (60%) foi para o patótipo ETEC e para gentamicina (42,9%) para patótipos classificados como outros, enquanto que para os patótipos restantes esta resistência não ultrapassou 16,3% para norfloxacina e 20% para gentamicina. Para *Salmonella* spp. não foi possível associar o perfil de resistência com o patótipo devido ao pequeno número de amostras, no entanto, podemos verificar uma porcentagem de amostras intermediárias para tetraciclina e cefoxitina no sorovar *S. Agona*, para cefoxitina no sorovar *S.*

Enteritidis e para amicacina no sorovar *S. entérica entérica*.

Os resultados desse estudo mostram que os antimicrobianos de primeira escolha (amoxicilina, ampicilina e sulfonamida), segundo Constable (2004), para o tratamento de diarreias não foram efetivos contra as amostras de *E. coli* testadas. Os antimicrobianos de segunda escolha (cefalosporinas de 3ª e 4ª geração) e de terceira escolha (fluorquinolona), conforme Constable (2009), apresentaram melhor ação (acima de 80%) contra os microrganismos. Os aminoglicosídeos, que não aparecem nas indicações de escolha, foram os que mostraram 100% de efetividade para ambas as bactérias, *E. coli* e *Salmonella* spp., sendo o mais indicado no tratamento de diarreia em bezerros.

A determinação do perfil de susceptibilidade das amostras é importante para direcionar o tratamento antimicrobiano escolhido. Neste estudo, vimos que o tratamento de primeira opção para diarreia em bezerros não se mostra eficaz contra as amostras de *E. coli*, onde observamos altas taxas de resistência para amoxicilina e ampicilina. Deve-se ter cautela quanto ao uso e a escolha do antimicrobiano devido ao grande número de amostras multirresistentes encontradas, onde 88,7% das amostras de *E. coli* foram resistentes a pelo menos duas classes diferentes de antimicrobianos e ainda, dois isolados apresentaram resistência a todas as classes de antimicrobianos testadas. Desta forma, é importante levar em consideração o perfil de resistência atual na região, pois esse pode oscilar durante o tempo e pode diferir de região para região, dependendo do comportamento das amostras e do uso de antimicrobianos. É necessário também avaliar o custo-benefício do antimicrobiano, onde o mais barato e normalmente amplamente usado pode não ser o mais eficaz, uma vez que pode haver recidivas da enfermidade ou menos sem cura e assim, o

que teria o menor custo se torna mais caro, com desperdício e ainda há, possivelmente, manutenção e distribuição de genes de resistência entre espécies. Estudos como este, são importantes em todo o Brasil para direcionar o tratamento escolhendo antimicrobianos com melhor custo-benefício e minimizando o aparecimento de bactérias multirresistentes, que é um problema não somente pelo aumento nos custos da produção, mas também para a saúde pública.

6. Conclusão

Todas as amostras de *E. coli* testadas foram sensíveis à amicacina. Já as amostras de *Salmonella* spp foram sensíveis a gentamicina, norfloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim.

Altas taxas de resistência para amoxicilina, ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina foram encontradas entre as amostras de *E. coli* diarreogênicas isoladas de bezerros em Minas Gerais.

Dois isolados de *E. coli* foram resistentes a todas as classes de antimicrobianos testados.

7. Referências bibliográficas

ANDRADE, G.I.; SANTOS, E.L.S.; COURA, F.M. et al. PCR multiplex para determinação de marcadores de virulência em *Escherichia coli* isolados de bovinos com diarreia em Minas Gerais. *Cienc. Anim. Bras.* suppl 1, p. 436-441, 2009.

ALEXANDER, K.A.; WARNICK, L.D.; WIDEMANN, M. Antimicrobial resistant *Salmonella* I dairy cattle in the United States. *Vet. Res. Commun.* v. 33, n. 3, p. 191-209, 2009.

ARGENZIO, R.A. Pathophysiology of neonatal calf diarrhea. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.* v. 1, n. 3, p. 461-469, 1985.

BARRINGTON, G.M.; GAY, J.M.; EVERMANN, J.F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal disease. *Vet. Clin. of North American: Food Anim. Pract.* v. 18, n.1, p. 7-34, 2002.

BENESI, F.J. Síndrome diarreia dos bezerros. *Rev. Do CRMV-ES.* v. 2, n. 3, p. 10-13, 1999.

BERGE, A.C.; LINDEQUE, P.; MOORE, D.A. et al. A clinical trial evaluating prophylactic and therapeutic antibiotic use on health and performance of calves. *J. Dairy Sci.* v. 88, n. 8, p. 2166-2177, 2005.

BERGE, A.C.; MOORE, D.A.; SISCHO, W.M. Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. *App. and Environ. Microbiol.* v. 72, n. 6, p. 3872-3878, 2006.

BISPHAM, J.; TRIPATHI, B.N.; WATSON, P.R. et al. *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect. Immun.* v. 69, n. 1, p. 367-377, 2001.

BOTTEON, R.C.C.M.; BOTTEON, P.T.L.; LÓSS, Z.G. Aspectos sanitários da pecuária leiteira na região do Médio Paranaíba- RJ e MG. *Rev. Bras. de Ciencia Vet.* v. 8, n. 3, p. 141-143, 2001.

- BOTTEON, R.C.C.M.; BOTTEON, P.T.L.; SANTOS JR, J.C.B. et al. Frequência de diarreia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo na região do médio Paranaíba – Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 45, n. 2, p. 153-160, 2008.
- CAGNACCI, S.; GUALCO, L.; DEBBIA, E. et al. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J. of Clin. Microbiol.* v. 46, n. 8, p. 2605-2612, 2008.
- CHECKLEY, S.L.; CAMPBELL, J.R.; CHIRINO-TREJO, M. et al. Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* obtained from beef cattle on arrival at the feedlot and prior to slaughter, and associations with volume of total individual cattle antimicrobial treatments in one western Canadian feedlot. *Canadian J. of Vet. Res.* v. 72, n. 2, p. 101-108, 2008.
- CONSTABLE, P.D. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.* v. 18, n. 1, p. 8-17, 2004.
- CONSTABLE, P.D. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. *Vet. Clin. Food Anim.* v. 25, n. 1, p. 101-120, 2009.
- DOUADI, B.; THONG, K.L.; WATANABE, H et al. Characterization of drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes, and PFGE. *J. Microbiol. Biotechnol.* v. 20, n. 6, p. 1042-1052, 2010.
- EDRINGTON, T.S.; CALLAWAY, T.R.; ANDERSON, R.C. et al. Prevalence of multidrug-resistant *Salmonella* on commercial dairies utilizing a single heifer raising facility. *J. of Food Protec.* v. 71, n. 1, p. 27-34, 2008.
- ESAKI, H.; MORIOKA, A.; ISHIHARA, K. et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J. of Antim. Chem.* v. 53, p. 266-270, 2004.
- FEITOSA, F.L.F.; BIRGEL, E.H.; CIARLINI, P.C. et al. Transferência de imunidade passiva colostrar e a morbidade e mortalidade de bezerros neonatos. *Rev. Do CRMV-SP.* v. 4, p. 9-15, 2001.
- FERREIRA, M.G. *Prevalência dos principais enteropatógenos em bezerras da fase de aleitamento em explorações leiteiras semi-intensivas de duas bacias leiteiras do Estado de Minas Gerais.* 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- FREITAS, M.D. *Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais de bezerros com diarreia neonatal naturalmente adquirida.* 2009. 95f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- FILHO, J.P.O.; SILVA, D.P.G.; PACHECO, M.D. et al. Diarreia em bezerros da raça nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesq. Vet. Bras.* v. 27, n. 10, p. 419-424, 2007.
- GOULD, I.M. Clinical relevance of increasing glycopeptides MICs against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* v. 31, n. 2, p. 1-9, 2008.
- GOW, S.P.; WALDNER, C.L.; RAJIÉ, A. et al. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* isolated in western Canadian beef herds. Part II –

- Cows and cow-calf pairs. *The Canadian J. of Vet. Res.* v. 72, n. 2, p. 91-100, 2008a.
- GOW, S.P.; WALDNER, C.L.; RAJIÉ, A. et al. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* isolated in western Canadian cow-calf herds. Part I – Beef calves. *The Canadian J. of Vet. Res.* v. 72, n. 2, p. 82-90, 2008b.
- GUNN, G.J.; HALL, M.; LOW, J.C. Comparison of antibiotic resistance for *Escherichia coli* populations isolated from groups of diarrhoeic and control calves. *The Vet. J.* v. 165, n. 2, p. 172-174, 2003.
- HARBOTTLE, H.; WHITE, D.G.; McDERMOTT, P.F.; WALKER, R.D.; ZHAO, S. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enteric* serotype Newport isolates. *J. of Clin. Microbiol.* v. 44, n. 7, p. 2449-2457, 2006.
- HENDRIKSEN, R.S.; MEVIUS, D.J.; SCHROETER, A. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different countries: 2002-2004. *Act. Vet. Scand.* v. 50, n. 28, p. 1-10, 2008.
- HINTON, M. *Salmonella* Dublin abortion in cattle: incidence and epidemiology. *Br. Vet. J.* v. 131, n. 1, p. 94-101, 1975.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.446, 2003.
- HOPKINS, K.L.; DAVIES, R.H.; THRELFALL, E.J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v. 25, n. 5, p. 358-373, 2005.
- HUNTER, P.A.; DAWSON, S.; FRENCH, G.L. et al. Antimicrobial-resistance pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 65, suppl 1, p. i3-i17, 2010.
- KHACHATRYAN, A.R.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. et al. Antimicrobial drug resistance genes do not convey a secondary fitness advantage to calf-adapted *Escherichia coli*. *App. and Environ. Microbiol.* v. 72, n. 1, p. 443-448, 2005.
- LANGONI, H.; LINHARES, A.C.; AVILA, F.A. et al. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. *Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 41, n. 5, p. 131-319, 2004.
- LEITE, R.C.; LIMA, J.D. Fatores sanitários que influenciam na criação de bezerros. *Arq. Esc. Vet. Da UFMG.* v. 34, n. 3, p. 485-492, 1982.
- MA, D.; COOK, D.N.; ALBERTI, M. et al. Genes AcrA and AcrB encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* v. 16, n. 1, p. 45-55, 1995.
- McGHIE, E.; BRAUN, L.C.; HUME, P.J. et al. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 12, n. 1, p. 117-124, 2009.
- METHODS for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 8. Ed. *Clin. and Lab. Stand. Ins.* v. 29, n. 2, p. M07-M08, 2009.
- MOTA, R.A.; SILVA, H.P.C.; FREITAS, M.F.L. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.* v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

- PEREIRA, R.N.; ÁVILA, F.A.; FERNANDES, S.A. Estudos do perfil epidemiológico da salmonelose em bezerros e da sensibilidade a antimicrobianos na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. *Ars. Vet.* v. 20, n. 1, p. 62-66, 2004.
- PERFORMANCE standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth information supplement. *Clin. and Lab. Stand. Inst.* v. 29, n. 3, p. M100-S19, 2009.
- PERUGINI, A.G.; CARULLO, M.R.; ESPOSITO, A. et al. Characterization of antimicrobial resistant *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolates from animal and food in southern Italy. *Vet. Res. Commun.* v. 34, p. 387-392, 2010.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. 2156p.
- RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. Agentes antimicrobianos. In: *Farmacologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. p. 572-592.
- RINGS, D.M. Salmonellosis in calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* v. 1, p. 529-539, 1985.
- ROBICSEK, A.; STRAHILEVITZ, J.; SAHM, D.F. et al. Prevalence in ceftazidime-resistant *Esterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 50, n. 8, p. 2872-2874, 2006.
- SALCEDO, S.P.; NOURSADEGI, M.; COHEN, J. et al. Intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages *in vivo*. *Cell Microbiol.* v. 3, n. 9, p. 587-597, 2001.
- SAWANT, A.A.; HEGDE, N.V.; STRALEY, B.A. et al. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *App. and Environm. Microbiol.* v. 73, n. 1, p. 156-163, 2007.
- SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S. et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol.* v. 141, n. 1-4, p. 1-4, 2010.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos beta-lactâmicos: penicilinas e cefalosporinas. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002a, p. 409-415.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol e análogos. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002b, p. 420-424.
- THANASSI, D.G.; CHENG, L.W.; NIKAIKO, H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* v. 179, n. 8, p. 2512-2518, 1997.
- TROBOS, M.; LESTER, C.H.; OLSEN, J.E. et al. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. *J. of Antimicrobial Chemoth.* v. 63, n. 1, p. 80-86, 2009.
- WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. New York: CABI Publishing. 2000, 463p.
- WHITE, G.; PIERCY, D.W.; GIBBS, H.A. Use of a calf salmonellosis model to evaluate the therapeutic properties of trimetoprim and sulphadiazine and their mutual potentiation *in vivo*. *Res. Vet. Sci.* v. 31, n. 1, p. 27-31, 1981.

WORLD health organization report on infectious diseases 2000 – Overcoming antimicrobial resistance. World Health Organization 2000 Publication Code: WHO/CDS/2000.2. Acesso on-line: <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000>.