Salmonelose em bezerros pelo sorovar Dublin no estado do Paraná, Brasil - aspectos clínico-patológicos

Salmonellosis in Calves by Serovar Dublin in Paraná State, Brazil - Clinicopathological Aspects

Ariel de Aguiar¹, Giovana Wingeter Di Santis¹, Melissa Cristina Müller¹, Ana Angelita Sampaio Baptista¹, Beatriz Queiroz dos Santos¹, Júlio Augusto Naylor Lisboa² & Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense¹

ABSTRACT

Background: Calf diarrhea remains one of the main diseases affecting the cattle industry. Persistence of this significant problem is associated with the complexity of factors that may be involved (infectious, environmental). An accurate diagnosis is essential for confirming the cause and helping clinicians and cattle producers to apply appropriate strategies in a timely manner. This report describes the histological changes according to the degree of salmonellosis severity, which is a contagious infectious disease caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, a Gram-negative bacterium, in two beef calves in northern Paraná State, southern Brazil.

Cases: Two 90-day-old crossbred Angus and Nellore calves from a beef farm in northern Paraná State were referred to a Veterinary Hospital. *Animal 1*- developed acute clinical signs (enteritis, ataxia, and muscle rigidity) and died the day after the signs began. Gross findings included heavy and non-collapsed lungs, pulmonary oedema, hepatomegaly, enteritis, and severe diffuse typhilitis. Microscopic analysis revealed severe diffuse necrotic enteritis, typhilitis, severe diffuse interstitial pneumonia, moderate centrilobular hepatic necrosis, mild multifocal nephritis, and severe spleen and lymph node necrosis. Paratyphoid nodules were evidenced on the liver, spleen, and mesenteric lymph nodes. *Animal 2*- presented apathy, green fibrinous diarrhea, and died three days after the onset of clinical signs. The macroscopic examination showed moderate diffuse enteritis and hepatosplenomegaly. At the microscopic examination, many paratyphoid nodules were observed on the liver, spleen, kidneys, and Peyer's patches, which were associated with intralesional and intravascular bacilli. Additional findings included severe diffuse fibrinous necrotic enteritis with intralesional bacilli, diffuse interstitial pneumonia, multifocal splenic necrosis, lymphoid depletion, and moderate multifocal to coalescent lymphocytic nephritis. Histological Gram staining was performed on selected samples, revealing intralesional Gram-negative bacilli in the liver and intestine. Thus, liver and intestine fragments were used for the microbiological examination. Microbiological culture, isolation and biochemical tests identified the genus *Salmonella* spp. Then, the colonies were subjected to serological tests for serovar identification, according to ISO/TR 6579-3, which determined the serovar Dublin. After identifying the disease etiological agent, the outbreak was controlled by appropriate antibiotic therapy combined with the correction of sanitary measures.

Discussion: Enteritis is a frequent disease in calves, posing a diagnostic challenge in identifying the etiological agent. In the present case, the histological, microbiological, and serological results confirmed a disseminated *Salmonella* spp. infection. The microscopic findings, such as interstitial pneumonia, fibrinous necrotic enteritis markedly in ileum and paratyphoid nodules in various organs, are the most common aspects of the disease. However, fibrinous cholecystitis, which is considered pathognomonic for salmonellosis, was not observed in this study. Therefore, the absence of such a lesion should not exclude the disease in sick animals. A microscopic injury score was used to determine lesion severity by assigning values from 1 to 4, wherein: 1 = no apparent lesions, 2 = mild lesions, 3 = moderate lesions, and 4 = severe lesions. Both calves were scored as 4. Multiple predisposing factors for the condition were identified in this farm such as different age animals in the same paddock and no specific paddock for sick animals, given that the infectious agent remains in feces, saliva, and nasal discharge. The serovar Dublin induces several clinical signs such as septicemic, respiratory, and enteric manifestations, making a clinical diagnosis a challenge.

Keywords: dysbiosis, calf diarrhea, infection, paratyphoid nodules, septicemia.

Descritores: disbiose, diarreia neonatal, infecção, nódulos paratífoides, septicemia.

DOI: 10.22456/1679-9216.113852

Received: 10 May 2021

Accepted: 22 August 2021

Published: 23 October 2021

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) & ²Departamento de Clínicas Veterinárias (DCV), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil. CORRESPONDENCE: A.P.F.R.L. Bracarense [anapaula@uel.br]. Laboratório de Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias - UEL. Rodovia Celso Garcia Cid. PR 445 Km 80. CEP 86057-970 Londrina, PR, Brazil.

INTRODUÇÃO

As doenças entéricas ocupam uma posição de destaque como causa de perdas econômicas na pecuária em âmbito mundial, pois diminuem o desempenho dos animais acometidos, além de ter alta mortalidade, geram gastos com métodos de diagnóstico, tratamentos e medidas preventivas [9,11,15].

Diversas condições estão associadas às enterites incluindo a rotavirose, eimeriose, criptosporidiose, colibacilose e as diarreias nutricionais (aleitamento artificial) [19]. Dentre os patógenos bacterianos que causam enterite em bezerros leiteiros e de corte, a *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, flagelada e aeróbica, ganha notoriedade por causar enfermidade com alta morbidade e mortalidade [3,14].

Diversos sorovares estão envolvidos na infecção e dentre eles, os mais comumente encontrados em bovinos são *S. Typhimurium* e *S. Dublin* distribuídos em todo o mundo [4]. O primeiro causa quadro agudo de enterite grave, diferente do segundo, que está associado a diversas manifestações sistêmicas desenvolvendo sinais respiratórios, entéricos e septicêmicos [11].

A patogênese da salmonelose bovina é bem elucidada [14], entretanto as alterações histológicas e os diferentes graus de lesão ocasionadas pelo sorovar Dublin são pouco documentados. Perante o exposto, este trabalho tem como objetivo relatar as diferentes alterações e apresentações clínico-patológicas da salmonelose em dois bezerros pelo sorovar Dublin na região norte do Paraná, sul do Brasil.

CASOS

Foram encaminhados a um Hospital Veterinário Escola 2 bezerros de cruzamento angus e nelore, 90 dias de idade, provenientes de uma propriedade de bovinocultura de corte, na região norte do Paraná. Ambos os bezerros partilhavam o mesmo piquete e havia outros de diferentes idades com as respectivas mães, que não apresentavam sinais clínicos. Os sinais clínicos e achados anatomopatológicos são descritos a seguir individualmente. Os animais não foram submetidos a tratamento e vieram a óbito. Foi realizada autópsia padrão e fragmentos de órgãos foram colhidos para realização de exame microbiológico e histopatológico. As amostras para histopatologia foram fixadas em solução de formol tamponado 10%, incluídas em parafina e cortes de 5 µm de espessura foram submetidos

a coloração de hematoxilina-eosina¹ (HE). Coloração histológica de Gram² foi realizada para evidencição de bactérias nos tecidos.

Fragmentos de intestino e fígado (1 g) foram incubados, na proporção 1:10, em água peptonada tamponada³ (1%) por 24 h a 37°C. Posteriormente transferiu-se 1 mL para 10 mL de caldo tetrationato novobiocina³ e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e incubados a 42°C por 24 h. A partir dos caldos de enriquecimento, foram semeadas em ágar verde brilhante³ (AV) e ágar MacConkey³, seguido de incubação a 37°C por 24 h. Posteriormente as colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos: “triple sugar agar”³ (TSI), ágar lisina ferro³ (LIA), caldo ureia³, citrato de Simmons³ e ágar sulfato/indol/motilidade³ (SIM). A confirmação do gênero foi realizada por sorologia frente ao soro polivalente antígeno O do grupo D (Probac[®])⁴. Provas de identificação do sorovar foram realizadas em laboratório particular seguindo protocolos convencionais de sorotipificação [10].

Caso 1. O animal desenvolveu quadro agudo e morte um dia após a identificação dos sinais clínicos na propriedade; referiu-se à enterite, ataxia e rigidez muscular. Na autópsia os lobos pulmonares crânio-ventrais estavam vermelho escuro, pesados e não colapsados, na traqueia em toda sua extensão havia moderada presença de líquido aerado, hepatomegalia e palidez difusa do parênquima hepático. Todo o intestino delgado e ceco estavam espessos e com a mucosa difusa e acentuadamente vermelho vivo e observou-se congestão moderada dos vasos das leptomeninges, além de equimoses e petéquias distribuídas por todo o epicárdio, petéquias por toda a serosa dos intestinos delgado, grosso e superfície da pleura parietal.

Na análise microscópica evidenciou-se enterite e tiflíte necrótica difusa acentuada, pneumonia intersticial difusa acentuada, congestão sinusoidal hepática difusa, degeneração vacuolar hepática moderada difusa e necrose centrolobular multifocal discreta (Figura 1). Outros órgãos também evidenciaram alterações como necrose e nefrose tubular multifocal moderada, nefrite intersticial multifocal moderada e leptomeningite linfocitária discreta. Adicionalmente, foram observadas numerosas áreas de necrose circunscritas por infiltrado inflamatório predominantemente histiocitário e em menor intensidade de neutrófilos (nódulos paratífoides) no fígado, baço, linfonodos mesentéricos e rim.

Caso 2. Animal foi atendido em Hospital Veterinário Escola apresentando apatia, diarreia esverdeada fibrinosa, ruído inspiratório com sibilos de tom grave, incoordenação motora grau 2, hipometria e arrastar de pinça do membro pélvico esquerdo. No hemograma realizado o eritrograma e leucograma estavam dentro dos valores de referência. Na análise de lesão hepática a enzima aspartato aminotransferase (AST) apresentou atividade aumentada (223 U/L) e gamaglutamiltransferase (GGT) atividade dentro de parâmetros da normalidade (19 U/L).

O animal veio a óbito 3 dias após o início dos sinais clínicos. Ao exame macroscópico o intestino delgado apresentava mucosa vermelho viva difusa e moderada, principalmente na região de íleo, hepatomegalia, esplenomegalia e os vasos das leptomeninges moderadamente congestos.

Ao exame microscópico foram observadas numerosas áreas de necrose circunscritas por infiltrado inflamatório predominantemente histiocitário seguido

por menor quantidade de neutrófilos (nódulos parati-foides) no fígado, baço, rim e em placas de Peyer do íleo, associado à presença de bacilos intralesionais (intracitoplasmáticos e livres no interstício) e no lúmen dos vasos (Figura 2). Observou-se ainda enterite necrótica fibrinosa acentuada com bacilos intralesionais, pneumonia intersticial acentuada, necrose esplênica acentuada com depleção linfóide, nefrite intersticial linfocítica multifocal a coalescente moderada, nefrose e necrose tubular multifocal moderada, e leptomenin-gite multifocal discreta.

Posteriormente os animais jovens da propriedade iniciaram quadro semelhante ao descrito, tendo sido estabelecido isolamento e tratamento adequado dos doentes.

DISCUSSÃO

O resultado do isolamento de *Salmonella* spp. e os achados microscópicos de pneumonia intersticial, enterite necrótica fibrinosa principalmente no íleo e

Figura 1. Fotomicrografias de diferentes órgãos de bezerros com salmonelose. A- Íleo: enterite necrótica difusa e acentuada [HE; Barra= 50 µm]. B- Baço: depleção linfóide acentuada [HE; Barra= 100 µm]. C- Pulmão: os septos alveolares estão espessados por um infiltrado mononuclear. Transudato rosa (edema) é observado na luz dos alvéolos [HE; Barra= 100 µm]. D- Fígado: Necrose centrolobular moderada [HE; Barra= 50 µm].

Figura 2. Fotomicrografias de diferentes órgãos de bezerro com salmonelose. A- Íleo - espessa camada de fibrina, neutrófilos, linfócitos degenerados e glóbulos vermelhos com abundantes cocobacilos cobrem a mucosa desnudada. A lâmina própria está repleta com numerosos linfócitos e histiócitos. Há destruição de vilosidades e criptas acentuada difusa [HE; Barra= 100 µm]. Em destaque na placa de Peyer é possível observar presença de nódulo paratifoide [HE; Barra= 50 µm]. B - Nódulo paratifoide no parênquima esplênico com bactérias intraluminais [HE; Barra= 20 µm]. C - Nódulo paratifoide no parênquima hepático [HE; Barra= 20 µm]. D- Parênquima hepático com agregados bacteriano gram-negativos [Gram; Barra= 10 µm].

nódulos paratifoide nos diversos órgãos (baço, fígado, rim e íleo) confirmam a infecção nos animais e são os achados mais comuns da doença [4,8,11,14]. Entretanto, a colecistite fibrinosa considerada patognomônica para a salmonelose [12], não foi observada nos bezerros deste estudo, portanto a ausência dessa lesão não deve respaldar o descarte da afecção nos animais doentes.

No exame histopatológico na coloração hematoxilina e eosina foi possível observar bacilos basofílicos intraluminais e no lúmen dos vasos sanguíneos. A coloração de Gram histológico evidenciou a coloração em vermelho, caracterizando bactérias Gram-negativas, tornando-se um diferencial importante para excluir o diagnóstico das clostridioses, pois estas são bactérias gram-positivas, e frequente causa de distúrbio entérico infeccioso nos bezerros, como por exemplo *Clostridium difficile* [17].

As lesões no pulmão, fígado, baço, linfonodos mesentéricos e rim indicam a disseminação e multiplicação bacteriana via linfática e hematogênica, proveniente da lesão inicial entérica, desencadeando o quadro septicêmico, caracterizada no exame macroscópico pela presença de equimoses e petéquias distribuídas por todo o epicárdio, serosa do intestino delgado, grosso e toda superfície da pleura parietal [8].

Para análise da gravidade das lesões foi utilizado o indicador de lesão microscópica, que atribui valores de 1 a 4, em que 1= sem lesões aparentes, 2= lesões leves, 3= lesões moderadas e 4= lesões graves [8]. Ambos os bezerros foram enquadrados no grau 4.

Os resultados de hemograma e enzimas de lesão hepática apresentam alta variabilidade, podendo encontrar-se dentro dos valores de referência, abaixo ou com aumento. Nos quadros agudos tem-se neutropenia com desvio à esquerda, acentuada neutropenia,

ou contagem de leucócitos normais. Nos animais subagudos ou crônicos evidencia-se neutrofilia discreta a moderada. O aumento da AST no caso 2 podem estar associadas às lesões hepáticas observadas [18].

A salmonelose é comumente diagnosticada na bovinocultura de leite [15] entretanto, neste caso trata-se de bovinocultura de corte. Independentemente de qual seja a aptidão e a raça dos animais, é fundamental considerar fatores que predisõem ao aparecimento da infecção, primeiramente a presença de animais de diferentes idades no mesmo ambiente, ocasionando a exposição de animais jovens sem a imunidade colostrar suficiente; o fornecimento de água que possa estar contaminada com fezes que albergam a *Salmonella* spp.; a introdução e movimentação de bezerros portadores, os quais quando submetidos ao estresse, reativam e liberam as bactérias, além da presença de roedores e aves selvagens, sabidamente fontes de infecção, próximos ao local onde estão alocados os bezerros [1,2,7,13,20,21].

Dentre os aspectos anteriormente citados na epidemiologia da doença, na propriedade em questão foram identificados os seguintes: animais de diferentes idades no mesmo piquete e ausência de piquete de separação para os animais doentes, pois a manutenção do agente no ambiente ocorre por meio da presença do microrganismo nas fezes, saliva e secreção nasal [11].

A taxa de sobrevivência dos doentes é inversamente proporcional à quantidade de *Salmonella* spp. inoculada e diretamente ligada à idade [4]. Animais com até 14 dias de idade possuem certa proteção proveniente do leite materno, por isso animais entre 14 e 90

dias são os mais suscetíveis, como demonstrado neste caso, porque são incapazes de desenvolver resposta imunológica rápida e eficiente contra o agente [11].

O sorovar Dublin induz sinais clínicos variáveis (septicêmicos, respiratórios e entéricos) [16], tornando o diagnóstico clínico um desafio. A não especificidade do quadro evoca outras suspeitas diagnósticas como as doenças constituintes do complexo das doenças respiratórias, a anaplasmosse e outros patógenos entéricos bacterianos e virais [5]. O histórico, associado ao quadro clínico e aos achados de autópsia e microscopia direcionam o caso para suspeita de salmonelose, mas para o diagnóstico definitivo são necessários o isolamento e a caracterização do agente, além de provas sorológicas para identificação do sorovar envolvido no quadro [6].

A diarreia em bezerros representa um quadro grave que pode ser fatal em neonatos. Considerando que vários patógenos, além de fatores ambientais podem estar envolvidos, o diagnóstico laboratorial é fundamental para estabelecer um diagnóstico acurado permitindo intervenções corretas e consequente redução das perdas econômicas.

MANUFACTURERS

¹Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Indaiatuba, SP, Brazil.

²Renylab Química e Farmacêutica Ltda. Barbacena, MG, Brazil.

³Neogen Corporation. Lansing, MI, USA.

⁴Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Barros C.S.L. 2007.** Salmonelose. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, pp.416-425.
- 2 Blanchard P.C. 2012.** Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 28(3): 443-464. DOI: 10.1016/j.cvfa.2012.07.002.
- 3 Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R. & Swaminathan B. 2000.** *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(7): 2465-2467.
- 4 Brown C.C., Baker D.C. & Baker I.K. 2007.** Alimentary system. In: Maxie M.G. (Ed). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th edn. Philadelphia: Saunders Elsevier, pp.193-204.
- 5 Cho Y.I. & Yoon K.J. 2014.** An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*. 15(1): 1-17.
- 6 Ekperigin H.E. & Nagaraja K.V. 1998.** Microbial food borne pathogens. *Salmonella*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 14(1):17-29 DOI: 10.1016/s0749-0720(15)30276-0.
- 7 Fenwick S.G. & Collett M.G. 2004.** Bovine salmonellosis. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds). *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town: Oxford University Press, pp.1582-1593.

- 8 Frizzo S.L., Zbrum V.M., Soto P.L., Bertozzi E., Sequeira J.G., Marti L.E., Signorini M.L., Armesto R.R. & Rosmini M.R. 2012. Pathogen translocation and histopathological lesions in an experimental model of *Salmonella* Dublin infection in calves receiving lactic acid bacteria and lactose supplements. *Journal of Veterinary Science*. 13(3): 261-270. DOI: 10.4142/jvs.2012.13.3.261.
- 9 Guizelini C.C., Pupin R.C., Leal C.R.B., Ramos C.A.N., Pavarani S.P., Gomes D.C., Martins T.B. & Lemos R.A.A. 2019. Salmonellosis in calves without intestinal lesions. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 39(8): 580-586. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6328.
- 10 Grimont P.A.D. & Weill F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars. 9th edn. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 166p.
- 11 Marques A.L.A., Simões S.V.D., Garino Junior F., Maia L.A., Silva T.R.D., Riet-Correa B., Lima E.F. & Riet-Correa F. 2013. Surto de salmonelose pelo sorovar Dublin em bezerros no Maranhão. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(8): 983-988. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000800006.
- 12 Mohler V.L., Izzo M.M. & House J.K. 2009. *Salmonella* in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 25(1): 37-54. DOI: 10.1016/j.cvfa.2008.10.009.
- 13 Nielsen L.R. 2013. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Veterinary Microbiology*. 162(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.08.003.
- 14 Pecoraro H.L., Thompson B. & Duhamel G.E. 2017. Histopathology case definition of naturally acquired *Salmonella enterica* serovar Dublin infection in young Holstein cattle in the northeastern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29(6): 860-864. DOI: 10.1177/1040638717712757.
- 15 Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases associated with *Salmonella* species. In: Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H. & Grünberg W. (Eds). *Veterinary Medicine: a Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats, Pigs and Horses*. Philadelphia: W.B. Saunders, pp.896-920.
- 16 Rebhun W.C. 2000. Doenças infecciosas do trato intestinal: Salmonelose. In: *Doenças do Gado Leiteiro*. São Paulo: Roca, pp.205-210.
- 17 Santos B.L., Ladeira S.R.L., Riet-Correa F., Soares M.P., Marcolongo-Pereira C., Sallis E.S.V., Raffi M.B. & Schild A.L. 2019. Clostridial diseases diagnosed in cattle from the South of Rio Grande do Sul, Brazil. A forty-year survey (1978-2018) and a brief review of the literature. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 39(7): 435-446. DOI: 10.1590/1678-5150-pvb-6333.
- 18 Smith B.P. 2006. Salmonelose em ruminantes. *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3.ed. São Paulo: Editora Manole, pp.775-779.
- 19 Sousa M.V., Gonçalves R.C., Lisbôa J.A.N., Almeida C.T. & Chiacchio S.B. 2000. Aspectos clínicos e epidemiológicos da diarreia dos bezerros em Botucatu, SP. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 7(2): 74-77. DOI: 10.4322/rbcv.2015.183.
- 20 Vaessen M.A., Veling J., Frankena K., Graat E.A. & Klunder T. 1998. Risk factors for *Salmonella* Dublin infection on dairy farms. *Veterinary Quarterly*. 20(3): 97-99. DOI: 10.1080/01652176.1998.9694848.
- 21 Warnick L.D., Crofton L.M., Pelzer K.D. & Hawkins M.J. 2001. Risk factors for clinical salmonellosis in Virginia, USA cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 49(3/4): 259-275. DOI: 10.1016/s0167-5877(01)00172-6.