

Eduardo Coulaud da Costa Cruz Júnior

**DIAGNÓSTICO DE ENTEROPATÓGENOS EM LEITÕES DE ATÉ
SETE DIAS DE IDADE, NA REGIÃO DO TRIÂNGULO
MINEIRO/ALTO PARANAÍBA**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal, na Área de Concentração: Patologia Animal.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes

Co Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte - MG
Escola de Veterinária – UFMG
2010

Dissertação defendida e aprovada em 12/04/2010, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Prof. Dr. David Emílio S. N. Barcellos

Dr. Glauber Souza de Machado

A minha mãe e ao meu pai, por me amarem tanto mesmo nos momentos em que eu não correspondi a toda atenção e carinho que eles me ofereceram. À Marina, com todo carinho e amor incondicionais. À confiança, dos grandes amigos Glauber Machado e Alexandre César. A minha paixão pela suinocultura, já manifestada desde minha infância e consolidada durante minha graduação em medicina veterinária. E à Escola de Veterinária da UFMG, por abrir as portas às grandes oportunidades da vida!

“Se avexe não... Amanhã pode acontecer tudo, inclusive nada!”

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Vânia, pelo exemplo de força de vontade, apoio, incentivo e, sobretudo, pela paciência e compreensão nos momentos de ansiedade e impaciência. Ao meu pai, Eduardo, pela atenção e carinho incansáveis. Obrigado pela oportunidade de ter vocês dois como meus pais. Vocês são pessoas maravilhosas e sempre terei muito orgulho de vocês! À minha irmã, Fernanda, e ao seu marido, Fabiano, a quem estive muito ausente neste período de esforço. Mas, não tenham dúvida nunca do quanto eu os amo! Infelizmente, são nas pessoas que mais amamos que comumente descarregamos nossos problemas ou tensões.

À Marina pelo seu carinho, paciência e companheirismo dedicado em todos os momentos. E por sempre me ajudar na escolha das melhores decisões! Você é minha grande fonte de sempre acreditar que podemos fazer um pouco mais além: “Deixa comigo”. A toda a sua família, que se tornou parte da minha e hoje são peças imprescindíveis para mim.

Aos amigos Alexandre e Glauber, que em determinado momento me mostraram os melhores caminhos a serem trilhados! Mesmo quando eu ainda não estava suficientemente maduro para enxergar, eu acreditei em vocês e segui o caminho que me mostraram! Exemplos de competência, honestidade e de sempre acreditarem naquilo que parece quase impossível de ser solucionado, agradeço a confiança e aposta que têm feito em mim!

À Ana Luísa, por toda sua consideração que tem comigo!

Aos médicos veterinários da Integrall[®], Alexandre, Brunão, Glauber e Robert pela grande ajuda em contactar os produtores e intervir junto a eles para que conseguíssemos os leitões gratuitamente. Obrigado Brunão, por ter sido nosso GPS durante as coletas, sempre nos informando os mais minuciosos detalhes do caminho até as granjas.

Ao meu professor e orientador Roberto Guedes por toda dedicação e amizade. Muito obrigado por toda ajuda, pelas oportunidades concedidas e pelo incentivo incansável! Obrigado por me mostrar os melhores caminhos, mesmo quando, eu ainda não estava pronto para enxergá-los e aceitá-los. Hoje consigo enxergar toda a sua boa intenção e lhe sou muito grato por isso.

Ao Felipe, por ter se tornado mais que um companheiro e sim um grande amigo durante o mestrado. Pela sua disponibilidade e prazer em ajudar nas coletas, condução das pesquisas de clostrídios e nas tomadas de decisões. Muito obrigado por toda sua consideração.

À Isabela por toda ajuda oferecida durante as coletas. Ao Rodrigo, por ter colocado a minha disposição sua experiência em clostrídios e também por ter nos ajudado na condução de pesquisas laboratoriais.

Ao professor David Barcellos pelo exemplo profissional e pelas valiosas considerações e sugestões durante a correção da dissertação. Antes mesmo de eu saber sobre qual seria o meu projeto de mestrado, eu já tinha um grande sonho de tê-lo em minha Comissão Examinadora.

À professora Edel Stancioli por permitir que utilizássemos seu laboratório e equipamentos para parte de nossas análises. E também pelos ricos momentos de discussão e conhecimento. À Camila, pessoa sempre disposta a nos ajudar.

Às granjas e/ou suinocultores participantes da nossa pesquisa, por acreditarem em nosso propósito, aceitarem nossa entrada e, sobretudo, pela concessão gratuita dos leitões!

Ao professor Francisco Lobato, meu co-orientador, que teve participação única e decisiva. Quando a realização deste trabalho estava emperrada devido a região inicialmente proposta para sua realização, ele enxergou nossa dificuldade e nos apoiou na mudança da mesoregião a ser trabalhada.

Ao professor Marcos Heinemann por permitir a utilização do seu laboratório e à Fernanda por oferecer grande ajuda nas análises bioquímicas durante a pesquisa de *Escherichia coli*.

Ao professor Marcos Xavier, pela grande ajuda durante a avaliação estatística. Mas, sobretudo, pelos momentos de boa conversa e ensinamentos.

Aos funcionários do colegiado de Pós-graduação em Ciência Animal, do Xerox e da Biblioteca pela disponibilidade em nos ajudar.

Aos funcionários da Escola de Veterinária, em especial, aos da Esterilização por nos proporcionar as condições ideais para que possamos desenvolver nossas pesquisas.

Aos amigos conquistados durante a graduação e aos grandes mestres da Escola de Veterinária da UFMG. Aos colegas e amigos de mestrado Aline Viott, Fábio

Vannucci, Mirella, Núbia, Érica, Adriana, Custódio, Diego, Júneo, Marina, Jankerle, Raquel, Silvia, Juliana Saes, Saira, Eliana, Ana Patrícia, Tatiana, Mariana, Ana Flávia, professoras Rosilene, Rogéria e Natália, professores Renato e Ernane, Ana Luísa e Juliana Paniago, Eliana, Diego, Saira, Rose, Bruno e Paula.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1.0 INTRODUÇÃO.....	13
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	14
2.2 <i>Clostridium perfringens</i> tipo A e tipo C.....	15
2.3 <i>Clostridium difficile</i>	19
2.4 Rotavirus.....	21
2.5 <i>Isospora suis</i>	25
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Granjas e amostras coletadas.....	26
3.2 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	27
3.2.1 Isolamento.....	27
3.2.2 Provas Bioquímicas.....	27
3.2.3 Detecção de <i>E. coli</i> enterotoxigênica.....	28
3.3 Pesquisa de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A e tipo C.....	30
3.3.1 Isolamento.....	30
3.3.2 Tipificação de <i>C. perfringens</i>	31
3.4 Pesquisa de <i>Clostridium difficile</i>	32
3.5 Pesquisa de Rotavirus.....	33
3.6 Exame de flutuação para <i>Isospora suis</i>	33
3.7 Histopatologia.....	34
3.8 Análise estatística.....	34

4.0	RESULTADOS	34
4.1	<i>Escherichia coli</i>	34
4.2	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A e tipo C.....	36
4.3	<i>Clostridium difficile</i>	37
4.4	Rotavirus.....	39
4.5	<i>Isospora suis</i>	41
4.6	Coinfecção.....	41
5.0	DISCUSSÃO.....	41
5.1	<i>Escherichia coli</i>	41
5.2	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A e tipo C.....	42
5.3	<i>Clostridium difficile</i>	43
5.4	Rotavirus.....	44
5.5	<i>Isospora suis</i>	44
5.6	Coinfecção.....	44
6.0	CONCLUSÕES.....	45
7.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
	ANEXO.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos tipos de <i>Clostridium perfringens</i>	16
Tabela 2	Sequência de primers utilizados na amplificação dos genes para fatores de virulência de <i>Escherichia coli</i>	30
Tabela 3	Sequência de primers utilizados na amplificação dos genes codificadores de toxinas de <i>Clostridium perfringens</i>	32
Tabela 4	Frequência dos agentes pesquisados.....	35
Tabela 5	Quantificação de colônias de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.....	37

Tabela 6	Achados histopatológicos.....	38
-----------------	-------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Perfil dos segmentos do rotavirus no PAGE e estrutura do vírion.....	22
Figura 2	Sequência de eventos durante a infecção por rotavirus.....	24
Figura 3	Gel de poliacrilamida corado pela prata com perfil de bandas dos produtos da PCR multiplex para fatores de virulência de <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	34
Figura 4	Jejuno de leitão: vilosidades intestinais normais e com adesão de <i>E. coli</i> ETEC	35
Figura 5	Gel de agarose com perfil de bandas dos produtos da PCR multiplex para <i>C. perfringens</i>	36
Figura 6	Leitão: acentuado edema de mesocólon.....	38
Figura 7	Cólon de leitão: cólon normal e colite neutrofílica necrotizante, lesão causada por toxinas de <i>Clostridium difficile</i>	39
Figura 8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com segmentos genômicos do rotavirus.....	40
Figura 9	Jejuno de leitão: vilosidades normais e enterite neutrofílica necrotizante causada por rotavirus.....	40

RESUMO

Sessenta leitões com até sete dias de idade, sendo 30 diarreicos e 30 não diarreicos, provenientes de 15 granjas da mesoregião do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba foram selecionados, eutanasiados e necropsiados. Foram coletados segmentos de jejuno, íleo, ceco e cólon para histopatologia e conteúdo intestinal e fezes para pesquisas diagnósticas. Os enteropatógenos pesquisados foram *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Clostridium perfringens* tipo A e tipo C, *Clostridium difficile*, Rotavirus e *Isospora suis*. Para pesquisa de *E. coli* e *C. perfringens* foi feito isolamento e tipificação por meio da PCR multiplex. Para *C. difficile* utilizou-se Kit-ELISA comercial. Foi utilizado eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para pesquisa de rotavirus e exame parasitológico de flutuação para *I. suis*. Foi encontrada uma frequência de 23,3% de *C. difficile* entre os leitões diarreicos e de 10% entre os não diarreicos; 33,3% de *C. perfringens* tipo A β_2 entre os diarreicos e 53,3% entre os controle; 14,3% de Rotavirus entre os diarreicos e 0% para os controle; 10% de *E. coli* ETEC entre os diarreicos e 3,3% entre os não diarreicos; 3,8% de *I. suis* para o grupo controle e nenhuma detecção no grupo diarreico. Não houve nenhum diagnóstico de *C. perfringens* tipo C. Em relação à histopatologia, leitões diarreicos apresentaram frequência de 30% de enterites, variando de leve a acentuada, e 20% de tiflocolites. Leitões não diarreicos apresentaram 33,4% de enterite e 23,3% de tiflocolite, também em diferentes intensidades. Os agentes *Clostridium perfringens* tipo A β_2 e *C. difficile* foram os enteropatógenos mais frequentemente diagnosticados.

Palavras chaves: leitão, diarreia neonatal, *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridium difficile*

ABSTRACT

Sixty 1 to 7-day-old piglets, being 30 diarrheic and 30 non-diarrheic, from 15 different swine farms located at Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba were selected, euthanized and necropsied. Segments of jejunum, ileum, colon, cecum, intestinal content and feces were collected from these piglets for further testing. The following were the studied enteropathogens: *Escherichia coli* enterotoxigenic (ETEC), *Clostridium perfringens* type A and type C, *Clostridium difficile*, Rotavirus and *Isospora suis*. Isolation and typing, using Multiplex PCR, were used for *E. coli* and *C. perfringens* detection. A commercial ELISA kit was used for detecting *C. difficile*. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed for Rotavirus detection. The parasitological flotation test was utilized for *I. suis* search. Among diarrheic piglets, 23.3% were positive for *C. difficile*, 33% positive for *C. perfringens* type A β 2, 14.3% positive for Rotavirus and 10% for ETEC. Non-diarrheic piglets (controls) were 10% positive for *C. difficile*, 53.3% for *C. perfringens* type A β 2, 0% for Rotavirus, 3.3% for ETEC and 3.8% for *I. suis*. No *C. perfringens* type C was detected in any animal. Upon histology, 30% of diarrheic piglets had different intensities of enteritis and 20% colitis. Non-diarrheic animals had 33.4% enteritis and 23.3% colitis, also varying in severity. The agents *C. perfringens* type A and *C. difficile* were the most frequent diagnosed enteropathogens.

Key words: piglet, neonatal diarrhea, *Clostridium perfringens* type A, *Clostridium difficile*

1.0 INTRODUÇÃO

A suinocultura tornou-se, na última década, a principal fonte de renda de muitos produtores rurais. O estado de Minas Gerais é o quarto maior produtor nacional de carne suína. O crescimento da produção de suínos no estado vem sendo acompanhado detalhadamente através de uma parceria entre o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), a Associação de Suinocultores do Estado de Minas Gerais (ASEMG) e a Escola de Veterinária da UFMG (Garcia et al, 2005abc). Esta parceria tem permitido a execução de estudos epidemiológicos baseados em dados reais. No ano de 2008, foram cadastradas 1.464 granjas que comercializam suínos, situadas em 374 municípios mineiros, somando 224.661 matrizes (Anexo 1). Nesse contexto, a mesoregião do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba ocupa o primeiro lugar em quantidade de granjas suinícolas do estado e seu rebanho efetivo, cadastrado junto ao IMA, corresponde a cerca de oitenta mil matrizes. Por sua expressiva participação nesse segmento do agronegócio e pelo grande interesse dos produtores e veterinários atuantes na mesma em participar do nosso estudo, esta mesoregião foi escolhida como alvo deste trabalho. Devido à importante participação do estado na produção suinícola nacional, o conhecimento da situação sanitária e dos patógenos presentes em nossos rebanhos é essencial.

Dentre as enfermidades que afetam granjas de suínos no estado, as entéricas são as que mais frequentemente acometem leitões na primeira semana de vida. Este quadro clínico é responsável por significativas perdas econômicas devido, principalmente, à redução do

peso ao desmame, elevação dos custos de produção pela necessidade de novas intervenções terapêuticas e aumento na taxa de mortalidade nesta primeira fase da vida dos leitões. Assim, uma maior quantidade de informações acerca da detecção e identificação dos patógenos envolvidos em processos infecciosos, regionalmente, permitem a adoção de medidas de controle mais eficientes.

Os patógenos entéricos mais comumente associados às diarreias em leitões com um a sete dias de idade são *Escherichia coli* patotipo enterotoxigênica (ETEC), *Clostridium perfringens* tipo A e tipo C, *Clostridium difficile*, Rotavírus e *Isospora suis* (Yaeger et al, 2002). Entretanto, a frequência e importância de cada um deles vêm mudando ao longo dos anos e alguns agentes, como *C. difficile*, vem se tornando mais relevantes (Yaeger, 2007).

É importante salientar que existem ainda dúvidas sobre a real importância de *C. perfringens* tipo A como patógeno primário em leitões jovens. Por isto, a inclusão de animais sadios para avaliação da presença de possíveis agentes patogênicos se torna relevante. No Brasil, as informações sobre a identificação e prevalência de agentes enteropatogênicos nesta faixa etária são quase inexistentes. Até o presente momento, há somente um único trabalho (Lippke, 2008), realizado no sul do Brasil, que trata da identificação de enteropatógenos em leitões com até uma semana de vida. Possíveis justificativas para a falta de informações sobre a frequência destes agentes, causadores de problemas entéricos em rebanhos brasileiros e, mais especificamente, mineiros, seria a carência de pesquisas específicas nesta área. A concentração dos testes diagnósticos de rotina na área

de suíno em laboratórios privados que muitas vezes não possuem condições de realização de pesquisa de todos os agentes patogênicos possíveis causadores de diarreia e o não interesse primário destes laboratórios em compilar e divulgar estes resultados também justificam, em parte, a carência destes dados. Por fim, tem-se a falta de padronização na coleta de amostras que muitas vezes não são representativas em relação a prevalência do problema no rebanho (Wieler et al, 2001). Além disso, muitos trabalhos de pesquisa concentram-se em um único agente etiológico. Assim sendo, estudos mais abrangentes sobre a frequência dos referidos agentes etiológicos são imperativos para o contínuo sucesso e crescimento da suinocultura mineira. Dessa forma, este trabalho pretende pesquisar os agentes enteropatogênicos mais frequentes em leitões diarreicos com até uma semana de vida, na mesoregião Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Minas Gerais.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Escherichia coli* enterotoxigênica

E. coli é uma bactéria anaeróbia facultativa com morfologia bastonete, Gram negativa, fermentadora de lactose e que cresce facilmente em meios de cultura como ágar MacConkey, formando grandes colônias vermelhas (Gyles e Fairbrother, 2004). Sob avaliação bioquímica, ela apresenta reação positiva para o indol, negativa para a produção de urease e sulfeto de hidrogênio e não utilização do citrato como fonte de carbono. Essas provas permitem sua distinção entre as *Enterobacteriaceas*. Sendo o microorganismo mais presente em amostras de fezes e integrante da microbiota saprófita intestinal, é muito importante que seja feita a distinção

entre cepas patogênicas e não patogênicas (DebRoy e Maddox, 2001).

A colibacilose neonatal constitui uma patologia intestinal caracterizada por diarreia grave. Ela é causada por toxinas produzidas por cepas enterotoxigênicas de *E. coli* (ETEC) (Harvey et al, 2005). Essas enterotoxinas são produzidas na mucosa intestinal, após a adesão da bactéria aos enterócitos (Zlotowski et al, 2008). A adesão bacteriana à superfície mucosa do hospedeiro é propiciada por estruturas protéicas denominadas fímbrias, sendo este o primeiro passo durante a patogênese (Fang et al, 2008). As fímbrias mais importantes são K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6) e F41 (Penatti et al, 2005). Contudo, a patogenia é desencadeada pela ação de toxinas termo estáveis STa (STI), STb (STII), toxina termolábil (LT) e a toxina EAST 1 (Sobestiansky e Barcellos, 2007). A doença acomete leitões logo após o nascimento e culmina com uma diarreia aquosa e amarelada que leva o leitão à desidratação. Assim, esta enfermidade determina alta taxa de mortalidade, geralmente, 4 a 24 horas após os primeiros sinais clínicos.

A toxina STa divide-se ainda em STh, composta por 19 aminoácidos e oriunda de cepas isoladas de humanos, e STp composta por 18 aminoácidos e inicialmente detectada em suínos. Essa toxina se liga a receptores transmembrana guanilato ciclase resultando em aumento de GMP cíclico, que por sua vez ativa as enzimas quinases intracelulares, culminando na secreção de íons cloro e água, além de

inibir a absorção de cloreto de sódio (Dubreuil, 2008).

A enterotoxina STb é mais associada com isolados de suínos, apesar de também ter sido encontrada em humanos. Ela é internalizada e uma vez dentro do enterócito, desencadeia influxo de íons cálcio que acarreta na formação de prostaglandina E₂, a qual regula o transporte de água e eletrólitos para fora das células (Kaper et al, 2004).

A toxina termolábil (LT) é composta por LT I, presente em cepas de *E. coli* patogênicas para humanos e animais e LT II, encontrada primariamente em isolados de animais. Após se ligar a receptores de membrana, a toxina é endocitada e seu alvo é a adenilato ciclase presente em membranas basolaterais. Ao estimular a adenilato ciclase, ocorre um aumento nos níveis de AMP cíclico que leva à ativação da proteína quinase e consequente fosforilação de canais de íons cloro presentes em membranas. Seu efeito final é a secreção de cloro nas células das criptas e inibição da absorção de cloreto de sódio (Nataro e Kaper, 1998). LT II, por sua vez, provoca elevação nos níveis de AMP cíclico intracelular por mecanismos semelhantes aos já citados.

O diagnóstico da colibacilose neonatal é baseado na avaliação clínica e epidemiológica, isolamento do agente e tipificação do mesmo para detecção de fatores de virulência. Não são vistas lesões macroscópicas, entretanto um achado sugestivo é o intestino dilatado e flácido contendo grande quantidade de líquido claro. À microscopia, o que

chama atenção é a presença do agente em íntimo contato com a superfície mucosa dos enterócitos. Sendo um microorganismo comum à microbiota entérica normal, somente o isolamento de *E. coli*, a partir de amostras de fezes ou conteúdo intestinal não é suficiente para o diagnóstico da colibacilose (Costa et al, 2006).

Dentre as medidas adotadas para o controle desta enfermidade incluem a desinfecção das salas de maternidade, vazio sanitário das mesmas, antibioticoterapia e imunoprofilaxia das fêmeas gestantes visando a imunidade passiva da leitegada (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

2.2 *Clostridium perfringens* tipo A e tipo C

O gênero *Clostridium* abrange diversas espécies de microorganismos saprófitas e patógenos entéricos de humanos, animais domésticos e selvagens (Songer, 1996; Schwartz, 2009). Eles são caracterizados por serem organismos Gram positivos, bastonetes, anaeróbios e formadores de esporos (Songer, 2009).

C. perfringens é uma das bactérias mais amplamente distribuídas no ambiente e é certamente a principal causa de doença entérica por clostrídios (Songer, 1996). Ele é classificado em 5 tipos diferentes (Tabela 1), de acordo com a produção de 4 importantes toxinas (Fernandez-Miyakawa et al, 2007). Em suínos, os principais tipos encontrados são A e C (Wasinski, 2007).

Tabela 1 – Classificação dos tipos de *C. perfringens* de acordo com as toxinas

Tipos de <i>C. perfringens</i>	Toxinas produzidas	Animais mais acometidos
<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	α , enterotoxina	Leitões neonatos, bezerros neonatos.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo B	α , β , ϵ , enterotoxina	Ovinos, bovinos, equinos.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo C	α , β , enterotoxina	Leitões neonatos, aves, bezerros, ovinos, caprinos.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo D	α , ϵ , enterotoxina	Ovino, caprino, bovino.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo E	α , ι , enterotoxina	Bezerros neonatos.

Fonte: Adaptado de (Songer, 2009).

O tipo A é o mais comumente encontrado no trato gastrointestinal de animais e no meio ambiente. Em avaliações *post mortem* deve ser interpretado com cautela, uma vez que se prolifera muito rapidamente (Songer, 1996).

C. perfringens tipo A constitui importante causa de patologia entérica em cordeiros, conhecida como doença dos cordeiros amarelos. Em bezerros, é relatada a ocorrência de timpanismo, abomasite com hemorragia e úlceras associadas à presença dos bacilos na mucosa e submucosa (Songer, 1996). Em equinos, a infecção apresenta-se como um quadro de diarreia aquosa profusa. Entretanto, este microorganismo parece assumir importância diferenciada em leitões neonatos.

As alterações clínicas observadas em quadros de patologia entérica por *C. perfringens* tipo A devem-se a ação de duas toxinas principais, alfa e enterotoxina (Songer, 2004). A toxina alfa é uma fosfolipase protéica produzida em várias quantidades por quase todos os isolados desta espécie. Sua ação relaciona-se com a hidrólise de

fosfolípidos de membrana que culmina em lise celular e potencial ação necrótica (Songer, 1997; Costa et al, 2004). Alguns estudos sugerem que pequenas variações na sequência de aminoácidos desta toxina permitem-na resistir à ação das proteases intestinais (Songer, 1996).

A enterotoxina é um polipeptídeo composto por 319 aminoácidos e produzida por cerca de 2 a 5% dos isolados de *C. perfringens*, sendo a maioria deles do tipo A (McClane, 2001). Sua liberação ocorre no momento da esporulação e é relacionada com a formação de poros em membranas plasmáticas, inibição de síntese de macromoléculas, desintegração do citoesqueleto celular e lise celular. A ação da enterotoxina relaciona-se com a capacidade de interagir com as proteínas ocludinas e claudinas presentes nas *tigh junctions* comprometendo sua estrutura (McClane, 2001). Dessa forma, a ação de ambas toxinas, alfa e enterotoxina, culmina com alteração da permeabilidade intestinal que acarreta em acúmulo de líquidos na luz intestinal, diarreia, desidratação e até mortes súbitas (Costa et al, 2004). Contudo, a enterotoxina parece assumir papel mais

relevante em humanos (Songer e Uzal, 2005).

Apesar de ainda permanecerem muitas dúvidas acerca da patogênese da infecção por *C. perfringens* tipo A, tem sido associado a ocorrência de diarreia em leitões com a presença de cepas tipo A produtoras de toxina β_2 . Esta toxina foi inicialmente descoberta em leitões que vieram a óbito e que apresentavam quadros de enterocolite em que foi diagnosticado *C. perfringens* tipo C. Além disso, foi observado que leitões que apresentavam quadros de enterite eram positivos para a presença do gene *cpb2*, que codifica a toxina β_2 , enquanto aqueles que não apresentavam enterite eram negativos para a presença deste gene (Bueschel et al, 2003). Estabelecida esta relação epidemiológica, rapidamente foram diagnosticadas cepas de *C. perfringens* tipo A que também produziam esta toxina (Gibert, 1997). O gene *cpb2* já foi encontrado em todos os 5 tipos de *C. perfringens*, entretanto, sua prevalência é bem maior em cepas associadas a enterites em leitões quando comparado a outras espécies animais (Bueschel et al, 2003; Wasinski, 2007). Klaasen et al (1999), pesquisando a associação da toxina β_2 com leitões lactentes diarreicos encontraram valores entre 70 e 90% de presença do gene *cpb2*, na Suíça e Holanda, respectivamente. Ele também é muito mais prevalente em *C. perfringens* tipo A que no tipo C (Bueschel et al, 2003).

Os sinais clínicos da enterite por *C. perfringens* tipo A incluem diarreia pastosa a mucosa, apatia, sinais de desidratação, anorexia e baixa taxa de crescimento e mortalidade (Songer e Uzal, 2005). À necropsia, pode ser encontrada hiperemia discreta a moderada da mucosa intestinal e

dilatação de alças devido à produção aumentada de gases e excesso de conteúdo líquido (Costa et al, 2004). As lesões afetam primariamente o jejuno e o íleo, e, à histopatologia, pode ser vista uma enterocolite necrotizante discreta a moderada, com edema de vilosidades e com mínimos danos ao epitélio e aos vasos sanguíneos (Songer e Glock, 1998). Em geral, as lesões não são muito graves, sejam elas macro ou microscópicas, e isso pode sugerir que a diarreia que acompanha estes quadros seja do tipo secretória (Yaeger, 2007). Contudo, trata-se de uma patologia entérica de elevada morbidade e baixa mortalidade (Collins et al, 1989).

Como já mencionado, por se tratar de um microorganismo autóctone intestinal de leitões, o diagnóstico de diarreia causada por *C. perfringens* tipo A tem constituído um desafio aos patologistas (Collins et al, 1989; Songer e Glock, 1998). Todavia, o diagnóstico tem se baseado no isolamento, avaliação quantitativa da bactéria a partir do conteúdo intestinal, seguido de tipificação e observação do gene da toxina beta 2. Além disso, inclui-se a avaliação histológica para a possível presença de lesões e, ainda mais importante, a ausência de diagnóstico de outros agentes. A presença da toxina no conteúdo intestinal não é um parâmetro confiável, uma vez que a mesma é muito lábil, sendo rapidamente degradada por outras bactérias ou enzimas intestinais (Sanz et al, 2007).

Em relação à prevenção e ao tratamento, uma alternativa seria a utilização de vacina nas fêmeas gestantes, objetivando uma boa proteção dos neonatos via imunidade passiva. Mas, a inexistência destas vacinas tem aumentado a necessidade dos produtores recorrerem à

antibioticoterapia parenteral nas leitegadas acometidas (Songer, 2009).

A infecção por *C. perfringens* tipo C, conhecida também como enterotoxemia, constitui uma enfermidade caracterizada por enterite necrótica e que cursa com diarreia hemorrágica, geralmente letal, em leitões entre 12 horas de vida a 3 dias de idade (Songer e Glock, 1998). Outros animais neonatos como bezerros, cordeiros e caprinos também podem ser acometidos por esta patologia, entretanto, leitões parecem ser particularmente mais predispostos (Tweten, 2001). A principal exotoxina produzida por *C. perfringens* tipo C é a toxina β , apesar de algumas cepas também produzirem a enterotoxina e a toxina β_2 , já discutidas (Czanderlova et al, 2006; Sayeed et al, 2008). Todavia, a produção desta última não é tão frequente no tipo C como no tipo A. Ainda não é bem conhecido o modo de ação da toxina β , contudo Miclard et al (2009) demonstraram sua ligação com células endoteliais, pouco tempo antes de serem encontradas lesões necrohemorrágicas típicas deste quadro. Além disso, Shatursky et al (2000) verificaram a ocorrência de efeito citotóxico da toxina por meio da formação de poros em membranas celulares.

Explicações para que a infecção por *C. perfringens* tipo C ocorra tão precocemente em leitões, relacionam-se com a deficiência da enzima pancreática proteolítica tripsina neste período, uma vez que a toxina β produzida por *C. perfringens* tipo C é protease sensível. A presença de fatores inibidores de proteases presentes no colostro e a ausência de microbiota bem estabelecida no intestino do neonato também são

justificativas da precocidade desta infecção (Tweten, 2001).

Ao contrário do tipo A, o tipo C é encontrado raramente e em pequenas quantidades no intestino de animais saudáveis. Ele pode ser considerado um patógeno primário ou também ocorrer secundário a outras infecções (Springer e Selbitz, 1999). Assim como no tipo A, a infecção ocorre por meio dos esporos presentes no ambiente e que são extremamente resistentes aos desinfetantes, ao calor e à luz ultravioleta (Songer e Uzal, 2005). Além do ambiente, outra importante fonte de transmissão para os leitões a ser considerada são as fezes das porcas.

Os sinais clínicos são comumente agudos ou hiperagudos e incluem desidratação, depressão e diarreia hemorrágica. À necropsia, as lesões comumente estão restritas ao intestino delgado e podem ser vistos variados graus de hiperemia do mesentério, enterite fibrinonecrotica ou pseudomembranosa e conteúdo intestinal sanguinolento (Songer, 2009). Microscopicamente, as lesões vistas são necrose profunda da mucosa do intestino delgado, e, em raros casos, podendo se estender ao ceco e porções do cólon com hemorragia na lâmina própria, submucosa e camadas musculares (Miclard et al, 2009). Além disso, também é comum encontrar trombos, bacilos e/ou esporos e intenso infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e fibrina.

O diagnóstico se baseia nos sinais clínicos encontrados, nas lesões vistas à necropsia e à histopatologia. Acrescenta-se ainda, cultura bacteriológica do conteúdo intestinal com isolamento de

grandes quantidades de *C. perfringens* seguidos de genotipagem e/ou detecção da toxina β a partir do mesmo material coletado (Songer e Uzal, 2005).

Em relação ao controle, a imunoprophilaxia das porcas gestantes com o toxóide demonstrou significativa eficácia em um estudo realizado por Springer e Selbitz (1999), associado com a administração de penicilina parenteral.

2.3 *Clostridium difficile*

C. difficile é um microorganismo ubíquo, sendo comumente encontrado no solo, água e trato intestinal de vários mamíferos, aves e répteis (Songer et al, 2000). A transmissão se dá por meio de esporos ingeridos e adquiridos em ambientes contaminados. Os esporos de *C. difficile* no intestino do hospedeiro não germinam em condições normais, o que o torna um microorganismo oportunista (Kiss e Bilkei, 2005).

Seu primeiro isolamento foi em 1935, a partir de fezes e mecônio de crianças recém-nascidas e assintomáticas. Naquele momento, ele foi nomeado *Bacillus difficilis* devido a sua morfologia e dificuldade de cultivo (Hall e O'Toole, 1935 citado por Keel e Songer, 2006).

Já em suínos, a primeira confirmação de infecção por *C. difficile* foi feita por Lysons, em 1980 (Nagy e Bilkei, 2003). Contudo, o primeiro isolamento do agente foi realizado em 1983, quando foi também especulada alguma relação com a utilização de antimicrobianos e/ou promotores de crescimento (Jones e Hunter, 1983).

C. difficile é relatado como um dos mais importantes agentes etiológicos de diarreias neonatais em leitões (Yaeger,

2007). Há cepas de *C. difficile* possuidoras de flagelo, fímbrias e enzimas hidrolíticas. Nestes agentes, tais características podem estar associadas ao desenvolvimento da patologia. Contudo, as funções das fímbrias e do flagelo na colonização intestinal não são ainda bem conhecidas. Já no caso das enzimas hidrolíticas, são conhecidas as hialuronidases, condroitina-4-sulfatases e uma fraca atividade de heparinases para a maioria das cepas de *C. difficile* (Borriello, 1998). Há também uma discreta atividade de collagenases, mas geralmente restrita às cepas altamente virulentas. Por outro lado, os fatores de virulência mais relevantes são as exotoxinas A e B. Elas possuem efeito citotóxico para vários tipos celulares do hospedeiro. Determinam ainda, aumento da permeabilidade vascular e indução à produção de mediadores inflamatórios, dentre os quais destacam-se o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas (Yaeger et al, 2007).

A toxina A é uma potente enterotoxina cuja massa molecular é 308 kDa, enquanto que a B é uma potente citotoxina com massa molecular de 270 kDa (Poxton et al, 2001). Elas são estruturalmente semelhantes e atuam sinergicamente, sendo que a toxina A se destaca por causar lesão inicial à mucosa intestinal. Assim, após perder sua completa integridade, os enterócitos se tornam susceptíveis à ação da toxina B (Keel e Songer, 2006). Os mecanismos pelos quais cada exotoxina atua ainda não estão bem elucidados, todavia, os estudos até o presente momento mostram que a enterotoxina atua sobre o citoesqueleto celular, desestruturando-o (Moore et al, 1990). Consequentemente, haveria comprometimento da integridade das zonas de oclusão intercelulares (*tight junctions*) evidenciada por

desprendimento de células epiteliais. A perda destas barreiras associado ao aumento de mediadores inflamatórios locais acentuam a permeabilidade da mucosa colônica, culminando em diarreia aquosa (Poxton et al, 2001). Moore et al (1990) relatam ainda que a exposição da mucosa intestinal à exotoxina A induz efeito secretório de ânions cloro. Entretanto, seu trabalho não foi capaz de determinar se era um efeito direto ou indireto.

As células susceptíveis do epitélio intestinal parecem apresentar, na porção da borda em escova (microvilosidades), receptores para a exotoxina A. Ao contrário da toxina A, ainda não são conhecidos os receptores da exotoxina B e a idéia mais aceita é de que se situem na membrana basal do epitélio intestinal. Isso justificaria a necessidade da toxina A causar lesão prévia à mucosa intestinal, para que houvesse atuação da toxina B (Salyers e Whitt, 1994). Cabe ainda à primeira, ser responsável por intenso processo inflamatório que pode acometer a mucosa e a submucosa intestinal. Isso ocorre em função da injúria aos enterócitos que, como resposta ao dano sofrido, produzem interleucina-8 (IL-8) (Mahida et al, 1996). Essa citocina constitui um agente quimiotático importante, atraindo neutrófilos ao sítio da lesão. Com a chegada de tais leucócitos, agrava-se o processo face à ação necrotizante das enzimas lisossômicas neutrofílicas.

Em suínos, a doença associada ao *C. difficile* acomete comumente leitões de um a sete dias de idade, nascidos de primíparas ou porcas múltiparas. A doença pode determinar desde perda de produtividade, isto é, leitegada com baixo peso ao desmame, à morte de leitões. Os achados de necropsia incluem

edema de mesocólon e conteúdo do cólon pastoso a aquoso amarelado (Songer e Uzal, 2005). À microscopia, é visto infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico na lâmina própria, diminuição de células caliciformes com aumento da taxa mitótica das criptas e múltiplas erosões sobre o epitélio da mucosa do cólon (Yaeger et al, 2007). Estas últimas são comumente chamadas de erosões em vulcão, decorrente à forma que assumem.

Um importante fator predisponente para que a enfermidade acometa leitões neonatos é o fato destes animais ainda não possuírem uma microbiota intestinal bem desenvolvida (Yaeger et al, 2002). Sob condições normais, os leitões nascem com seu trato alimentar ausente de qualquer microorganismo. A partir de 5 a 6 dias de idade já é possível ser vista uma população de microorganismos intestinais normais bem estabelecida. De qualquer forma, desde o momento do nascimento, os leitões são expostos aos microorganismos patogênicos advindos da própria gaiola de maternidade ou das fezes da porca. A utilização precoce de antimicrobianos também constitui importante fator predisponente, uma vez que pode causar desequilíbrios na microbiota intestinal (Songer et al, 2000).

O diagnóstico presuntivo da doença deve ser baseado no histórico, observação dos sinais clínicos e nas lesões macroscópicas e histopatológicas (Anderson e Songer, 2008). Já o diagnóstico definitivo é laboratorial e baseia-se na identificação das toxinas A e B e no isolamento da cepa toxigênica de *C. difficile* (Jung et al, 2003). Na identificação das toxinas, a ferramenta mais utilizada é o teste de imunoensaio enzimático (ELISA), realizado em um

filtrado de fezes ou conteúdo intestinal. As toxinas de *C. difficile* são lábeis, sendo susceptíveis à desnaturação caso não sejam mantidas sob refrigeração desde a coleta do material até a chegada ao laboratório (Yaeger et al, 2002). Por outro lado, o material não deve ser congelado, pois isso degradaria a toxina, culminando com resultado falso-negativo (Post et al, 2002). O outro recurso empregado para detecção das exotoxinas é a cultura celular (Keel e Songer, 2006). Neste método, inocula-se o sobrenadante fecal previamente diluído, filtrado e centrifugado em uma cultura celular. Após 24 a 48 horas, observa-se a presença ou ausência de efeito citotóxico. Tal metodologia é mais sensível e específica que o ELISA, no entanto, este último requer apenas cerca de 20 minutos para ser concluído. O isolamento do agente é feito a partir da semeadura de amostras fecais em placas contendo ágar específico, cicloserina-cefoxitina-frutose ou BHI, seguido de incubação por 24 a 48 horas em ambiente de anaerobiose a 37° C (Weese et al, 2000).

A associação da histopatologia com a presença das toxinas do *C. difficile* foi avaliada por Yaeger et al (2007) que encontraram valores preditivos positivos entre 63% e 76%, demonstrando a importância da associação destas duas técnicas para o diagnóstico definitivo.

O emprego de técnicas moleculares como a utilização do teste da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido cada vez mais explorado. A utilização da PCR com *primers* específicos para as toxinas A e B pode ser utilizada para identificar bactérias portadoras de cópias desses genes, todavia não pode ser utilizada para determinar se os genes estão codificando as toxinas (Post et al.,

2002). Seu uso tem sido empregado principalmente na condução de experimentos científicos que exijam a distinção entre diferentes cepas do microorganismo.

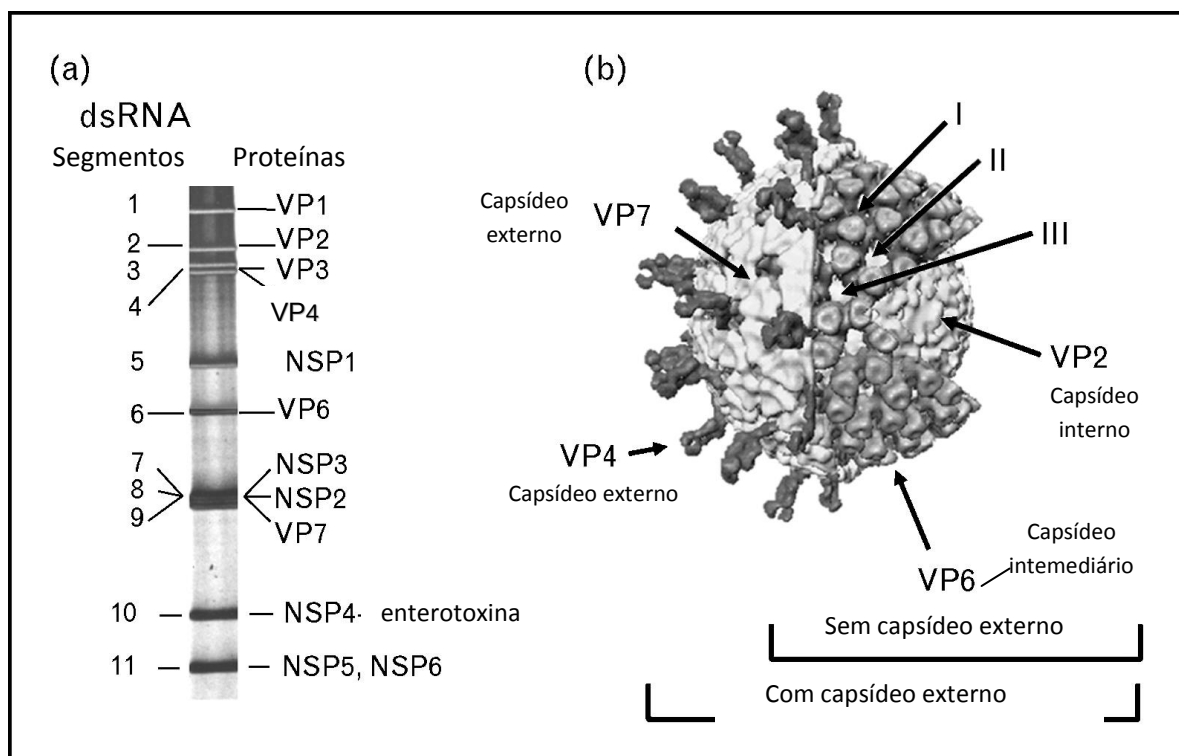
2.4 Rotavirus

O Rotavirus constitui importante causa de doença entérica com diarreia em neonatos de diferentes espécies domésticas de aves, mamíferos e também humanos. Em adultos, a infecção é comumente assintomática e sua importância se relaciona com o potencial de eliminação de partículas virais no ambiente para animais susceptíveis (Alfieri et al, 2007). Os Rotavirus são em sua maioria microorganismos espécie específicos, apesar de existirem relatos de infecções por espécies heterólogas (Martella et al, 2001; Greenberg e Estes, 2009; Martella et al, 2009). Foram descritos pela primeira vez em camundongos jovens, quando foram vistas estruturas esféricas no citoplasma de enterócitos, sob microscopia eletrônica, associado ao histórico de diarreia (Adams e Kraft, 1963). Em humanos, sua primeira identificação ocorreu em 1973, quando foram encontradas partículas virais no citoplasma de enterócitos de crianças que apresentavam quadro agudo de diarreia (Lundgren e Svensson, 2001). Em suínos, o Rotavirus foi inicialmente visto, também sob microscopia eletrônica de enterócitos, em leitões diarreicos com 27 dias de idade (Saif et al, 1980).

Os Rotavirus pertencem à família *Reoviridae*, caracterizada por possuir vírus RNA de fita dupla e com genoma segmentado. Inserido nesse grupo, o Rotavirus é o único que possui 11 segmentos (Figura 1). Além disso, medindo cerca de 85 nm de diâmetro, ele

apresenta como características morfológicas a ausência de envelope, a presença de capsídeo formado por três camadas protéicas, simetria icosaédrica e RNA de fita dupla. Seu RNA é fragmentado em 11 segmentos e cada um deles codifica uma proteína, com exceção do segmento 11 que codifica duas proteínas (Greenberg e Estes, 2009). Ao todo, são 6 proteínas estruturais (VP1 a VP6) e 6 proteínas não estruturais (NSP1 a NSP6). Seu

capsídeo externo é formado pelas proteínas estruturais VP7 e VP4, o intermediário pela VP6 e o interno pela VP2. Além disso, a proteína VP4 quando exposta à ação de proteases intestinais é fragmentada em duas outras proteínas VP5 e VP8, que desempenham papel importante no processo de infecção da célula hospedeira (Li et al, 2009). No núcleo, localizam-se as proteínas VP1 com função de RNA polimerase e a VP3 guanilil e metiltransferases.



Fonte: Adaptado de Hyser e Estes, 2008.

Figura 1. a) Perfil dos segmentos genômicos (dsRNA) vistos à eletroforese em gel de poliacrilamida (esquerda) e as respectivas proteínas estruturais (VP) e não estruturais (NSP), codificadas por cada segmento; b) estrutura do vírion.

Os Rotavírus são classificados em sete grupos diferentes (A–G) baseados nas diferenças antigênicas da proteína VP6 do capsídeo interno. Os grupos A–C têm sido encontrados em humanos e animais, enquanto os grupos D–G foram encontrados apenas em animais (Martella et al, 2007). O grupo A é o

mais frequentemente diagnosticado e possui uma classificação binária em sorotipos e/ou genótipos baseado nas proteínas do capsídeo externo, VP4 (P tipos) e VP7 (G tipos) (Lundgren e Svensson, 2001; Maes et al, 2009). Segundo Martella et al (2001), os principais G tipos encontrados são os

G3, G4, G5 e G11 em suínos, G1, G2 e G9 em humanos e G6, G8 e G10 em bovinos. Entre os P tipos, os mais frequentes são P2(6) e P9(7) em suínos. Diferentemente da classificação em G tipos, a P tipos não possui correlação da avaliação sorológica com a genômica. Assim, ao se referir a um P tipo devem ser especificadas ambas caracterizações (Martella et al, 2001). Mais recentemente, tem sido utilizada essa mesma classificação em G e P tipos para Rotavirus de outros grupos, além do grupo A (Collins, et al, 2008). Atualmente, são conhecidos 28 diferentes tipos de P (VP4) e 19 tipos diferentes de G (VP7) (Greenberg e Estes, 2009).

Os Rotavirus são bastante resistentes em condições ambientais, mantendo-se estáveis na faixa de pH 3 a 9. Ramos et al (2000) verificaram que ainda havia infectividade de partículas virais presentes em fezes após 32 meses sob refrigeração a 10° C. Além disso, o fato de não possuírem lipídios (não serem envelopados) os tornam resistentes aos solventes orgânicos como éter, clorofórmio e detergentes. Entretanto, a formalina, o cloro, a betapropiolactona e o etanol a 95% são considerados desinfetantes eficientes, uma vez que causam danos ao capsídeo externo (Alfieri et al, 2007).

O desenvolvimento de vacinas tem sido extensivamente pesquisado. Contudo, a grande diversidade sorotípica e/ ou genotípica (28 P tipos e 19 G tipos) permite um grande número de combinações, o que torna um grande desafio a aquisição de imunidade protetora (Greenberg e Estes, 2009). A primeira vacina comercial para utilização em humanos foi licenciada apenas em 1998, RotaShield® (Zaman, 2008).

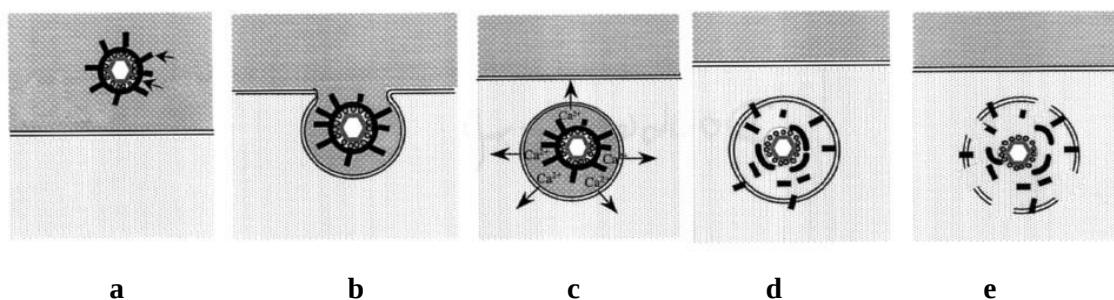
Entretanto, no ano seguinte ela foi retirada do mercado sob forte suspeita de causar intussuscepção nos pacientes em que havia sido utilizada (Zaman, 2008; Schaetti, 2009). Em 2006, foram licenciadas duas novas vacinas para humanos, Rotateq® nos Estados Unidos e Rotarix® na Europa. Estas vacinas ainda estão sendo avaliadas, mas resultados preliminares têm sido promissores (Hyser e Estes, 2008). Em relação à medicina veterinária, até o momento existe apenas uma vacina disponível comercialmente preventiva contra Rotavirus grupo A. Entretanto, trabalhos que avaliem sua eficácia são escassos. Dessa forma, torna-se imprescindível a ingestão de colostro por parte dos neonatos, uma vez que imunoglobulinas neutralizantes constituem a medida mais eficiente de evitar a ocorrência desta enfermidade. Estes anticorpos são principalmente produzidos contra a proteína VP4 e, mais especificamente contra a sua porção VP8 (El-Attar et al, 2009). A IgA representa a imunoglobulina mais abundante nas superfícies mucosas dos mamíferos, podendo ser adquiridas via colostro, leite e produzidas por plasmócitos da lâmina própria, no caso dos intestinos. Seu alto poder de neutralização de partículas virais constitui possivelmente a principal proteção do enterócito à infecção pelo Rotavirus (Macpherson et al, 2001). Além disso, os neonatos ainda contam com uma importante resposta inata, principalmente em relação à produção de interferon do tipo I (Hulst et al, 2008; Sherry, 2009).

A enteropatogenicidade do agente em suínos é caracterizada pela sua habilidade em produzir uma gastroenterite severa, com atrofia das vilosidades (Paul e Stevenson, 1999). A infecção por Rotavirus acomete mais frequentemente

leitões entre 15 e 30 dias (Roehe et al, 1989). O vírus tem tropismo por enterócitos maduros da porção média e alta das vilosidades do intestino delgado, predominantemente no final do jejuno e no íleo de animais jovens. Uma possível justificativa para esta predileção etária é a lenta reposição de enterócitos nos animais jovens em relação aos adultos, o que facilita a ocorrência do ciclo completo de replicação e produção de nova progênie viral (Barbosa et al, 1998). Por outro lado, em animais adultos há uma maior competição entre a taxa de replicação viral e a reposição celular.

A transmissão dos Rotavirus ocorre por via fecal oral, por meio de partículas

virais presentes no ambiente, na água, alimentos e superfícies contaminadas. Uma vez ingeridos, tais vírions alcançam a luz intestinal e penetram nos enterócitos maduros presentes no ápice e porção média das vilosidades intestinais. Ao que tudo indica, parece haver receptores específicos apenas neste tipo celular, mas isso ainda é pouco conhecido. Apenas as partículas virais com o capsídeo triplo, especialmente com as proteínas VP4 e VP7 do capsídeo externo, são capazes de infectarem enterócitos (Alfieri et al, 2007). Acredita-se que ocorra interação dessas proteínas com receptores nas membranas celulares dos enterócitos, seguida de endocitose das partículas virais, conforme a figura 2.



Fonte: Adaptado de Ruiz et al, 2000.

Figura 2. Sequência de eventos durante a infecção do enterócito pelo rotavírus:

a) interação da partícula viral com receptores na membrana celular; **b)** internalização viral por endocitose com formação de uma vesícula; **c)** efluxo de íons cálcio do interior da vesícula; **d & e)** a saída de Ca^{+2} leva a uma acidificação da vesícula que determina permeabilização desta e desintegração do capsídeo externo (VP5, VP7 e VP8), com liberação dos segmentos genômicos dos vírions com duplo capsídeo (VP6 e VP2).

Uma vez no citosol, ocorre a ativação da transcriptase viral com início à transcrição dos segmentos genômicos. Todo o ciclo replicativo do Rotavirus ocorre no citoplasma da célula hospedeira e é modulado pela enzima viral RNA polimerase (VP1) que é dependente de RNA (Alfieri et al, 2007). Os mRNA recém transcritos tem as

funções de atuar como mensageiros para a tradução das proteínas virais e como molde para a síntese de novos segmentos genômicos RNA fita dupla. Esses produtos se acumulam em uma estrutura vacuolar conhecida como viroplasma e localizada no citosol da célula hospedeira. Dentro deste viroplasma, ocorre um processo chamado

morfogênese que constitui a montagem de novas partículas virais que serão liberadas por lise celular (Alfieri et al, 2007).

Apesar de ainda existirem muitas dúvidas acerca do processo de infecção, especialmente por se tratar de um vírus não envelopado, a proteólise de VP4 em VP5 e VP8 sugere elevação da infectividade (Li et al, 2009). Além da atuação de VP4 e VP7 durante a infecção, é conhecida a capacidade da proteína não estrutural NSP4 em causar alterações no metabolismo celular. Ela também é conhecida como enterotoxina NSP4, uma vez que Ball et al (1996) citado por Hulst et al (2008) realizaram sua inoculação, isoladamente e intraperitonealmente, em camundongos neonatos e observaram que ela foi capaz de provocar diarreia nestes animais com ausência de alterações histológicas. A NSP4 aumenta a permeabilidade da membrana plasmática a íons cálcio, de forma a ocorrer uma elevação em sua concentração no citosol, que acarreta em prejuízos aos eventos metabólicos dependentes de cálcio. Entre eles são citadas alterações no citoesqueleto e nas zonas de oclusões intercelulares que podem levar à lise celular e ao aumento de secreção de íons cloro (Hulst et al, 2008).

O diagnóstico conclusivo inclui os sinais clínicos, as lesões histopatológicas e a detecção do vírus, antígeno ou ácido nucléico viral a partir de amostras fecais. Para isto, os testes mais utilizados são o ensaio imunoenzimático, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), a imunofluorescência e a imunohistoquímica (Markowska-Daniel et al, 1996).

2.5 *Isospora suis*

A coccidiose dos leitões é causada predominantemente por um protozoário intracelular chamado *Isospora suis* e, menos frequentemente, por *Eimeria* spp. Essa diferença se deve ao fato da esporulação de *I. suis*, necessária para torná-la infectante, ocorrer rapidamente (cerca de 24-48 horas) se comparado à *Eimeria* spp. (5 a 12 dias) (Karamon et al, 2007). A coccidiose é uma doença entérica caracterizada por diarreia não hemorrágica, não responsiva a antibióticos e que acomete leitões principalmente entre a segunda e terceira semana de vida (Gualdi et al, 2003; Scala et al, 2009). Ela apresenta elevada morbidade e baixa mortalidade, excetuando-se os casos em que ocorram infecções secundárias associadas (Mundt et al, 2007).

A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de oocistos esporulados presentes nas baias de parição e escamoteadores, eliminados em fezes de leitegadas anteriores (Sotiraki et al, 2008). Por outro lado, Langkær e Roepstorff (2008) acreditam que seja difícil a sobrevivência do oocisto após lavagem, desinfecção e vazio sanitário entre uma leitegada e outra e em uma mesma baia. Assim, eles propõem que a transmissão por meio de uma leitegada contaminada e outra vizinha seja mais plausível. A infecção por meio de oocistos eliminados nas fezes das porcas não parece ser uma importante fonte de infecção para a maioria dos pesquisadores, visto que é baixa a eliminação de oocistos em suas fezes (Daugischies et al, 2004; Karamon et al, 2007). Além disso, a ocorrência da coccidiose apresenta moderada sazonalidade, uma vez que, em períodos de elevada umidade e temperatura, a

esporulação do oocisto ocorre mais rapidamente (Martineau e Castillo, 2000).

As lesões estão localizadas basicamente no jejuno e íleo, e algumas vezes podendo se estender ao ceco e cólon. Macroscopicamente, as alterações são discretas e dificilmente pode ser encontrada uma enterite fibrinonecrótica (Niestrath et al, 2002). As lesões consistem em atrofia de vilosidades e moderada erosão da mucosa, a uma grave enterite fibrinonecrótica (Stuart et al, 1982; Mundt et al, 2007).

O diagnóstico pode ser feito a partir da demonstração de formas endógenas do parasita nas células epiteliais do jejuno e do íleo, em preparados histológicos corados por hematoxilina e eosina (Rebouças et al, 1992). A ocorrência de lesões histopatológicas já descritas ou a presença de oocistos em amostras de fezes frescas ou refrigeradas, somado ao histórico da granja também constituem boas alternativas diagnósticas (Bach et al, 2003; Mundt et al, 2006). A ausência de oocistos em fezes de leitões diarreicos deve ser interpretada com cuidado, pois o pico de eliminação dos mesmos antecede os sinais clínicos (Martineau e Castillo, 2000). Na impossibilidade de se obter as fezes frescas, em que os oocistos se encontram viáveis, pode-se optar pela PCR, conforme Joachim et al (2004). Por fim, uma técnica interessante é a utilização de microscópio com emissão de luz ultravioleta que permite aproveitar a autofluorescência dos oocistos, tornando fácil sua visualização (Dauguschies et al, 2001).

Entre as formas de controle desta enfermidade são preconizadas medidas de higienização, aumento de vazão sanitário, controle do microclima e

vassoura de fogo. Contudo, o recurso terapêutico por meio da utilização do princípio ativo toltrazuril tem se mostrado a medida mais eficaz. Entre eles, a maioria dos trabalhos converge para um resultado favorável à utilização do toltrazuril, uma vez que os animais tratados com ele apresentaram menor período de eliminação de oocistos no ambiente e também menor carga de oocistos eliminada (Mundt et al, 2009; Scala et al, 2009).

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Granjas e amostras coletadas

A partir do cadastro de produtores de suínos do estado de Minas Gerais (IMA/ASEMG/UFMG, Anexo 1) foram selecionadas 15 granjas de 500 ou mais matrizes, localizadas na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. A opção por granjas acima de 500 matrizes foi feita em função da estratificação realizada pelo cadastro acima citado e porque a região alvo deste estudo é caracterizada por possuir granjas de grande porte, quando comparadas às demais regiões do estado. Além disso, as granjas foram escolhidas ao acaso dentre aquelas que apresentaram interesse em participar do estudo e que se incluíam no estrato previamente definido. Todas as granjas que participaram do estudo realizam vacinação para colibacilose em porcas gestantes e administram antimicrobianos preventivamente em leitões neonatos. As coletas foram feitas em três viagens à região alvo, todas durante o primeiro semestre do ano de 2009 e com intervalo máximo de quatro semanas, conforme a disponibilidade das granjas.

Em relação ao tamanho amostral, foram disponibilizadas gratuitamente pelos produtores destas granjas, um total de 30 leitões diarreicos e 30 não diarreicos

(controle), todos com até sete dias de idade. Foram selecionados e eutanasiados quatro leitões de cada granja visitada, sendo dois animais sadios e os outros dois com quadro clínico de diarreia. Cada leitão diarreico escolhido foi acompanhado de um respectivo sadio de mesma idade. Todos os leitões foram pesados antes de serem necropsiados. Em apenas uma granja foi possível fazer a escolha casualizada de leitões que não haviam sido medicados com antimicrobianos e/ou coccidiostáticos. Cada leitão foi retirado de uma leitegada diferente pois permitia uma melhor representação do manejo e higienização/desinfecção das maternidades. Além disso, cada leitão sadio foi retirado de uma leitegada sem nenhum sinal clínico de diarreia ou indícios de diarreia pela baia. Estes animais foram eutanasiados por eletrocussão e sangria e imediatamente necropsiados. Foram coletadas e acondicionadas sob refrigeração amostras de conteúdo intestinal e fezes de cada leitão para pesquisa parasitológica, bacteriologia e PCR de ETEC e *C. perfringens*, PAGE para Rotavirus e ELISA para toxinas de *C. difficile*. Também foram coletados e acondicionados em solução de formalina tamponada a 10% segmentos de jejuno, íleo, cólon e ceco para histopatologia. Todos os procedimentos realizados foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA UFMG), sob protocolo número 30/09.

3.2 Pesquisa de *Escherichia coli* enterotoxigênica

3.2.1 Isolamento

Foi aliquotado 1,0g de fezes de cada animal, armazenado em tubos coletores universais e acondicionado

imediatamente em gelo até a chegada ao laboratório, em no máximo 24 horas. No laboratório, as fezes foram diluídas e homogeneizadas em PBS estéril na proporção de 1:4, fezes:PBS, seguido de plaqueamento em ágar MacConkey (Biobrás®, Prodimol biotecnologia), seletivo para *Enterobacteriaceae* e mantidas em estufa de aerobiose comum a 37° C, por 24 horas. Em cada placa foi semeada a suspensão fecal de apenas um leitão. Após o crescimento das colônias, foram coletadas três colônias lactose positiva que apresentavam morfologia compatível com *E. coli*, utilizando alça estéril e descartável. Em seguida, cada uma das três colônias foi acondicionada individualmente em solução de congelamento 70% BHI (Difco® BD) e 30% glicerol (Ultra Pure Glycerol, Lab Synth®) estéril e armazenadas sob refrigeração a -80° C até sua posterior utilização.

3.2.2 Provas bioquímicas

Cada colônia isolada, congelada a -80° C, foi replaqueada em ágar MacConkey e incubada em estufa comum por 24 horas a 37° C. Após o crescimento, cada colônia foi submetida às avaliações bioquímicas em cada um dos meios estéreis EPM, Mili e Citrato, para a confirmação de *E. coli* (Martins et al, 2000). O meio EPM permite avaliar se o microorganismo é fermentador devido a produção de gás, evidenciada pela formação de bolhas e consequentes rachaduras do meio. Através dele, também é possível constatar a formação de gás sulfídrico quando sua cor se torna preta. Caso o microorganismo seja produtor de urease é verificada cor azul a esverdeada. A desaminação do triptofano é constatada pela cor verde garrafa em sua superfície. O Mili permite avaliar a descarboxilação da lisina quando o meio apresenta cor púrpura; a produção de

indol é verificada pela presença da cor vermelha à rósea na superfície do meio após a adição de 3 a 4 gotas do revelador (Reativo de Kovacs). É possível verificar também a presença de motilidade que é vista pela turvação do meio demonstrando que houve crescimento da bactéria além do ponto de semeadura. Por último, era feita a inoculação no meio Citrato (Difco® BD). Após a inoculação de cada colônia isolada, em cada um dos três meios eles foram incubados em estufa aeróbica a 37° C, por 24 horas, até a realização da leitura.

3.2.3 Detecção de *E. coli* enterotoxigênica

Extração do DNA

As colônias identificadas como *E. coli*, às provas bioquímicas, foram semeadas em ágar MacConkey, em placas individuais, afim de se obter maior quantidade de colônias, e incubadas em estufa a 37° C, por 24 horas. As colônias foram retiradas da estufa e coletadas com alça descartável e estéril, colocadas em um microtubo de 1,5mL, com 300µL de PBS estéril, vortexadas e centrifugadas por 45 segundos a 13000 x g. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pellet 270µL de solução de lise (Tris HCL pH8,0 a 0,1M; EDTA 0,04M; NaCl a 0,99M; 2,0g de SDS), 200µL de solução High TE (Tris HCL pH8,0 a 0,1M; EDTA 0,04M) e 5µL de proteinase K a 0,05% (Macêdo et al, 2007). Os microtubos foram vortexados e incubados a 55° C por no mínimo 4 horas. Em seguida, foi adicionado fenol (phenol equilibrated pH8,0 USB® Corporation, USA) na mesma quantidade do conteúdo preexistente no microtubo. As amostras foram agitadas por 10 minutos, centrifugadas a 13000 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi adicionado a um novo microtubo. Acrescentou-se ao sobrenadante fenol

(metade do volume adicionado na etapa anterior), solução de clorofórmio (Lab Synth®) e álcool isoamílico (Vetec®) 24:1, o mesmo volume utilizado para o fenol na etapa anterior, em seguida, foi feita a mistura por vortex e centrifugação a 13000 x g, por 10 minutos cada. Repetiu-se uma última lavagem do sobrenadante com solução de clorofórmio e álcool isoamílico, transferindo o sobrenadante para um novo microtubo e acrescentando 1,0mL de etanol gelado (Lab Synth®) para a precipitação do pellet de DNA. Após a formação do pellet, foi feita uma centrifugação por 20 minutos a 13000 x g e 4°C, descarte do sobrenadante e secagem do pellet sobre papel toalha por cerca de 10 minutos. Por fim, o pellet seco foi suspenso em 200µL de água miliQ, incubado a 37° C, por no mínimo 4 horas e congelado a -20° C até a sua quantificação.

Reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR multiplex)

Procedeu-se a quantificação do DNA em espectrofotômetro (Shimadzu® modelo UV160A) e a diluição do DNA foi feita na concentração de 10ng/µL, conforme descrita por Macêdo et al (2007). As reações da PCR para cada amostra foram executadas em um volume de 10µl, contendo 10ng de DNA bacteriano, 6,1µl de água miliQ, 1,0µl de tampão da PCR 10X (Ludwig® Biotec), 0,8µl de dNTP 2,5mmol (Invitrogen® Corporation), 0,1µl de mix de primers de *E. coli* (Tabela 2), 0,8µl de MgCl₂ a 50mmol (Ludwig® Biotec) e 0,2µl de Taq Polimerase 500U (Ludwig® Biotec). Para o controle negativo, foi utilizado todos os componentes acima citados, excetuando o DNA bacteriano. Foram utilizadas quatro amostras como controle positivo para os fatores de patogenicidade na PCR multiplex,

gentilmente cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico Veterinário da University of Minnesota: 2568 (STb, STaP, F18 e Stx2e), 2569 (STb, LT e K88), 2570 (987P e STaP) e 2571 (STaP, K99 e F41). O termociclador utilizado foi NYX (TECHNIK[®], Inc, USA), e o programa foi de 25 ciclos de 94° C por 1 minuto, seguido de 55° C por 1 minuto, 70° C por 2 minutos, extensão final no último ciclo por 10 minutos a 72° C e, finalmente a 4°

C (Macêdo et al, 2007). Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% (Sigma-Aldrich[®]), a 70 V em tampão Tris-ácido bórico-EDTA, por 60 minutos e cuba de eletroforese vertical (Amersham[®]). O marcador de peso molecular Kb plus (Invitrogen[®]) foi utilizado como medida de referência. Por fim, o gel foi corado pela prata.

Tabela 2. Primers para genes codificadores de fatores de virulência de *Escherichia coli*

Fator de patogenicidade	Sequência de primers para genes de patogenicidade de <i>Escherichia coli</i>	Tamanho do Produto (pb)
STb:enterotoxina B	Forward 5' - TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT - 3' Reverse 5' - CTC CAG CAG TAC CAT CTC TA - 3'	113
STaP:enterotoxina A	Forward 5' - CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT - 3' Reverse 5' - TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG - 3'	158
K99: fímbria de adesão (bovino e suíno)	Forward 5' - AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA - 3' Reverse 5' - AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT - 3'	230
LT: enterotoxina termo lábil	Forward 5' - GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT - 3' Reverse 5' - TGG TCT CGG TCA GAT ATG T - 3'	272
F18: fímbria de adesão (homem e bovino)	Forward 5' - TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA - 3' Reverse 5' - ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG - 3'	313
987P: fímbria de adesão (suíno)	Forward 5' - GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC - 3' Reverse 5' - AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC - 3'	409
K88: fímbria de adesão (suíno)	Forward 5' - GTA TCT GTC CGA GAA TAT CA - 3' Reverse 5' - GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG - 3'	499
F41: fímbria de adesão (bovino, suíno e ovino)	Forward 5' - AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG - 3' Reverse 5' - CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC - 3'	612
STx2e: Shiga toxina II (homem, bovino e suíno)	Forward 5' - AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT - 3' Reverse 5' - TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC - 3'	733

3.3 Pesquisa *Clostridium perfringens* tipo A e tipo C

3.3.1 Isolamento

Para o isolamento de *C. perfringens* as amostras foram semeadas em ágar gema de ovo com cicloserina, ágar sangue e

SPS (Difco®) e incubadas em atmosfera de anaerobiose a 37° C por 24 horas (Vieira et al, 2008). As colônias características (dupla hemólise em ágar sangue, lecitinase positiva em cicloserina gema de ovo e colônia enegrecida sulfito

redutora em SPS) foram submetidas à coloração de Gram para confirmação. As amostras Gram positiva foram encaminhadas para tipificação do agente através da PCR multiplex, descrita abaixo.

3.3.2 Tipificação de *C. perfringens* **Reação múltipla da cadeia da polimerase (PCR multiplex)**

A partir de colônias características de *C. perfringens*, foi realizada a extração térmica do DNA, a 98° C por 20 minutos, sem posterior purificação do material genético (Baums et al, 2004). As reações da PCR foram feitas conforme metodologia de Uzal et al (1997). Para cada amostra, as reações foram executadas em um volume de 25µl contendo 5ng de DNA bacteriano, 10,7µl de água miliQ, 2,5µl de tampão da PCR 10X (Tampão I B, Phoneutria®), 0,5µl de dNTP 0,2mMol (Promega®), 6,0µl de mix de primers de *C. perfringens* a 0,5mmol (Tabela 3) e 0,3µl de Taq Polimerase 500U (Phoneutria®). Para o controle negativo, foram utilizados todos

os componentes acima citados, excetuando o DNA bacteriano. Para o controle positivo, foram utilizadas as seguintes amostras de referência do American Type culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, EUA), ATCC3624 para *C. perfringens* tipo A, ATCC3626 para *C. perfringens* tipo B, ATCC3628 para *C. perfringens* tipo C, ATCC3629 para *C. perfringens* tipo D e ATCC27324 para *C. perfringens* tipo E. O termociclador utilizado foi o Thermo® (Electron Corporation, USA), e um programa de 34 ciclos de 94° C por 1 minuto, seguido de 48° C por 1 minuto, 72° C por 2 minutos e extensão final no último ciclo por 7 minutos a 72° C e, por fim a 4° C. Os produtos de amplificação foram aplicados ao gel de agarose a 1% com brometo de etídio e submetidos à eletroforese com tampão Tris-acetato-EDTA, por 1 hora. Os primers utilizados na amplificação dos genes codificadores das toxinas constam na tabela 3 (Vieira et al, 2008).

Tabela 3. Primers para genes codificadores de toxinas de *C. perfringens*

Gene toxina	Toxina codificada	Sequência de primer	Produto (pb)
<i>cpa</i>	α	Forward CPA 5'-AGTCTACGCTTGGGATGGAA-3' Reverse CPA 5'-TTTCCTGGGTGTCCATTTC-3'	324
<i>cpb</i>	β	Forward CPB 5'-TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA-3' Reverse CPB 5'-TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA-3'	196
<i>cpe</i>	entero	Forward CPE 5'-GGGGAACCCTCAGTAGTTTCA-3' Reverse CPE 5'-ACCAGCTGGATTTGAGTTTAATG-3'	655
<i>etx</i>	ϵ	Forward CPETX 5'- TGGGAACTTCGATACAAGCA-3' Reverse CPETX 5'- TTAACCTCATCTCCCATAACTGCAC-3'	233
<i>iap</i>	δ	Forward CPI 5'- AAACGCATTAAAGCTCACACC-3' Reverse CPI 5'- CTGCATAACCTGGAATGGCT-3'	298
<i>cpb2</i>	$\beta 2$	Forward CPB2 5'- CAAGCAATTGGGGGAGTTTA-3' Reverse CPB2 5'- GCAGAATCAGGATTTTGACCA-3'	573

3.4 Pesquisa de *Clostridium difficile*

No caso de *Clostridium difficile*, foi feita a detecção da presença das toxinas A e B a partir das fezes e conteúdo intestinal coletados, utilizando teste imunoenzimático ELISA (Kit comercial Ridascreen® *Clostridium difficile* toxinas A/B, R-biopharm, Darmstadt, Germany), conforme orientações do fabricante. Para o preparo das amostras, com o auxílio de uma alça descartável, foi colocado cerca de 50-100 mg de fezes em um tubo de ensaio, acrescido de 1,0 mL de tampão de diluição de amostra que acompanha o Kit, seguido de homogeneização e centrifugação a 2500 x g da suspensão. Foram aplicados individualmente em cada poço, o sobrenadante de cada amostra, os controles positivo e negativo que acompanham o kit e incubados por 60 minutos a temperatura ambiente. Foi

feita lavagem acrescentando 300µL de solução tampão em cada poço repetindo este processo por 5 vezes. Procedeu-se a segunda incubação com a adição de 50µL de anticorpos biotinizados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Repetiu-se a mesma lavagem já referenciada, seguida da última incubação por 15 minutos, na qual foi acrescentado 100µL do substrato (streptavidina conjugada à peroxidase). A leitura foi feita em leitor de Elisa BioTek® (Instruments, USA). De acordo com o fabricante, o cálculo do ponto de corte é feito a partir da soma de 0,15 unidades ao valor da absorbância obtida no controle negativo. São consideradas amostras positivas aquelas que apresentarem absorbância acima de 10% do ponto de corte calculado, indeterminadas as que ficarem na faixa

até 10% acima ou abaixo e negativas as que apresentam absorbância abaixo de 10% do ponto de corte.

3.5 Pesquisa de Rotavirus

Para a pesquisa de Rotavirus foram utilizadas 58 amostras, uma vez que dois animais apresentaram fezes insuficientes para a realização do teste. Assim, privilegiou-se suas fezes para a pesquisa de agentes que não causassem lesões tão evidentes à histopatologia, *Escherichia coli* e *Clostridium* sp.

As amostras fecais foram diluídas a 15% p/v em tampão de estabilização (Tris-HCl 50mMol, CaCl₂ 13mMol e β-Mercaptoetanol 1,5mMol), acrescidas de pérolas de vidro e submetidas a agitação por 3 ciclos de 30 segundos, conforme Barbosa et al (1998). Em seguida, foi feita centrifugação por 15 minutos a 13000 x g e armazenou-se o sobrenadante a -20° C, até o início da extração. Para a extração do RNA, colocou-se 500µl da suspensão fecal em um microtubo de 1,5mL, acrescido de 100 µl de tampão de lise (SDS 10% p/v, EDTA 110mM; pH 7,8), seguida de homogeneização em vortex e incubação a 55° C por 15 minutos (Barbosa, 1994). Em seguida, foram feitas duas desproteinizações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 50:48:2 (Sigma-Aldrich®) e uma extração apenas com clorofórmio (Synth®) (Sambrook et al, 1989). O sobrenadante foi recolhido e acrescido de 100 µl de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol resfriado a -20° C, sendo a solução mantida a -20° C durante uma noite (Theil et al, 1981). Em seguida, o RNA foi centrifugado a 4° C por 15 minutos e a 12320 x g. Foi descartado o sobrenadante e realizou-se uma última lavagem com 100µl de etanol a 80% e o pellet foi dessecado por

evaporação. Acrescentou-se ao pellet 50 µl de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5mMol pH6,8, uréia 5M, β-Mercaptoetanol 5% , SDS 3% e 0,01% de azul de bromofenol) e incubou-se a 56° C por 15 minutos. A amostra foi aplicada a um gel composto por uma camada inferior, gel de resolução de 7% de acrilamida (Sigma-Aldrich®), e uma superior, gel concentrador da amostra com 3,75% de acrilamida. Foi utilizada uma cuba vertical para a eletroforese (modelo Protean II Xi Cell, BioRad®) e tampão de corrida Tris-glicina (Tris 25mMol, glicina 0,2M pH8,6). Após corrida por 180 minutos a 250V (Laemmli, 1970 citado por Barbosa, 1994) o gel foi corado pela prata, conforme Herring et al (1982).

3.6 Exame de flutuação para *Isospora suis*

Foi pesquisada qualitativamente a presença de oocistos de coccídeos (*Eimeria* spp e *Isospora suis*) através do método de flutuação utilizando solução de Sheater (500g de açúcar, 320mL de água destilada e 6,5 g de fenol), conforme metodologia de Hoffmann (1987). Para cada amostra, colocou-se 1,0g de fezes frescas em um béquer de vidro. Acrescentou água em volume suficiente para a diluição, homogeneização com bastão de vidro, tamisação e transferiu-se para um tubo Falcon de 15 mL até a sua metade. Completou-se com a solução de Sheater, homogeneização e centrifugação por 5 minutos a 2318 x g. Em seguida, os tubos foram retirados sem agitação e foram coletadas algumas gotas da camada superficial, que foram colocadas sobre uma lâmina nova e coberta com lamínula. A avaliação foi feita sob microscópio de luz clara.

3.7 Histopatologia

Fragmentos de jejuno, íleo, ceco e cólon coletados durante as necropsias de cada leitão foram fixados em formalina tamponada 10%. Posteriormente, foi feito o processamento pela técnica de desidratação, diafanização, inclusão, secção de 5 micras para coloração por hematoxilina e eosina e avaliação histológica em microscópio de luz clara (Luna, 1968).

3.8 Análise estatística

Os dados levantados foram avaliados estatisticamente pelo Teste exato de Fisher (Data Analysis and Statistical Software, Stata®). Para cada agente pesquisado, em relação aos grupos diarreico e controle, foi considerado como significativo um valor de

probabilidade menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$).

4.0 RESULTADOS

4.1 *Escherichia coli*

Todas as 60 amostras, referentes aos 30 leitões diarreicos e 30 não diarreicos, apresentaram crescimento de colônias lactose positiva em ágar Mac Conkey. Das 180 colônias submetidas às provas bioquímicas, 3 colônias distintas de cada uma das 60 amostras, 77 colônias foram negativas para *Escherichia coli*, 3 foram inconclusivas e 100 foram confirmadas como *E. coli*. Em relação aos 60 leitões em estudo, 22 dos 30 diarreicos e 24 dos 30 controles apresentaram presença de *E. coli*. Todas as colônias positivas e inconclusivas foram submetidas à PCR (Figura 3).

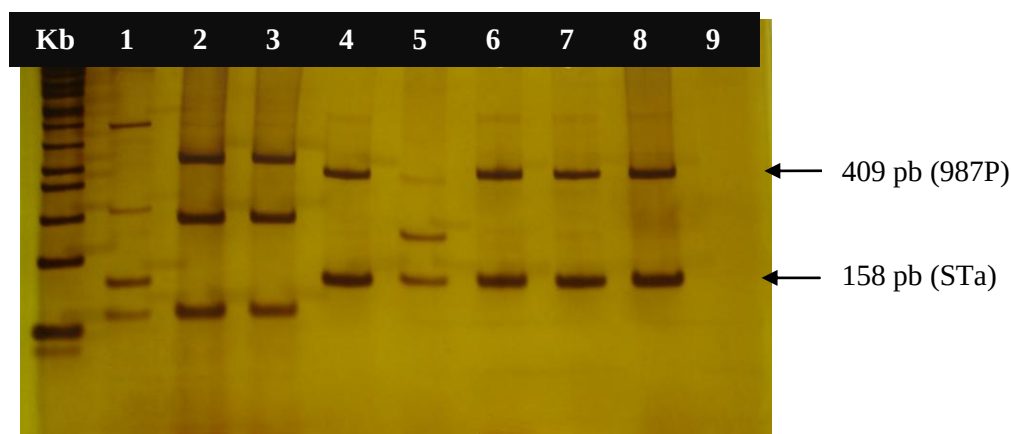


Figura 3. Gel de poliacrilamida corado pela prata com perfil de bandas dos produtos da PCR multiplex para fatores de virulência de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). Kb: marcador de peso molecular; canaletas 1 a 5: controle positivo; canaletas 6 a 8: amostras positivas para fímbria 987P (409 pb) e toxina STa (158pb); canaleta 9: controle negativo da PCR.

Apenas quatro leitões de diferentes granjas apresentaram PCR positiva para a presença de genes de fatores de virulência (Tabela 4). Entre eles, três pertenciam ao grupo diarreico e à PCR apresentaram os seguintes virotipos:

F41; 987P; 987P e STa. O leitão não diarreico e com PCR positiva apresentou amplificação dos genes para 987P e STa (Figura 3, canaleta 8). Entretanto, apenas o leitão do grupo diarreico e com amplificação dos genes para 987P e STa

apresentou à histopatologia grande quantidade de bacilos aderidos à superfície dos enterócitos (Figura 4 b).

Não foi constatada diferença estatística entre os grupos diarréico e controle em relação aos resultados da PCR para *E. coli* enterotoxigênica ($p = 0,741$).

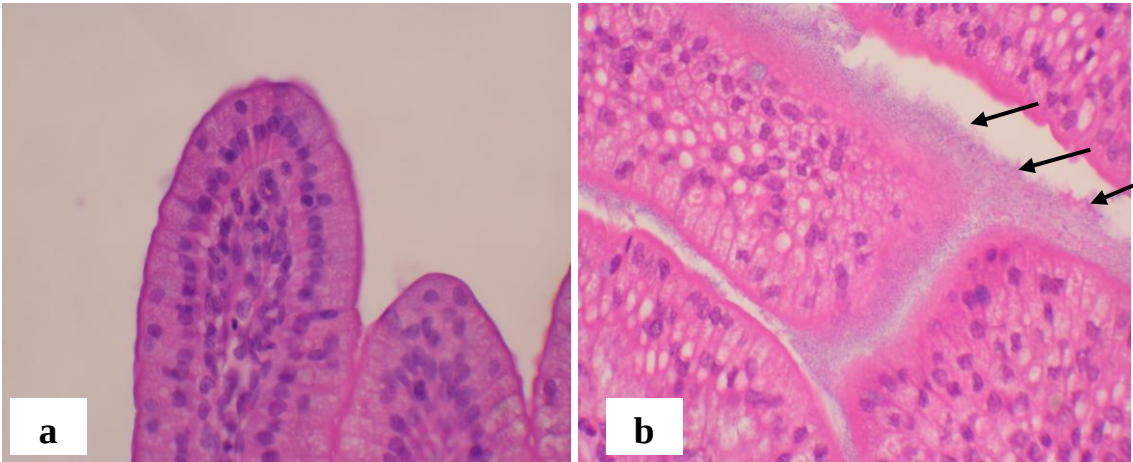


Figura 4. Jejuno de leitão: **a)** vilosidades e enterócitos normais (400X); **b)** vilosidades com enterócitos apresentando intensa adesão de cocobacilos, compatíveis com *Escherichia coli* enterotoxigênica, setas (400X).

Tabela 4. Frequência dos agentes pesquisados

	ELISA <i>C. difficile</i>	PAGE Rotavirus [#]	PCR <i>C. perfringens</i> tipo A [#]	PCR <i>C. perfringens</i> tipo C	PCR <i>E. coli</i> ETEC	Flutuação <i>I. suis</i>
	43,3% (13/30) ^A CpA					
Leitões diarréicos	23,3% (7/30)	14,3% (4/28) ^A	33,3% (10/30) CpA β2	0% (0/0)	10% (3/30)	0% (0/20)
Leitões não diarréicos (controle)	10% (3/30)	0% (0/30) ^B	83,3% (25/30) ^B CpA 53,3% (16/30) CpA β2	0% (0/0)	3,3% (1/30)	3,8% (1/26)
Granjas	40% (6/15)	26,7% (4/15)	93,3% (14/15)	0% (0/0)	26,7% (4/15)	6,7% (1/15)

[#] Letras diferentes dentro da mesma coluna diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$).

Entre todos os leitões avaliados, 10 pertencentes aos diarréicos e cinco aos controle não apresentaram diagnóstico positivo para nenhum dos agentes

pesquisados. Ainda foram feitas análises para diferentes classes de idades e peso dos leitões, em relação aos grupos diarréicos e

não diarreicos, mas não houve nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$).

4.2 *Clostridium perfringens* tipo A e tipo C

Das 60 amostras semeadas em ágar e mantidas em atmosfera de anaerobiose para o isolamento, 13 do grupo diarreico e 25 do controle apresentaram crescimento de colônias fenotipicamente compatíveis com *C. perfringens* tipo A.

A partir dos resultados da PCR, *C.*

perfringens tipo A foi diagnosticado em 14 das 15 granjas investigadas, o que demonstra a alta frequência deste agente, comum à microbiota do leitão. Dessas 14 granjas positivas, apenas três não apresentaram cepas de *C. perfringens* tipo A com o gene *cpb2*. Assim, para os leitões diarreicos foi encontrada uma frequência de 33,3% para *C. perfringens* tipo A $\beta 2$ num total de 43,3% de *C. perfringens* tipo A (Tabela 4; Figura 5), enquanto que para os leitões controle a frequência foi de 53,3% para *C. perfringens* tipo A $\beta 2$ em um total de 83,3% de *C. perfringens* tipo A.

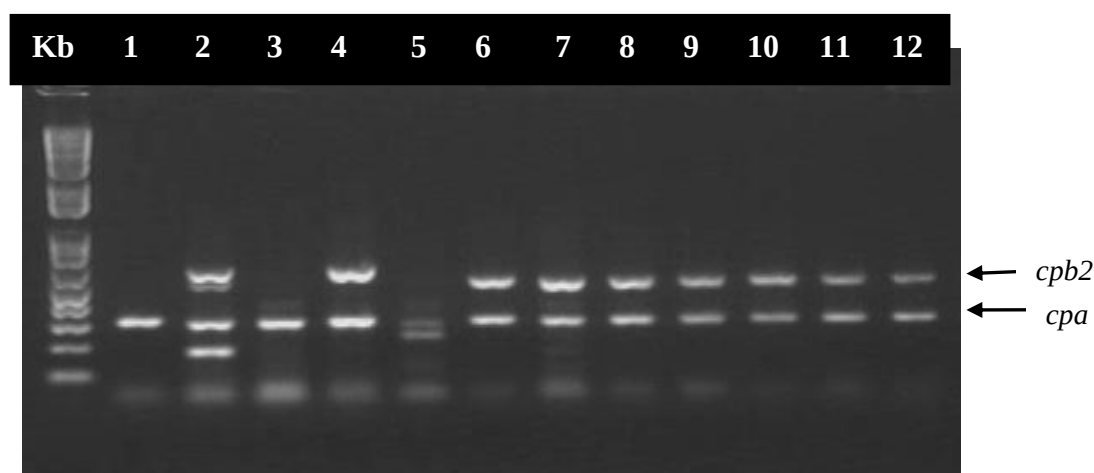


Figura 5. Gel de agarose com perfil de bandas dos produtos da PCR multiplex para *C. perfringens*. **Kb:** marcador de peso molecular; **1:** controle positivo *C. perfringens* tipo A; **2:** controle positivo *C. perfringens* tipo B; **3:** controle positivo *C. perfringens* tipo C; **4:** controle positivo *C. perfringens* tipo D; **5:** controle positivo *C. perfringens* tipo E; **6 a 12:** amostras positivas de *C. perfringens* tipo A $\beta 2$.

Na avaliação histopatológica, não foi verificada qualquer alteração que pudesse ser associada a este agente. E entre todas as lesões observadas, mesmo não sendo compatíveis com as descritas para *C. perfringens* tipo A, foi feita avaliação a fim de verificar alguma possível relação entre presença ou ausência de *cpb2*. Entretanto, não houve diferença significativa ($p = 0,73$) ou qualquer associação entre infecção por

C. perfringens tipo A ou *C. perfringens* tipo A $\beta 2$, para presença ou ausência de lesões histopatológicas. Assim como também não houve diferença entre presença ou ausência de lesões histopatológicas e ser positivo ou negativo para *C. perfringens* tipo A, desconsiderando a presença ou ausência do gene *cpb2*.

Como alguns trabalhos têm discutido acerca da intensidade da infecção por *C. perfringens* tipo A, o presente estudo

também contemplou esta avaliação (Tabela 5). Para isso, foram feitas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} .

Tabela 5. Quantificação de colônias de *Clostridium perfringens*

	Leitões diarreicos	Leitões não diarreicos
Ausência de UFC de <i>C. perfringens</i> (nas concentrações avaliadas)	56,6% (17/30) ^{Aa}	16,6% (5/30) ^{Ab}
$\leq 3,0 \times 10^{-4}$ UFC de <i>C. perfringens</i>	16,6% (5/30) ^{Ba}	33,3% (10/30) ^{Ba}
$> 3,0 \times 10^{-4}$ UFC de <i>C. perfringens</i>	26,6% (8/30) ^{Ba}	50,0% (15/30) ^{Ba}

*Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p \leq 0,05$); Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Não houve diagnóstico de *Clostridium perfringens* tipo C em nenhuma amostra avaliada.

4.3 *Clostridium difficile*

À necropsia, 13 leitões oriundos de 6 diferentes granjas apresentaram edema de mesocólon, principal alteração macroscópica associada com *C. difficile* (Figura 6; Tabela 6). Entre eles, apenas 4 animais pertencentes ao grupo diarreicos e 2 aos não diarreicos apresentaram

ELISA positivo para a presença de toxinas de *C. difficile*. Não houve diferença significativa entre presença ou ausência de lesão macroscópica para leitões diarreicos ou controle. Entre todos os leitões que não apresentaram lesões macroscópicas, houve diferença ($p = 0,004$) entre ELISA negativo, mais frequente, e ELISA positivo, menos frequente.

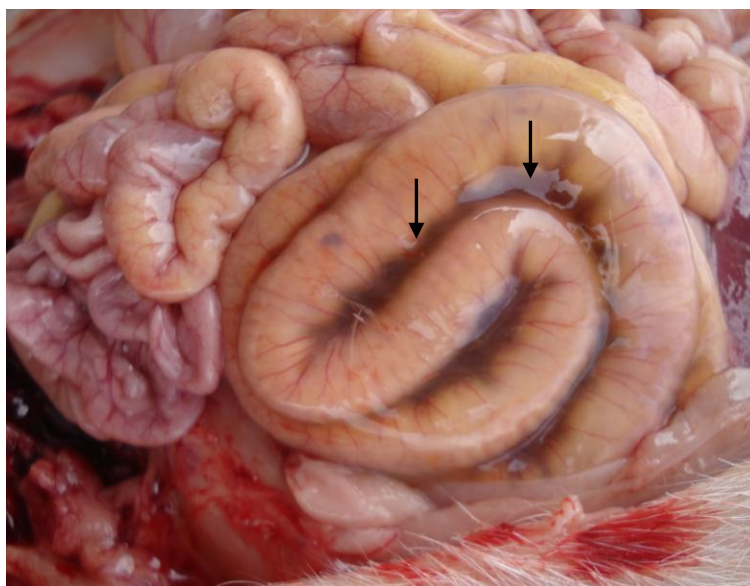


Figura 6. Leitão: acentuado edema de mesocólon (setas).

Tabela 6. Achados macroscópicos e histopatológicos

Grupos	Lesões à necropsia [*]	Achados histopatológicos [#]	
Leitões diarreicos	13,3% (4/30) leve 6,7% (2/30) moderado 6,7% (2/30) acentuado	10% (3/30) enterite leve 6,7% (2/30) enterite moderada 13,3% (4/30) enterite grave	6,7% (2/30) tiflocolite leve 3,3% (1/30) tiflocolite moderada 10% (3/30) tiflocolite grave
Leitões não diarreicos (controle)	6,7% (2/30) leve 6,7% (2/30) moderado 3,3% (1/30) acentuado	20% (6/30) enterite leve 6,7% (2/30) enterite moderada 6,7% (2/30) enterite grave	6,7% (2/30) tiflocolite leve 3,3% (1/30) tiflocolite moderada 13,3% (4/30) tiflocolite grave

^{*} A lesão macroscópica considerada nesta tabela foi somente o edema de mesocólon e suas respectivas intensidades;

[#] Para leitões que apresentavam mais de uma lesão microscópica foi considerada a mais grave.

Ao teste ELISA, 10 leitões, pertencentes a 6 diferentes granjas, apresentaram resultado positivo para a presença das toxinas de *C. difficile* no conteúdo intestinal. Dentre eles, 7 pertenciam ao grupo diarreicos e três aos não diarreicos. Para os pertencentes ao primeiro grupo, dois tinham colite neutrofílica discreta, sendo moderada em um animal. Dois possuíam colite

acentuada (Figura 7 b & d), enquanto os outros dois restantes não possuíam quaisquer alterações histopatológicas. Entre os três pertencentes ao grupo controle, em um leitão havia colite neutrofílica discreta e os dois restantes possuíam a mesma lesão com intensidade acentuada. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre

os grupos diarreicos e não diarreicos em relação aos resultados do ELISA.

Entretanto, outros seis leitões negativos ao ELISA, pertencentes a cinco diferentes granjas sendo três delas sem nenhum resultado positivo para *C. difficile*, apresentaram lesões histológicas compatíveis com a infecção

por este agente. Entre eles, dois pertenciam ao grupo diarreico e em um deles havia colite leve, enquanto no outro foi identificada colite moderada. Para os outros quatro pertencentes ao grupo controle, apenas um apresentou colite leve, enquanto os outros três possuíam lesão acentuada.

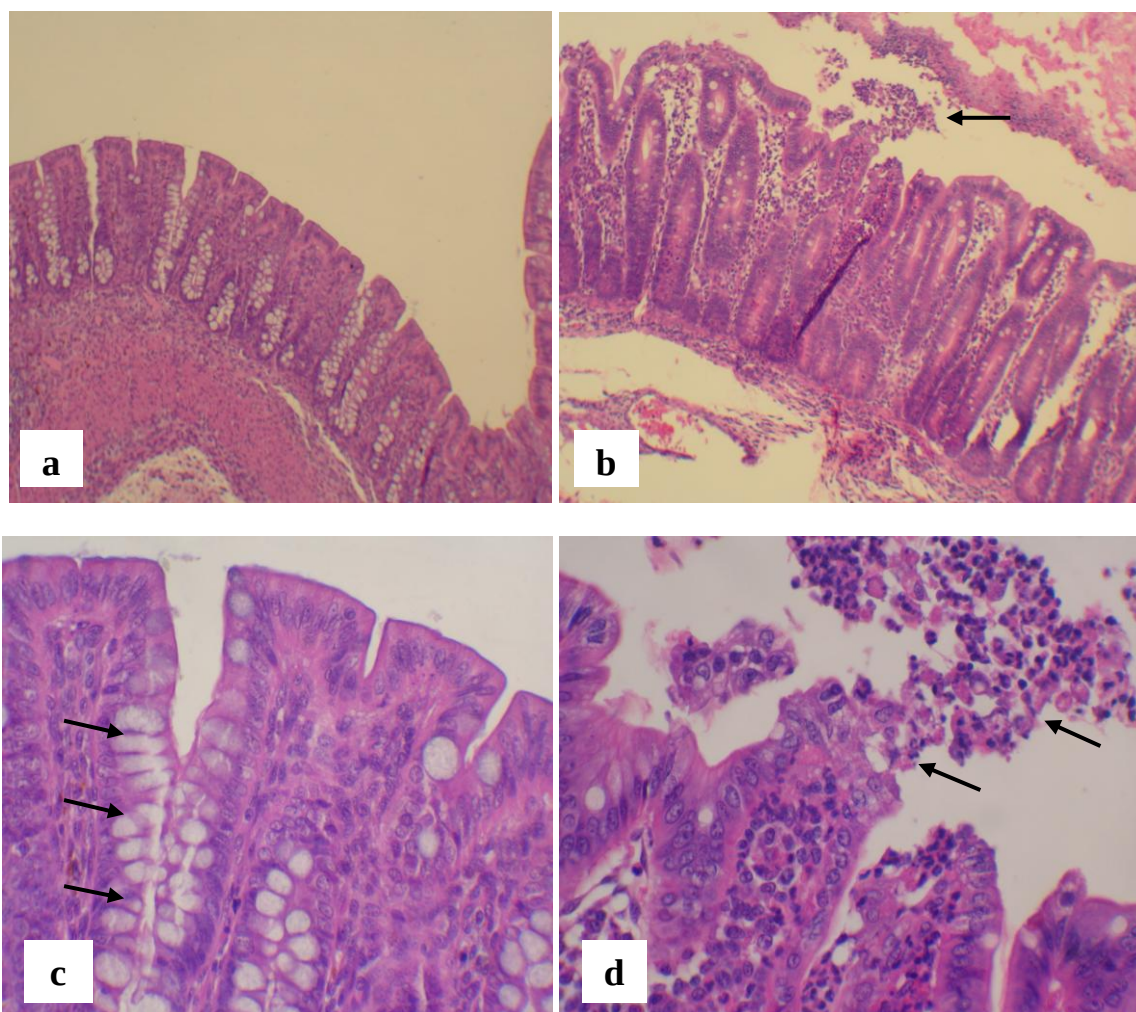


Figura 7. Cólon de leitão: **a & c)** cólon normal com presença marcante de células caliciformes, vide setas (40X e 400X); **b & d)** colite neutrofílica necrotizante grave, há intensa infiltração de neutrófilos partindo da lâmina própria em direção ao lúmen intestinal, lesão conhecida como “erosões em vulcão”, setas (aumento de 40X e 400X).

4.4 Rotavírus

À eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), dos 58 leitões avaliados quatro foram positivos para Rotavírus, sendo estes de diferentes granjas e pertencentes

ao grupo diarreico (Figura 8; Tabela 4). Dentre eles, três apresentaram enterite neutrofílica multifocal moderada a grave, com

necrose e úlceras de ápice de vilosidade (Figura 9 b & d), lesão característica de

infecção por Rotavirus. O leitão restante não apresentou lesões à microscopia.

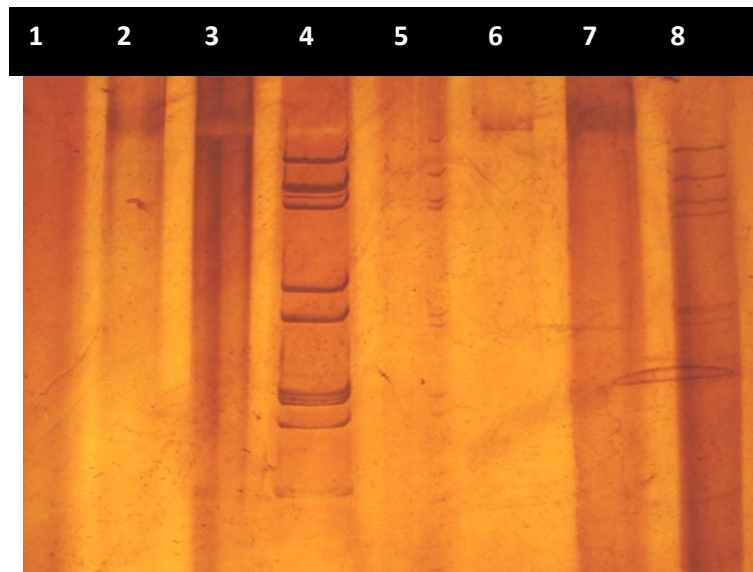
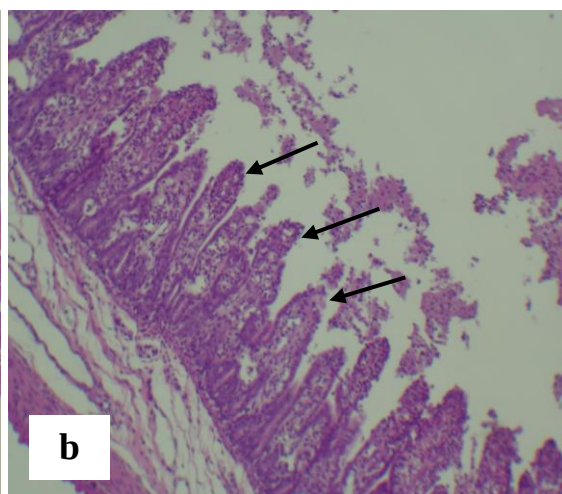
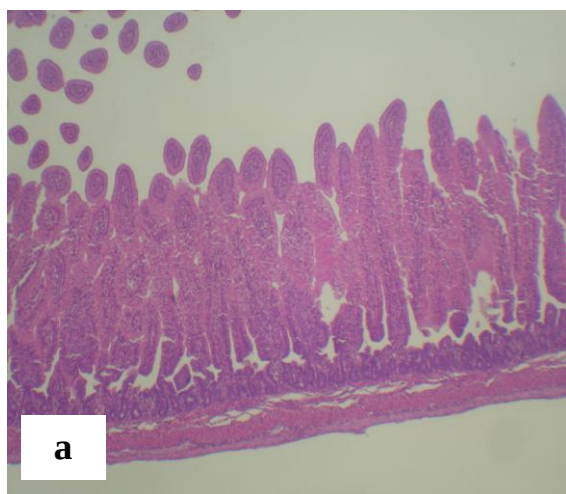


Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE); canaletas 4 e 8 apresentam as amostras positivas contendo os segmentos do rotavirus



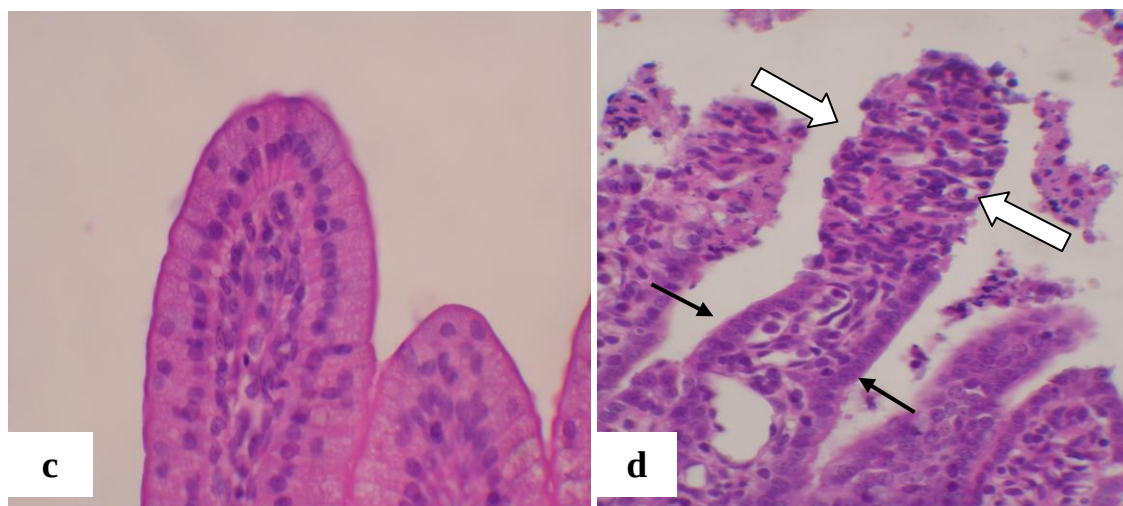


Figura 9. Jejunum de leitão: **a & c)** Jejunum de leitão: vilosidades intestinais normais, bem desenvolvidas e com enterócitos íntegros (aumento de 40X e 400X); **b & d)** Jejunum de leitão: enterite neutrofílica necrotizante grave do ápice até a porção média das vilosidades (aumento de 40X e 400X); em **d** observar área com enterócitos remanescentes (seta preta) e área já com perda total dos enterócitos (seta branca).

4.5 *Isospora suis*

Apenas um leitão do grupo não diarreico apresentou presença de oocisto no exame de flutuação (Tabela 4). À histopatologia, não foi encontrada presença de enterócitos parasitados como é típico dos quadros de coccidiose em leitões. Não houve diferença estatística entre os grupos de leitões pesquisados para a presença ou ausência de *I. suis*.

4.6 Coinfecção

Em relação às coinfeções, 11 leitões apresentaram mais de um enteropatógeno sendo os mesmos pertencentes a oito diferentes granjas, sete leitões do grupo diarreico e quatro pertencentes ao grupo controle. Entre os leitões diarreicos, dois foram positivos para *C. perfringens* tipo A β 2 e toxinas de *C. difficile*, dois para *C. perfringens* tipo A β 2 e *E. coli* ETEC, um para *C. perfringens* tipo A e Rotavírus e dois para *C. perfringens* tipo A e toxinas de *C. difficile*. Para os quatro leitões não diarreicos, dois foram positivos para *C. perfringens* tipo A β 2 e toxinas de *C.*

difficile, um para *C. perfringens* tipo A β 2 e *E. coli* ETEC e um restante para *C. perfringens* tipo A β 2, toxinas de *C. difficile* e presença de oocisto de *I. suis*.

5.0 DISCUSSÃO

5.1 *Escherichia coli*

Apesar de apenas os animais de uma das 15 granjas coletadas não terem sido medicadas, em todas as amostras semeadas em ágar MacConkey houve crescimento de colônias fenotipicamente compatíveis com colônias de *E. coli*. Tal fato, poderia justificar os frequentes resultados de resistência antimicrobiana associados à utilização de drogas sem a prévia realização de testes antibiograma ou concentração inibitória mínima (Menin et al, 2008).

Do total de quatro leitões positivos para os fatores de virulência à PCR, dois não expressaram amplificação para genes de fímbria ou de toxina. Segundo Francis (2002), ambos fatores de virulência, toxina e fímbrias, são requisitos necessários para que ocorra a infecção e

diarréia por ETEC. Um destes quatro leitões expressou a fímbria F41, mas também foi positivo para *C. perfringens* tipo A β 2. Assim, a ETEC diagnosticada poderia ser apenas um achado sem qualquer envolvimento com o sinal clínico presente. O outro leitão foi positivo para gene codificador da fímbria 987P e negativo para todos os outros agentes pesquisados. Uma possível justificativa para a ocorrência de diarréia neste leitão é o excessivo consumo de leite, diarréia não infecciosa, que passa rapidamente do estômago ao intestino antes que seja devidamente digerido (Jennings, 1959 citado por Lippke, 2008). Essa justificativa também poderia ser uma possível explicação para os leitões diarréicos negativos para todos os enteropatógenos pesquisados. Francis (2002) afirma ainda que a grande maioria dos leitões neonatos positivos à PCR para genes de fatores de virulência de ETEC, expressam os virotipos STa, STb, K99 e 987P. Yaeger et al (2007) encontraram uma frequência de 3% de *E. coli* ETEC em leitões com até 7 dias de idade, recebidos com histórico de diarréia. Já em um estudo retrospectivo com leitões de até 10 dias de idade, com o mesmo histórico clínico, os mesmos autores encontraram 20% de frequência de *E. coli*. Na pesquisa de Lippke (2008), realizada na região sul do Brasil, não houve nenhum diagnóstico de *E. coli*. Seu estudo adotou como critério para diagnóstico de *E. coli* a presença de mais de 80% de colônias beta hemolíticas e fenotipicamente compatíveis com colônias de *E. coli*. Em sua pesquisa não foi utilizada a PCR ou outro meio para a detecção de genes de fatores de virulência, o que lhe conferiria maior especificidade para a identificação de cepas diarreogênicas (Macêdo et al, 2007; Menin et al, 2008). Uma justificativa utilizada para o seu

resultado foi a vacinação contra a colibacilose neonatal de todas as porcas mães dos leitões coletados. Todas as granjas coletadas em nosso estudo também utilizam essa vacinação, o que possivelmente colabore para a baixa frequência de *E. coli* ETEC.

Por outro lado, pesquisas mais antigas demonstram valores de frequência elevada para colibacilose o que não tem sido verificado em trabalhos recentes. A carência de pesquisas diagnósticas e de levantamento de dados têm favorecido a persistência da idéia de que *Escherichia coli* enterotoxigênica é o agente etiológico principal das diarréias neonatais. Todavia, a ampla utilização da vacina contra a colibacilose neonatal, utilizada em porcas gestantes, tem contribuído bastante para a redução destes valores.

5.2 *Clostridium perfringens* tipo A e tipo C

A ausência de isolamento de colônias de *C. perfringens* tipo A e tipo C, evidenciada em um número acentuado de amostras, pode ser um reflexo da medicação preventiva a qual os leitões foram submetidos. E isso pode ter sido determinante para que o isolamento de *C. perfringens* tipo A não tenha sido ainda maior (Wasinski, 2007).

A alta frequência de *C. perfringens* tipo A β 2 encontrada no grupo controle foi um resultado inesperado, uma vez que amostras positivas para o gene *cpb2* comumente estão relacionadas com a ocorrência de enterites ou diarréias (Bueschel et al, 2003). Uma provável explicação para a ausência de uma frequência elevada de *C. perfringens* tipo A β 2 no grupo diarréico em relação ao controle é o fato das granjas coletadas não estarem passando por surtos

epidêmicos de diarreia neonatal (Lippke, 2008).

Apesar de muitos trabalhos não considerarem a presença de alterações histopatológicas associadas a infecções por *C. perfringens* tipo A β 2, alguns autores tem associado a presença de infiltrados inflamatórios na lâmina própria e necrose discreta a moderada de enterócitos a esta infecção (Songer e Glock, 1998; Hammer et al, 2008). Entretanto, não foi encontrada qualquer lesão histológica que pudesse ser atribuída a este agente. Além disso, Yaeger (comunicação pessoal) não encontrou lesões microscópicas em leitões diarreicos por *C. perfringens* tipo A β 2. Assim, é coerente pensar que a diarreia seja de caráter secretória. É importante salientar que mesmo na presença de tais alterações histológicas, é preciso bastante cautela na interpretação destes resultados uma vez que este agente é normal à microbiota entérica de animais sadios. Neste caso, é imprescindível a pesquisa de infecções mistas. Um outro dado que tem sido incluído nessas avaliações é a quantificação das colônias de *C. perfringens* tipo A, apesar de não haver grandes evidências que sua quantificação ofereça auxílio ao diagnóstico (Songer e Glock, 1998).

Não foi encontrada nenhuma amostra positiva para *C. perfringens* tipo C à PCR, resultado também verificado no estudo de Lippke (2008). No trabalho de Yaeger (2007) não foi feita qualquer menção a este enteropatógeno. À histopatologia também não houve qualquer alteração sugestiva de infecção por *C. perfringens* tipo C. Uma provável explicação é a eficácia das medidas terapêuticas adotadas nas granjas com a utilização preventiva de antimicrobianos.

Outra possível justificativa é a eficiência da imunização passiva via vacinação das porcas.

5.3 *Clostridium difficile*

Em um total de 13 leitões que apresentaram edema de mesocólon, em diferentes graus, apenas seis foram positivos ao ELISA o que representa 46% dos leitões com a patologia macroscópica supracitada. Esses valores estão de acordo com Yaeger et al (2007) que confirmaram o baixo valor preditivo positivo (54%) entre a presença de edema de mesocólon e a presença de toxinas de *C. difficile*. Entretanto, neste mesmo estudo, Yaeger et al (2007) verificaram que quando se considerava apenas o edema de mesocólon de intensidade grave havia associação estatisticamente significativa com a presença de toxinas. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, já que todos os leitões que apresentaram intensidade acentuada da lesão macroscópica foram positivos ao ELISA. Dessa forma, a presença de edema de mesocólon grave pode ser um parâmetro importante para avaliações a campo. Por outro lado, a ausência de lesões macroscópicas é um indicativo de que o leitão será negativo ao ELISA, o que foi comprovado significativamente ($p=0,004$) neste estudo.

Dos 10 leitões que apresentaram ELISA positivo, cinco pertencentes ao grupo diarreicos e três aos controle, apresentaram alterações inflamatórias histológicas em diferentes graus. Tais resultados concordam com o estudo de Yaeger et al (2007) que verificaram a ocorrência de infiltrado inflamatório neutrofílico na lâmina própria como o resultado de maior valor preditivo positivo (76%) em relação à presença das toxinas. Isso ratifica, a importância

da associação da avaliação histopatológica a outros métodos diagnósticos.

Além dessas alterações inflamatórias, que representam as alterações histológicas mais comumente relatadas, Yaeger et al (2007) observaram que uma alteração comumente encontrada é a perda de células caliciformes e aumento de atividade mitótica nas criptas. Em nosso estudo também foi observada uma acentuada diminuição de células caliciformes no ceco e cólon de leitões que apresentavam alterações inflamatórias (Figura 6 b).

Em relação aos 6 leitões negativos ao ELISA, mas que apresentaram lesões histológicas, uma possível explicação é o fato das toxinas de *C. difficile* serem susceptíveis à desnaturação, o que diminui a sensibilidade do teste (Yaeger et al, 2002).

5.4 Rotavirus

Dentre os quatro leitões positivos ao PAGE para Rotavirus, apenas um não possuía lesões. Uma possível explicação para isto é que, para a maioria dos animais infectados, o pico de eliminação viral antecede os sinais clínicos (Alfieri et al, 2007). Dessa forma, partículas virais podem ser detectadas ao PAGE, antes mesmo que tenham ocorrido injúrias teciduais. Nossos resultados mostram uma frequência de 14,3% de positividade para Rotavirus entre os leitões diarreicos que foi diferente ($p = 0,048$) da ausência entre os não diarreicos. Assim, ser positivo ao PAGE indica estar associado com sinais clínicos de diarreia. Esse valor ultrapassa os 7,5% encontrado por Lippke (2008). Entretanto permanece muito próximo dos 13% encontrado por Yaeger (2007), em leitões que apresentavam diarreia.

Por outro lado, Gregori et al (2009) encontraram 29,9% de frequência de Rotavirus em 144 amostras fecais de leitões diarreicos, também utilizando o PAGE. Neste último trabalho não foi informada a idade dos leitões que fizeram parte desse estudo e, conforme Roehe et al (1989) os leitões são mais comumente acometidos por infecções por Rotavirus entre os 15 e 30 dias de idade. Dessa forma, a infecção precoce dos leitões pode ser um indicativo de baixa ingestão de colostro ou não eficiência vacinal. É importante ressaltar que a única vacina comercial disponível contra Rotavirus, inclui apenas os sorotipos G5 e G4, do grupo A. E os sorotipos mais frequentes em leitões, segundo estudo de Gregori et al (2009) no estado de São Paulo são o G5, G10, genótipos não definidos e o G6, nesta ordem. Além disso, estudos que demonstrem a eficácia e/ou ocorrência de proteção cruzada desta vacina ainda são raros.

5.5 *Isospora suis*

A baixa frequência de *I. suis* constatada nesta pesquisa está de acordo com a grande maioria dos trabalhos envolvendo este agente, os quais afirmam ser a segunda e terceira semanas de idade o período de maior frequência deste parasita (Martineau e Castillo, 2000; Karamon et al, 2007). Em um estudo retrospectivo de Yaeger (2007), foi avaliado um total de 77 leitões com até 7 dias de idade e histórico de diarreia e não foi diagnosticado nenhum caso de coccidiose.

5.6 Coinfecção

C. perfringens tipo A foi um dos agentes envolvidos em todos os casos de infecções mistas e isto não é uma surpresa, uma vez que ele foi o agente mais frequente entre os avaliados e é um

habitante normal da microbiota entérica do leitão.

Outros enteropatógenos não foram diretamente incluídos em nossa pesquisa. Entretanto, com a utilização da histopatologia, qualquer alteração histológica que não estivesse associada a algum dos patógenos inicialmente esperados seria registrada. Não foi observado qualquer achado histopatológico que pudesse ser associado a outros agentes não incluídos neste trabalho. Entre estes agentes incluem *Enterococcus* sp, *Cryptosporidium* sp. e o Calicivírus. Para *Enterococcus* sp. seria encontrada uma grande quantidade de cocos aderidos à superfície dos enterócitos (Vacanneyt et al, 2001), o que não foi evidenciado. No caso de *Cryptosporidium* sp., poderia ser visualizada a presença de microorganismos aderidos a enterócitos da mucosa do íleo. Para o Calicivírus é observada atrofia de vilosidades principalmente em animais entre 22 a 28 dias de idade, quando há uma queda da imunidade passiva (Barry et al, 2007).

6.0 CONCLUSÕES

Os agentes *Clostridium perfringens* tipo A e *C. difficile* foram os enteropatógenos mais frequentemente diagnosticados. Isso demonstra a necessidade de outros estudos para compreender melhor a importância destes agentes. Por outro lado, entre os agentes avaliados, *C. perfringens* tipo C não foi detectado em nenhum leitão avaliado.

O Rotavírus foi diagnosticado apenas entre os leitões diarreicos e com diferença significativa para os não diarreicos. Esse resultado nos desperta para maiores considerações em relação a este agente.

A marcante perda de células caliciformes foi uma alteração histológica frequentemente associada às lesões causadas pelas toxinas de *C. difficile*.

A associação da histopatologia aos métodos diagnósticos utilizados conferiu maior segurança em relação aos resultados obtidos.

A ocorrência de um grande número de leitões diarreicos em que não foi encontrada nenhuma associação com os agentes pesquisados sugere a necessidade de pesquisas mais aprofundadas a fim de descobrir suas etiologias.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W.R.; KRAFT, L.M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, v.141, p.359-360, 1963.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. p.775-805.

ANDERSON, M.A.; SONGER, J.G. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B. in swine. *Veterinary Microbiology*, v.128, p.204-206, 2008.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.09.022

BACH, U.; KALTHOFF, V.; MUNDT, H.C.; POPP, A.; RINKE, M.; DAUGSCHIES, A.; LÜTTGE, B. Parasitological and morphological findings in porcine isosporosis after treatment with symmetrical

triazintriones. *Parasitology Research*, v.91, p.27-33, 2003.

DOI: 10.1007/s00436-003-0828-3

BALL, J.M.; TIAN, P.; ZENG, C.Q.-Y.; MORRIS, A.P.; ESTES, M.K. Age dependent diarrhea induced by a rotavirus nonstructural glycoprotein. *Science*, v.272, p.101-104, 1996.

BARBOSA, E.F. *Vírus intestinais RNA de fita dupla em frangos de corte no sudoeste catarinense: isolamento, caracterização e biologia molecular*. 1994. 113p. Tese (Doutorado em Ciência Animal: Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BARBOSA, E. F.; FIGUEIREDO, H.C.P.; GARCIA, A.M.; LOBATO, Z.I.P.; LAGE, A.P. Rotavírus do grupo A em bezerros lactentes no estado de Minas Gerais. *Ciência Rural*, v.28, n.3, p.435-439, 1998.

BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; FERONATO, C.; GRIEDER, W.; ALFIERI, A.A. Frequency of porcine enteric calicivirus infection in Brazilian pig herds. In: *Anais do XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*, 2007. Florianópolis. p.325-327, 2007.

BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*, v.100, p.11-16, 2004. DOI: 10.1016/S0378-1135(03)00126-3

BORRIELLO, S.P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of*

Antimicrobial Chemotherapy, v.41, suppl.C, p.13-19, 1998.

BUESCHEL, D.M.; JOST, B.H.; BILLINGTON, S.J.; TRINH, H.T.; SONGER, J.G. Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Veterinary Microbiology*, v.94, p.121-129, 2003. DOI: 10.1016/S0378-1135(03)00081-6

COLLINS, J.E.; BERGELAND, M.E.; BOULEY, D.; DUCOMMUN, A.L.; FRANCIS, D.H.; YESKE, P. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic and Infection*, v.1, p.351-353, 1989.

COLLINS, P.J.; MARTELLA, V.; O'SHEA, H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, p.2973-2979, 2008. DOI: 10.1128/JCM.00809-08

COSTA, G.M.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; SANTOS, J.L.; UZAL, F.A. Diarréia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.3, p.401-404, 2004.

COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; SPRICIGO, D.A.; WITT, N.M.; MARCHIORO, S.b.; KOLLING, L.; VARGAS, A.P.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, n.1, p.5-8, 2006.

- CZANDERLOVA, L.; HLOZEK, P.; CHMELAR, D.; LANY, P. *Clostridium perfringens* in suckling piglets with diarrhoea and its PCR typing and prevalence in the Czech Republic in 2001-2003. *Veterinarni Medicina*, v.51, p.461-467, 2006.
- DAUGSCHIES, A.; BIALEK, R.; JOACHIM, A.; MUNDT, H.C.; Autofluorescence microscopy for the detection of nematode eggs, and protozoa, in particular *Isospora suis*, in swine faeces. *Parasitology Research*, v.87, p.409-412, 2001.
DOI: 10.1007/s004360100378
- DAUGSCHIES, A.; IMAROM, S.; GANTER, M.; BOLLWAHN, W. Prevalence of *Eimeria* spp. in sows at piglet-producing farms in Germany. *Journal of Veterinary Medicine B*. v.51, p.135-139, 2004. DOI: 10.1111/j.1439-0450.2004.00734.x
- DEBROY, C.; MADDOX, C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of Veterinary significance. *Animal Health Research Reviews*, v.1, n.2, p.129-140, 2001.
DOI: 10.1079/AHRR200131
- DUBREUIL, J.D. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiology Letters*, v.278, p.137-145, 2008.
DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00967.x
- EL-ATTAR, L.; OLIVER, S.L.; MACHIE, A.; CHARPILLENNE, A.; PONCET, D.; COHEN, J.; BRIDGER, J.C. Comparison of the efficacy of rotavirus VLP vaccines to a live homologous rotavirus vaccine in a pig model of rotavirus disease. *Vaccine*, v.27, p.3201-3208, 2009. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.03.043
- FANG, Y.; NGELEKA, M.; MIDDLETON, D.M.; SIMKO, E. Isolation and identification of AIDA-I receptors in porcine intestinal mucus. *Veterinary Microbiology*, v.126, p.345-355, 2008. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.07.017
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E.; MARCELLINO, R.; UZAL, F. *Clostridium perfringens* type A toxin production in 3 commonly used culture media. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation*, v.19, p.184-196, 2007.
- FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *Journal of Swine Health and Production*, v.10, p.171-175, 2002.
- GARCIA, S.K.; CARVALHO, J.; OLIVEIRA, T.M.L. Suinocultura mineira (I): Distribuição e tamanho dos plantéis nos pólos regionais em 2004. In: *Anais do XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*, 2005. Fortaleza. p.541-542, 2005a.
- GARCIA, S.K.; CARVALHO, J.; PORTO, T.; OLIVEIRA, T.M.L.; GIOVANINI, R.R.; BAREZANI, M.L.; BRAGA, C.S.R. Suinocultura mineira (II): Variações no crescimento do plantel de 1995 a 2004. In: *Anais do XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*, 2005. Fortaleza. p.543-544, 2005b.
- GARCIA, S.K.; CARVALHO, J.; OLIVEIRA, T.M.L. Suinocultura mineira (III): Densidade de suínos nos pólos regionais. In: *Anais do XII Congresso Brasileiro de Veterinários*

Especialistas em Suínos, 2005. Fortaleza. p.545-546, 2005c.

GIBERT, M.; JOLIVET-RENAUD, C.; POPOFF, M.R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, v.203, p.65-73, 1997.

GREENBERG, H.; ESTES, M.K. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology*, v. 136, p.1939-1951, 2009. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.076

GREGORI, F.; ROSALES, C.A.R.; BRANDÃO, P.E.; SOARES, R.M; JEREZ, J.A. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.9, p.707-712, 2009.

GUALDI, V.; VEZZOLI, F.; LUINI, M.; NISOLI, L. The role of *Isospora suis* in the ethiology of diarrhoea in suckling piglets. *Parasitology Research*, v.90, p.163-165, 2003. DOI: 10.1007/s00436-003-0928-0

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C.L.;

PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. *Pathogenesis in Bacterial Infections in Animals*. Ames: Blackwell Publishing, 2004. p.193-223.

HALL, I.C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *American Journal of Diseases of Children*, v.49, p.390-402, 1935.

HAMMER, J.M.; FUHRMAN, >; WALZ, M. Serological evaluation of a *Clostridium perfringens* type A toxoid in a commercial swine herd. *Journal of*

Swine Health and Production, v.16,n.1, p.37-40, 2008.

HARVEY, R.B.; ANDERSON, R.C.; GENOVESE, K.J.; CALLAWAY, T.R.; NISBET, D.J. Use of competitive exclusion to control enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* in weaned pigs. *American Society of Animal Science*, v.83, p.44-47, 2005.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, v.16, p.473-477, 1982.

HOFFMANN, R.P. *Diagnóstico de Parasitismo Veterinário*. Porto Alegre: Editora Sulina, 1987. 156p.

HULST, M.; KERSTENS, H.; WIT, A.; SMITS, M.; MEULEN, J.V.; NIEWOLD, T. Early transcriptional response in the jejunum of germ-free piglets after oral infection with virulent rotavirus. *Archives of Virology*, v.153, p.1311-1322, 2008. DOI: 10.1007/s00705-008-0118-6

HYSER, J.M.; ESTES, M.K. Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Current Opinion in Gastroenterology*, v.25, n.1, p.36-43, 2008. DOI: 10.1097/MOG.0b013e328317c897

JENNINGS, A.R. Gastro-enteritis in the pig. *The Veterinary Record*, v.71, n.36, p. 766-771, 1959.

JOACHIM, A.; RUTTKOWSKI, B.; ZIMMERMANN, M.; DAUGSCHIES, A.; MUNDT, H.C. Detection of *Isospora suis* in piglet faeces – comparison of microscopy and PCR. *Journal of*

Veterinary Medicine B. V.51, p. 140-142, 2004.

DOI:10.1111/j.1439-0450.2004.00736.x

JONES, M.A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. *The Veterinary Record*, v.112, n.11, p.253, 1983.

JUNG, K.; HA, S-K.; CHUNG, H-K.; KIM, J.; CHO, W-S.; CHOI, C.; CHAE, C.; Archival PCR-based diagnosis of *Clostridium difficile* in piglets. *The Veterinary Record* (Short Communications), v.153, p.466-467, 2003.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, p.123-140, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro818

KARAMON, J.; ZIOMKO, I.; CENCEK, T. Prevalence of *Isospora suis* and *Eimeria* spp. in suckling piglets and sows in Poland. *Veterinary Parasitology*, v.147, p.171-175, 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.03.029

KEEL, M.K.; SONGER, J.G. The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Veterinary Pathology*, v.43, p.225-240, 2006. DOI: 10.1354/vp.43-3-225

KISS, D.; BILKEI, G. A new periparturient disease in Eastern Europe, *Clostridium difficile* causes postparturient sow losses. *Theriogenology*, v.63, p. 17-23, 2005. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.02.020

KLAASEN, H.L.B.M.; MOLKENBOER, M.J.C.H.; BAKKER, J.; MISEREZ, R.; HÄNI, H.; FREY, J.;

POPOFF, M.R.; BOSCH, J.F.V.D. Detection of the $\beta 2$ toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.24, p.325-332, 1999.

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, v.227, p. 680-685, 1970.

LANGKÆR, M.; ROEPSTORFF, A. Survival of *Isospora suis* oocysts under controlled environmental conditions. *Veterinary Parasitology*, v. 152, p.186-193, 2008. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.01.006

LI, Z.; BAKER, M.L.; JIANG, W.; ESTES, M.K.; PRASAD, V.V. Rotavirus Architecture at Subnanometer Resolution. *Journal of Virology*, v.83, n.4, p.1754-1766, 2009. DOI: 10.1128/JVI.01855-08

LIPPKE, R.T. *Estudo caso controle avaliando a frequência dos principais agentes potencialmente causadores de diarréia neonatal em suínos*, 2008. 70p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LUNA, L.G. Routine Staining Procedures. In: Luna, L. G. (Ed). *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw- Hill Book Co, 1968.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection*, v.3, p.1145-1156, 2001.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P.; RISTOW, L.E.; REIS, A.; GUEDES, R.M.C.. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, 1117-1123, 2007.

MACPHERSON, A.J.; HUNZIKER, L.; McCOY, K.; LAMARRE, A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and Infection*, p. 1021-1035, 2001.

MAES, P.; MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; RANST, M.V. Rota C: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiology*, v.9, p.238, 2009. DOI: 10.1186/1471-2180-9-238

MAHIDA, Y.R.; MAKH, S.; HYDE, S.; GRAY, T.; BORRIELLO, S.P. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut: An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.38, p.337-347, 1996.

MARKOWSKA-DANIEL, I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSAK, Z. Evaluation of different methods (Elisa, If, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.19, n.3, p.219-232, 1996.

MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; GRECO, G.; TEMPESTA, M.

FERRARI, M.; LOSIO, M.N.; BUONAVOGLIA, C. Genomis characterization of porcine rotaviruses in Italy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.8, p. 129-132, 2001.

DOI: 10.1128/CDLI.8.1.129-132.2001

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A.L.; DECARO, N.; CAMERO, M.; BOZZO, G.; MOSCHIDOU, P.; ARISTA, S.; PEZZOTTI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Veterinary Microbiology*, v.123, p.26-33, 2007. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.03.003

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, (Article in Press) 2009. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.08.028 .

MARTINEAU, G.P.; CASTILLO, J. Epidemiological, clinical and control investigations on field porcine coccidiosis: clinical, epidemiological and parasitological paradigms? *Parasitology Research*, v.86, p.834-837, 2000.

MARTINS, M.F.; NILCE, M.M.R.; Ferreira, A.; BROCCHI, M.; Yano, T.; CASTRO, A.F.P.; SILVEIRA, W.D. Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.76, p.51-59, 2000.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de

resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. *Ciência Rural*, v.38, n.6, p.1687-1693, 2008.

McCLANE, B.A. The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxina and epithelial tight junctions. *Toxicon*, v.39, p.1781-1791, 2001.

MICLARD, J.; JÄGGI, M.; SUTTER, E.; WYDER, M.; GABSCHEID, B.; POSTHAUS, H. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Veterinary Microbiology*, v.137, p.320-325, 2009. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.01.025

MOORE, R.; POTHOUKAKIS, C.; LAMONT, J.T.; CARLSON, S.; MADARA, J.L. *C. difficile* toxin A increases intestinal permeability and induces Cl⁻ secretion. *American Physiological Society*. p.165-172, 1990.

MUNDT, H.C.; COHNEN, A.; DAUGSCHIES, A.; JOACHIM, A.; PROSL, H.; SCHMÄSCHKE, R.; WESTPHAL, B. Occurrence of *Isospora suis* in Germany, Switzerland and Austria. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.52, p.93-97, 2005. DOI:10.1111/j.1439-0450.2005.00824.x

MUNDT, H.C.; JOACHIM, A.; BECKA, M.; DAUGSCHIES, A. *Isospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. *Parasitology Research*, v.98, p.167-175, 2006. DOI: 10.1007/s00436-005-0030-x

MUNDT, H.C.; MUNDT-WÜSTENBERG, S.; DAUGSCHIES, A.; JOACHIM, A.; Efficacy of various anticoccidials against experimental

porcine neonatal isosporosis. *Parasitology Research*, v.100, p.401-411, 2007. DOI: 10.1007/s00436-006-0314-9

MUNDT, H.C.; DITTMAR, K.; DAUGSCHIES, A.; GRZONKA, E.; BANGOURA, B. Study of the comparative efficacy of Toltrazuril and Diclazuril against ovine coccidiosis in housed lambs. *Parasitology Research*, v.105, p.141-150, 2009. DOI: 10.1007/s00436-009-1505-y

NAGY, J.; BILKEI, G. Neonatal piglet losses associated with *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* infection in a Slovakian outdoor production unit. *The Veterinary Journal*, v.166, p.98-100, 2003.

NATARO, K.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiological Reviews*, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NIESTRATH, M.; TAKLA, M.; JOACHIM, A.; DAUGSCHIES, A. The role of *Isospora suis* as a pathogen in conventional piglet production in Germany. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.49, p.176-180, 2002. DOI:10.1111/j.1439-450.2005.00824.xb

PAUL, P.S.; STEVENSON, G.W. Rotavirus and Reovirus. In: *Diseases of Swine*. 8 ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. v.1, cap. 21, p. 255-267.

PENATTI, M.P.A.; SILVA, A.S.; VALADARES, G.F.; LEITE, D.S. Occurrence of F42 colonization factor in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.1, p.31-33, 2005.

- POST, K.W.; JOST, B.H.; SONGER, J.G. Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.14, p.258-259, 2002.
- POXTON, I.R.; MCCOUBREY, J.; BLAIR, G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection*, v.7, n.8, p.421-427, 2001.
- RAMOS, A.P.D.; STEFANELLI, C.C.; LINHARES, R.E.C.; BRITO, B.G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; LIMA, R.C.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. *Veterinary Microbiology*, v. 71, p.1-8, 2000.
- REBOUÇAS, M.M.; OLIVEIRA, S.; FILHA, E.S.; SANTOS, S.M.; AMARAL, V. *Isospora suis* em suínos no estado de São Paulo – Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.2, p.137-140, 1992.
- ROEHE, P.M. et al. Rotavirus em suínos na região sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n.9, p. 45-49, abr. 1989.
- RUIZ, M.C.; COHEN, J.; MICHELANGELI, F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium*, v.28, n.3, p.137-149, 2000.
- SAIF, L.J.; BOHL, E.H.; THEIL, K.W.; CROSS, R.F.; HOUSE, J.A.. Rotavirus-Like, Calicivirus-Like, and 23-nm Virus-Like Particles Associated with Diarrhea in Young Pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, v.12, p.105-111, 1980.
DOI:0095-1137/80/07-0105/07\$02.00/0
- SALYERS, A.A.; WHITT, D. *Bacterial Pathogenesis – a molecular approach*. 2.ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1994, 560p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 309p.
- SANZ, M.G.; VENTURINI, L.; ASSIS, R.A.; UZAL, F.; RISSO, M.A.; IDIART, J.R.; PERFUMO, C.J. Fibrinonecrotic enteritis of piglets in a commercial farm: a postmortem study of the prevalence and the role of lesion associated agents *Isospora suis* and *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, v.27, n.7, p.297-300, 2007.
- SAYEED, S.; UZAL, F.A.; FISHER, D.J. SAPUTO, J.; VIDAL, J.E.; CHEN, Y.; GUPTA, P.; ROOD, J.I.; McCLANE, B.A. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Molecular Microbiology*, v.67, n.1, p.15-30, 2008.
DOI:10.1111/j.1365-2958.2007.06007.x
- SCALA, A.; DEMONTIS, F.; VARCASIA, A.; PIPIA, A.P.; POGLAYEN, G.; FERRARI, N.; GENCHI, M. Toltrazuril and sulphonamide treatment against naturally *Isospora suis* infected suckling piglets: Is there an actual profit? *Veterinary Parasitology*, v.163, p.362-365, 2009.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.04.028
- SCHAETTI, C. Vaccines for enteric diseases: update on recent developments. *Expert Review of Vaccines*, v.8, p.1653-1655, 2009.

- SCHWARTZ, K.J. *Clostridium*-associated diseases in swine. *American Associate of Swine Veterinarians*, p.415-421, 2009.
- SHATURSKY, O.; BAYLES, R.; ROGERS, M.; JOST, B. H.; SONGER, J. G. e TWETEN, R. K. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infection and Immunity*, v.68, p.5546-5551, 2000.
- SHERRY, B. Rotavirus and Reovirus Modulation of the Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v.29, n.9, p. 559-567, 2009. DOI: 10.1089/jir.2009.0072
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.S.N. Doenças dos Suínos. Goiânia: Cânone Editorial, 2007. 770p.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v.9, n.2, p.216-234, 1996.
- SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*, v.5, n.4, p.156-161, 1997.
- SONGER, J.G.; GLOCK, R..D. Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. *Swine Health and Production*, v.6, n.5, p.223-225, 1998.
- SONGER, J.G.; POST, K.W.; LARSON, D.J.; JOST, B.H.; GLOCK, R.D. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health and Production*, v.8, n.4, p.185-189, 2000.
- SONGER, J.G. Enteric Clostridia. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Ames: Blackwell Publishing, 2004. p.131-142.
- SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary diagnostic Investigation*, v.17, p.528-536, 2005.
- SONGER, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, (Article in Press), 2009. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.07.003
- SOTIRAKI, S.; ROEPSTORFF, A.; NIELSEN, J.P.; MADDOX-HYTTEL, C.; ENØE, C.; BOES, J.; MURREL, K.D.; THAMSBORG, S.M. Population dynamics and intra-litter transmission patterns of *Isospora suis* in suckling piglets under on-farm conditions. *Parasitology*, v.135, p.395-405, 2008. DOI: 10.1017/S0031182007003952
- STUART, B.P.; GOSSER, H.S.; ALLEN, C.B.; BEDELL, D.M. Coccidiosis in swine: dose and age response to *Isospora suis*. *Can. J. comp. Med.*, v.46, p.317-320, 1982.
- SPRINGER, S.; SELBITZ, H.J. The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.24, p.333-336, 1999.
- THEIL, K.W.; McCLOSKEY, C.M.; SAIF, L.J.; REDMAN, D.R.; BOHL, E.H.; HANCOCK, D.D.; KOHLER, E.M.; MOORHEAD, P.D. Rapid, Simple Method of Preparing Rotaviral Double-Stranded Ribonucleic Acid for Analysis by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of clinical Microbiology*, v.14, n.3, p.273-280, 1981.

- TWETEN, R.K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, v.82, p.1-9, 2001.
- UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.; BLACKALL, L.L.; KELLY, W.R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.339-344, 1997.
- VANCANNEYT, M.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; BAELE, M.; HAESBROUCK, F.; DEVRIESE, L.A. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.393-400, 2001.
- VIEIRA, A.A.S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arq.Inst. Biol.*, v.75, p.513-516, 2008.
- WASINSKI, B. Contribution of *Clostridium perfringens* type A with $\beta 2$ toxin gene in aetiology of porcine enteric diseases. *Bull Vet Inst Pulawy*, v.51, p.509-513, 2007.
- WEESE, J.S.; STAEMPFLI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Isolation of environmental *Clostridium difficile* from a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.12, p.449-452, 2000.
- WIELER, L.H.; ILIEFF, A.; HERBST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLÖS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of Enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.48, p.151-159, 2001.
- YAEGER, M.J.; FUNK, N.; HOFFMAN, L. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 14, p. 281-287, 2002.
- YAEGER, M.J. Prospective and retrospective studies on *Clostridium perfringens* type A enteritis in neonatal swine. *American Associate of Swine Veterinarians*, p.101-103, 2007.
- YAEGER, M.J.; KINYON, J.M.; SONGER, J.G. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 19, p.52-59, 2007.
- ZAMAN, K. Rotavirus vaccine: a promise for the future. *Journal of Health Population and Nutrition*, v.4, p.385-387, 2008.
- ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIR, D.; BARCELLOS, D.E.S.N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, p.81-86, 2008.

ANEXO 1

Distribuição e tamanho dos plantéis mineiros divididos em mesoregiões, em 2008.

Estratos (nº de matrizes)	Granjas MG	Matrizes- MG (CC e UPL)	Nº de matrizes / granja (CC e UPL) média	Nº de matrizes por mesorregião (CC e UPL)				
	nº	nº		ZM	TAP	MBH	SSO	Outras
A (1 a 25)	469	4.673	9,96	753	803	752	1.022	1.061
B (26 a 50)	206	7.754	37,64	1.157	856	1.520	2.128	1.538
C (51 a 100)	155	11.684	75,38	2.692	834	1.917	3.394	1.716
D (101 a 500)	210	51.883	247,06	14.474	7.889	9.248	8.482	7.137
E (> 500)	102	148.667	1.457,52	38.912	68.749	12.478	4.695	14.553
Terminadores	322	0						
Total	1464 ^a	224.661	196,73 ^b	57.988	79.131	25.915	19.721	26.005

^a Três Centrais de Inseminação Artificial; ^b Sem os terminadores.

ZM: Zona da Mata; **TAP:** Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba; **MBH:** Zona Metropolitana de Belo Horizonte; **SSO:** Sul Sudoeste.

