

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“ESTUDO CASO CONTROLE AVALIANDO A FREQUÊNCIA DOS
PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DE DIARRÉIA NEONATAL EM
SUÍNOS”**

RICARDO TESCHE LIPPKE

PORTO ALEGRE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“ESTUDO CASO CONTROLE AVALIANDO A FREQUÊNCIA DOS PRINCIPAIS
AGENTES CAUSADORES DE DIARRÉIA NEONATAL EM SUÍNOS”

Autor: Ricardo Tesche Lippke

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Medicina Veterinária Preventiva -
Medicina de Suínos

Orientador: Prof. Dr. David Emilio
Santos Neves de Barcellos

PORTO ALEGRE

2008

Ricardo Tesche Lippke

“ESTUDO CASO CONTROLE AVALIANDO A FREQUÊNCIA DOS PRINCIPAIS
AGENTES CAUSADORES DE DIARRÉIA NEONATAL EM SUÍNOS”

Aprovado em 27 de fevereiro de 2008

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus queridos pais que SEMPRE me deram força, apoio psicológico, financeiro e uma bela educação para encarar as dificuldades desse mundo.

A minha noiva Deyse por ter vindo comigo para Porto Alegre e pelo incentivo, paciência, amizade e amor me proporcionado durante todos esses anos.

Aos produtores de suíno com o qual tive a oportunidade de trabalhar durante quase cinco anos da minha vida, por terem me ensinado que a parte prática conta muito nessa profissão.

Ao meu amigo Evandro Nottar que um belo dia me perguntou: “Por que você não faz um mestrado?”

Aos meus colegas e amigos do setor de suínos da UFRGS que me ajudaram no desenvolvimento de minhas idéias, na confecção e desenvolvimento de todos os passos da minha dissertação. Além disso, foram muito importantes no meu crescimento pessoal e profissional.

Às empresas onde coletei meus dados pela autorização e pelo reconhecimento da importância de se desenvolver uma pesquisa séria

A Dra Sandra Maria Borowski pela amizade e por realizar todos os diagnósticos bacteriológicos no CPVDF

A Dra Sandra Marques Tietz pela amizade e por realizar todos os diagnósticos de *Cryptosporidium* spp. além de me ajudar nos diagnósticos dos coccídeos

A Dra Suelen Osmarina Paesi da e sua equipe pela amizade e por realizarem todos os diagnósticos para o rotavírus

A Laura Lopes de Almeida pela amizade e grande ajuda na realização dos testes de ELISA para o *Clostridium difficile*

Ao Dr. Luiz Gustavo Corbellini pela paciência, amizade e por me ensinar e realizar os procedimentos de estatística.

Aos professores Fernando P. Bortolozzo, Ivo Wentz e Mari Lurdes Bernardi pela amizade e pela vivência desses dois anos aqui em Porto Alegre.

Ao professor David E. S. N. de Barcellos pela grande amizade, tolerância e pela confiança depositada em mim durante esses dois anos.

RESUMO

ESTUDO CASO CONTROLE AVALIANDO A FREQUÊNCIA DOS PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DE DIARRÉIA NEONATAL EM SUÍNOS.

Autor: Ricardo Tesche Lippke

Orientador: Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

A diarreia é o principal evento clínico observado no período neonatal em leitões (como consequência das doenças entéricas). Além de contribuir para piora no ganho de peso diário e conversão alimentar do animal causa aumento na mortalidade e gastos com medicamentos. O presente trabalho teve como objetivo determinar a frequência dos principais agentes virais (rotavírus), bacterianos (*E. coli*, *Clostridium perfringens* tipo A e C e *Clostridium difficile*) e parasitários (coccídeos e *Cryptosporidium* spp.) envolvidos na diarreia neonatal em leitegadas caso (com diarreia) e controle (sem diarreia). Foram examinadas 276 amostras de fezes provenientes de 147 leitegadas com diarreia e 129 leitegadas sem diarreia, com idade variando entre 1 e 7 dias de vida em 28 unidades produtoras de leitões localizados no Estado do Rio Grande do Sul. Entre as amostras coletadas, 29,34% (81/276) foram positivas para pelo menos um agente pesquisado. Os coccídeos (20/276) e o *C. perfringens* tipo A (19/276) foram os agentes mais frequentes. Nenhum dos enteropatógenos pesquisados obteve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as leitegadas caso e controle. Apenas o rotavírus ($p = 0,20$) e o *C. perfringens* tipo A ($p = 0,16$) apresentaram tendência de serem mais frequentes em leitegadas com diarreia. Uma forte associação foi observada entre a ocorrência das diarreias e leitegadas mais novas ($p < 0,014$). Foi observada pela primeira vez no Brasil a infecção pelo *C. difficile*, em 13,6% (17/132) das amostras, todavia a presença das toxinas nas fezes não teve relação com a diarreia. Os resultados obtidos indicam a necessidade de cuidados especiais quando da coleta de amostras para diagnósticos de monitoria de diarreias no período neonatal, pois é alta a chance de se obterem resultados falso positivos naqueles casos em que as doenças estiverem ocorrendo numa forma endêmica.

Palavras-chave: diarreia neonatal, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* tipo A

ABSTRACT**CASE-CONTROL STUDY EVALUATING THE FREQUENCY OF THE MAIN AGENTS OF NEONATAL DIARRHEA IN PIGS IN BRAZIL**

Author: Ricardo Tesche Lippke

Advisor: Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

*Diarrhea is the main clinical event occurring in pigs in the neonatal period, (as consequence of enteric disease). Besides contributing to losses in daily weight gain and feed conversion, diarrhea causes increased mortality and medication costs. The present work aimed to determine the frequency of the main viral agents (rotavirus), bacterial (*E. coli*, *Clostridium perfringens* type A and C and *Clostridium difficile*) and parasitic (coccidian and *Cryptosporidium* spp.) involved in neonatal diarrhea in case groups (with diarrhea) and controls (without diarrhea). We examined 276 fecal samples originating from 147 litters with diarrhea and 129 litters without diarrhea, with ages varying between 1 and 7 days, in 28 pig units of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Among the examined samples, 29.34% (81/276) were positive for at least one agent. *Coccidia* (20/276) and *C. perfringens* type A (19/276) were the most frequently isolated agents. None of the enteropathogens studied showed significant difference ($p > 0.05$) between case and control litters. Only rotavirus ($p = 0.20$) and *C. perfringens* A ($p = 0.16$) had a tendency to present higher frequency in piglets with diarrhea. A strong association was observed between occurrence of diarrhea and litters with smaller age ($p < 0,014$). Infection with *C. difficile* was diagnosed for the first time in Brazil, in 13.6% (17/132) samples; however the presence of the toxin in feces was not related to diarrhea. The present results suggest the need for special attention when sampling for the diagnosis or monitoring diarrhea in the neonatal period, as chances for obtaining false-positive results are high, especially when diseases are occurring endemically.*

Keywords: *neonatal diarrhea, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* type A*

LISTA DE TABELAS

Artigo

TABELA 1-	Freqüência dos principais agentes enteropatogênicos causadores de diarreia neonatal em 28 unidades produtoras de leitões localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.....	54
TABELA 2-	Freqüência dos principais agentes enteropatogênicos diagnosticados nas leitegadas caso ($n=147$) e controle ($n=129$) com idade entre 1 e 7 dias de vida no período de maio a setembro de 2007 em 28 unidades produtoras de leitões localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.....	54
TABELA 3-	Distribuição da freqüência dos agentes enteropatogênicos em relação à idade das leitegadas, provenientes de 28 unidades produtoras de leitões no Estado do Rio Grande do Sul no período de maio a setembro de 2007.....	55

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

QUADRO 1-	Estudos de prevalência publicados no Brasil entre 1980 e 2007 relacionados aos principais agentes infecciosos causadores das diarreias em leitões lactentes.....	37
-----------	--	----

Artigo

FIGURA 1-	Associação entre a frequência das diarreias e a idade nas leitegadas pesquisadas no período de maio a setembro de 2007, em 28 unidades produtoras de leitões localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.....	55
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

NAHMS	National Animal Health Monitoring System
GPD	Ganho de peso diário
EUA	Estados Unidos da América
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigência
PRRS	Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
CpA	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A
TGE	Gastrenterite transmissível dos suínos
CpC	<i>Clostridium perfringens</i> tipo C
ISUVDL	Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>cpβ2</i>	Gene codificador da toxina beta 2
<i>cpb</i>	Gene codificador da toxina beta
<i>cpa</i>	Gene codificador da toxina alfa
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
Cl ⁻	Íon cloro
Na ⁺	Íon sódio
K ⁺	Íon potássio
TNC	Teste de neutralização em camundongos
ELISA	Teste de ensaio imunoenzimático
NSP4	Non structural protein 4
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
RT-PCR	Real Time - PCR
AIDA	Autotransporter Adhesin Involved in Diffuse Adherence
LT	Toxina termolábil
ST	Toxina termoestável
HCO ₃	Bicarbonato
GMP	Guanosina monofosfato

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Diarréias neonatais em leitões.....	14
2.2. <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.....	15
2.3. <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	16
2.4. <i>Clostridium difficile</i>.....	19
2.5. Rotavírus.....	22
2.6. <i>Escherichia coli</i>.....	25
2.7. <i>Isospora suis</i> e <i>Eimeria</i> spp.	28
2.8. <i>Cryptosporidium</i> spp.	32
2.9. Diarréias nutricionais.....	35
2.9.1. Ingestão insuficiente de colostro	35
2.9.2. Excesso de ingestão de leite.....	36
2.10. Prevalência dos principais agentes causadores de diarréia em leitões lactentes no Brasil.....	36
3. ARTIGO1.....	38
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

Entre as atividades adotadas para maximizar a produção suinícola nas últimas décadas, sobressai uma substituição progressiva das criações extensivas por intensivas (confinadas). Esse processo trouxe consigo um aumento significativo na pressão de infecção e criou a necessidade da adoção de cuidados especiais para os suínos. As mudanças geraram também demanda crescente pela utilização de novas técnicas de manejo, que se executadas inadequadamente, podem propiciar a permanência e proliferação de diversos agentes patogênicos no interior das granjas (HANSEN-DECUADRO, 2006).

Dentro desse novo contexto, as doenças entéricas vêm ganhando grande importância, pois são multifatoriais e não dependem unicamente de microorganismos patogênicos, mas sim do efeito combinado do agente causal com diversos fatores de risco como manejo e ambiente inadequados, nutrição deficiente e baixo grau de imunidade do rebanho. As enfermidades que cursam com diarreia são de grande importância econômica já que apresentam efeito profundo no aumento da mortalidade, piora da conversão alimentar e redução do ganho de peso diário (GPD).

As diarreias nos suínos podem ser divididas em 4 classes, segundo a sua ocorrência nas diferentes faixas etárias (FAIRBROTHER, 1999):

diarreias neonatais, em leitões na primeira semana de vida;

diarreias em leitões lactentes, em leitões envolvendo todo o período pré desmame;

diarreias pós desmame, no período de creche e;

diarreias nas fases de recria e terminação, no período da saída da creche até o abate.

Diversos autores afirmam que as diarreias neonatais estão entre as principais causas de mortes de leitões lactentes, com índices que podem variar dependendo do manejo da granja, *status* imunológico do rebanho e do(s) agente(s) envolvido(s). Em levantamentos realizados pelo National Animal Health Monitoring System (NAHMS), no ano de 2000 e entre os anos de 2005 e 2006, englobando mais de 90% das granjas suinícolas dos Estados Unidos da América (EUA), a mortalidade pré-desmame de leitões foi de 8,2% e 9,3% respectivamente sendo a diarreia a terceira causa de morte mais freqüente (NAHMS, 2000; NAHMS, 2006).

Com relação à morbidade, Tubbs et al. (1993) em um estudo realizado com 712 granjas nos EUA, observaram que a diarreia foi a principal causa de doença em leitões na maternidade, sendo que 65% de todos os casos ocorreram na primeira semana de vida e, desses, 42% ocorreram nos primeiros três dias.

Diversos estudos foram realizados em vários países diferentes, tendo como objetivo determinar quais os principais agentes envolvidos na diarreia neonatal. Esses dados devem ser examinados com cautela, pois muitas vezes as amostras de fezes utilizadas não sofreram um processo de amostragem adequado, representando apenas a investigação de um problema pontual de diarreia em determinados rebanhos. Outras investigações concentraram-se na busca de apenas um agente, trazendo uma falta de informação sobre associações de agentes ou até mesmo falharam em determinar se o agente estudado era o verdadeiro responsável pela diarreia. Em alguns estudos, faltaram informações sobre a possível utilização de antimicrobianos, coccidiostáticos e/ou probióticos antes da coleta das amostras, sendo que uma interferência medicamentosa poderia afetar significativamente o resultado dos exames realizados. Ocasionalmente, em alguns trabalhos onde são realizadas necropsias e histopatologia além dos diagnósticos laboratoriais, as amostras podem ter sido insuficientes para determinar a real prevalência de cada agente envolvido. Finalmente, a grande maioria dos dados disponíveis sobre a prevalência dos agentes causadores de diarreias neonatais em nosso meio é escassa e se baseia em resultados de experimentos realizados há cinco ou mais anos, provavelmente não refletindo a situação epidemiológica atual.

Uma forma de verificar a real importância dos agentes patogênicos no desenvolvimento das diarreias seria a realização de estudos do tipo caso controle, que usam animais da mesma idade, provenientes da mesma granja, onde os “casos” são os leitões que apresentam diarreia e os “controles” são aqueles que não apresentam. Para relacionar com os agentes isolados, podem ser observados e coletados dados epidemiológicos, que permitem ampliar a abrangência das observações.

Nas últimas décadas, foram criados controles efetivos contra agentes específicos causadores de diarreia, como a utilização em escala comercial de vacinas contra a colibacilose neonatal (*Escherichia coli*) e enterotoxemia (*Clostridium perfringens* tipo C). Além disso, o desenvolvimento de antimicrobianos cada vez mais eficientes alterou profundamente a dinâmica da infecção com os principais agentes causadores de diarreias neonatais. Outros fatores que favoreceram o controle das diarreias foram a adoção de programas adequados de limpeza e desinfecção, a utilização correta do

sistema *all in all out* e a substituição de pisos compactos, que acumulam muita umidade, por pisos vazados e suspensos, que facilitam a limpeza e evitam o contato dos leitões com as fezes (BARCELLOS, 2008).

Segundo Yaeger *et al.* (2002), vem sendo observada nos últimos 12 anos, nos EUA uma mudança na frequência dos principais agentes causadores de diarreia neonatal. Há alguns anos, o coronavírus (TGE), a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e o *C. perfringens* tipo C eram diagnosticados como os principais agentes envolvidos nessas diarreias. Na atualidade, esses agentes apresentam baixa importância, dando lugar a organismos emergentes como é o caso do *Clostridium difficile*, *C. perfringens* tipo A e o vírus da PRRS.

As diarreias neonatais, muitas vezes, não estão associadas a apenas um único agente patogênico, seja viral, bacteriano ou parasitário. Trabalhos com o objetivo de determinar a prevalência dos principais organismos envolvidos nessas diarreias demonstram, muitas vezes, a participação de mais de um agente no desencadeamento das diarreias, podendo chegar, em alguns casos, a 35,2% de associações (JONHSON *et al.*, 1992).

O trabalho desenvolvido teve o objetivo de avaliar a frequência dos principais agentes bacterianos, virais e parasitários envolvidos na diarreia neonatal em UPL's comerciais do Estado do Rio Grande do Sul, utilizando um estudo do tipo caso-controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diarréias neonatais em leitões

As diarréias neonatais e em leitões lactentes, na maioria das granjas, tendem a se repetir semanalmente a cada lote parido, causando perdas e gerando altos custos devido à redução do ganho de peso diário e utilização de medicações (WILSON, 2000). Elas apresentam diversas causas, sendo freqüente a presença de mais de um agente causal, na experiência de diversos autores: Fitzgerald (1988) em 26,3% das amostras; Driesen *et al.* (1993) em 19,1% das amostras; Calderaro *et al.* (2001) em 16,2% das amostras e Katsuda *et al.* (2006) em 22,2% das amostras. A ocorrência de diarréias com etiologias múltiplas é mais comum no período pós desmame do que durante o aleitamento (42% e 26% respectivamente, no levantamento de Fitzgerald *et al.*, 1988).

Os principais agentes causadores de diarréia neonatal podem ser divididos em: virais (rotavírus e coronavírus), bacterianos (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* tipo A e C e o *Clostridium difficile*) e parasitários (*Isospora suis*, *Eimeria* sp. e *Cryptosporidium spp.*). Já foram descritos como causadores de diarréia neonatais outros agentes com menor importância, como o Calicivírus (GUO *et al.*, 2001), Picobirnavírus (TREVISOL *et al.*, 1991; TREVISOL & ROEHE, 1993), vírus da PRRS (YAEGER *et al.*, 2002), *Strongyloides ransomi* (NISHI *et al.*, 2000) e *Enterococcus durans* (YAEGER *et al.*, 2002). Alguns desses agentes infectam e causam diarréia preferencialmente na primeira semana de vida dos leitões, já outros, durante toda a fase de maternidade. Existe ainda maior prevalência de determinados agentes dependendo da época do ano. Por exemplo, o coronavírus, causador da gastroenterite transmissível viral (TGE) é encontrado o ano inteiro, mas apresenta maior prevalência no outono. Já a *Escherichia coli* e a *Isospora suis* têm maior prevalência no verão. Alfieri *et al.* (1995) não encontraram relação entre a prevalência da infecção por rotavírus e a sazonalidade.

A seguir, será apresentada uma revisão sobre os principais agentes causadores de diarréia neonatal em suínos.

2.2 *Clostridium perfringens* tipo A

O *Clostridium perfringens* tipo A (CpA) é um bacilo Gram-positivo, formador de esporos, pertencente a microbiota normal do trato intestinal do suíno e que diferencia do *Clostridium perfringens* tipo C por não produzir a toxina beta. O agente pode causar diarreia neonatal em leitões, principalmente naqueles com 1 a 4 dias de vida (YAEGER, 2007). A diarreia já foi descrita na fase de creche, mas ocorre com menor severidade nesta fase (JESTIN et al., 1985; MARTINEAU et al., 1995). A contaminação dos leitões se dá logo após o nascimento e a principal fonte de infecção são os esporos do CpA presentes no ambiente (HOLMGREN et al., 2006). A enfermidade está distribuída mundialmente e, segundo Baker (2006), há aumento de 1,12% na mortalidade de maternidade pela presença de diarreia pelo CpA. Estudos da prevalência desse agente em leitões com diarreia são escassos. Yaeger (2007) relata que o principal agente causador de diarreia neonatal diagnosticado pelo Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory (ISU VDL) entre os meses de março de 2005 e março de 2006 foi o CpA, compreendendo 48% das amostras (131/273). No Brasil existem apenas 2 publicações tratando de surtos isolados de enterite pelo CpA, uma em São Paulo (MORENO et al., 2003) e outra em Minas Gerais (COSTA et al., 2004).

A patogenia da infecção pelo CpA é pouco conhecida. A bactéria produz uma toxina denominada “alfa” que, segundo Songer & Glock (1998), tem sua atividade biológica desconhecida e, provavelmente, não seja a verdadeira responsável por lesões e acúmulo de líquidos no trato intestinal. Durante alguns anos especulou-se que a enterotoxina produzida por todos os tipos de *C. perfringens*, inclusive o CpA, seria o principal fator de virulência para a diarreia neonatal em leitões. Entretanto, estudos mais recentes demonstraram que essa toxina é raramente encontrada nos casos de enterite causada pelo CpA (BUESCHEL et al., 2003; GUEDES et al., 2006a)

Atualmente uma toxina denominada “beta 2” tem sido sugerida como sendo a principal responsável pela diarreia causada pelo CpA (HAMMER et al., 2007). Diversos autores observaram que existe associação entre a produção da toxina beta 2 por algumas cepas de CpA e enfermidades entéricas em animais domésticos, particularmente leitões (KLASSEN et al., 1999; GARMONY et al., 2000). Bueschel et al. (2003) observaram que 90,9% das amostras de CpA provenientes de leitões com diarreia, possuíam o gene codificador da toxina beta 2 (*cpb2*) detectado através da técnica de PCR. Entretanto, 11,1% das amostras de CpA provenientes de fezes normais foram também positivas para o *cpb2*. A ligação com os enterócitos e a invasão do epitélio intestinal pela bactéria

parece ser incomum, sendo que a necrose do epitélio do intestino delgado que é observada quando da inoculação experimental com o agente, aparenta não ser freqüente nos casos de infecção natural. As poucas lesões macroscópicas e microscópicas presentes sugerem que, em alguns casos, a diarreia seja do tipo secretória (SONGER & UZAL, 2005; YAEGER, 2007).

Os sinais clínicos consistem em diarreia mucóide de caráter não hemorrágico. Macroscopicamente, observa-se edema e flacidez da parede intestinal, principalmente no jejuno e íleo, além de conteúdo amarelado no lúmen (COLLIN et al., 1989). A necrose da mucosa raramente ultrapassa a lâmina própria, em contraste com a infecção pelo *Clostridium perfringens* tipo C, que pode atingir até a camada muscular da mucosa.

O diagnóstico da diarreia causada pelo CpA é de difícil realização e baseia-se em alguns critérios:

- 1) identificação através da histopatologia de grande número de bacilos Gram-positivos em fragmentos do intestino delgado;
- 2) isolamento do CpA em ágar sangue ou em ágar seletivo;
- 3) genotipagem do isolado através da técnica de PCR com o objetivo de identificar os genes *cpa* e *cpb2* e;
- 4) exclusão de outros prováveis agentes causadores de diarreia neonatal (YAEGER, 2002).

Algumas vezes o CpA pode se apresentar em conjunto com outros patógenos, as associações mais comuns são com o rotavírus, *Clostridium difficile* e *Escherichia coli* (BAKER, 2006).

2.3 *Clostridium perfringens* tipo C

A doença causada pelo *Clostridium perfringens* tipo C (CpC) é também chamada de enterotoxemia. A infecção causa diarreia em leitões novos, geralmente com até três dias de idade, mas às vezes ocorre de forma muito precoce, afetando leitões com menos de 12 horas de vida. Raramente está presente em animais com mais de uma semana de idade. A bactéria é Gram-positiva anaeróbia e é encontrada em pequeno número no intestino delgado de animais saudáveis, proliferando e causando enfermidade apenas sob condições especiais (SONGER & UZAL, 2005).

A difusão do CpC de leitão para leitão ocorre em virtude dos esporos serem muito resistentes a condições adversas de ambiente como o calor, luz ultravioleta e a desinfetantes (SONGER & UZAL, 2005). A transmissão se dá logo após o nascimento

através do contato do leitão com esporos, geralmente presentes em piso não adequadamente limpo e desinfetado entre uma ocupação da cela parideira e a próxima ou pelo contato com fezes contendo o agente.

Uma vez estabelecida na granja, a enterotoxemia freqüentemente adquire um caráter endêmico. Em algumas regiões dos EUA a prevalência alcançou 25% dos leitões com até 5 dias de vida (HOEFLING, 1989). A morbidade apresenta grande variação podendo chegar a 85% e a letalidade em torno de 50%, podendo alcançar 100% dos animais acometidos. Em estudos de prevalência, Morin et al. (1983) constataram que 0,4 % das diarréias presentes em 749 animais de 1 a 15 dias tinha como causa o CpC. Já Yaeger et al. (2002) diagnosticaram que em 100 leitões que apresentavam diarréia com até 10 dias de vida, 2 % tinha o CpC como único agente. No Brasil, poucos trabalhos de prevalência incluíram esse agente no diagnóstico. Barcellos *et al.* (1980) e Calderaro *et al.* (2001) diagnosticaram o CpC em 1,12% e 0% das amostras, respectivamente.

A patogenia da infecção causada pelo CpC é baseada na produção da toxina beta, que, ao se ligar ao enterócito do intestino delgado, produz uma saída abundante de íons K^+ e entrada de Ca^{++} , Cl^- e Na^+ . Esse evento desencadeia a dilatação da célula, com posterior lise (NAGAHAMA et al., 2003). Posteriormente, a toxina amplia a sua lesão na mucosa intestinal, causando necrose e hemorragias em áreas mais profundas da parede intestinal.

As lesões são, na maioria das vezes, encontradas no intestino delgado, especialmente no jejuno e no íleo, raramente ocorrem no duodeno e intestino grosso (SONGER & GLOCK, 1998). Macroscopicamente, a mucosa do intestino delgado apresenta coloração vermelha escura, com acúmulo de gás na parede intestinal e mesentério, além de exsudato hemorrágico no lúmen.

As alterações microscópicas iniciam-se no ápice das vilosidades do jejuno, através da aderência da bactéria na borda epitelial da mucosa. Ocorre necrose das vilosidades e descamação de células epiteliais, com a presença de hemorragias. As áreas de necrose avançam em direção à submucosa e muscular da mucosa, seguido de invasão e esporulação de bactérias no lúmen intestinal (KUBO & WATASE, 1985; SONGER, 1996).

A enfermidade apresenta quatro formas de apresentação clínica e patológica de acordo com a severidade: superaguda, aguda, subaguda e crônica. As formas mais comuns são a superaguda e a aguda. A primeira é caracterizada por diarréia hemorrágica de consistência aquosa, com fragmentos necróticos e desidratação severa, sendo que os

sinais clínicos aparecem de 12 – 24 horas após o nascimento e a morte geralmente ocorre 24 horas após. É comum encontrar leitões mortos sem a presença de diarreia. Há extensa necrose hemorrágica na mucosa, submucosa e muscular do jejuno e íleo, com acúmulo de gás no tecido e presença de exsudato hemorrágico no lúmen intestinal.

A forma aguda acomete animais de 3 dias de vida sendo que as fezes apresentam-se líquidas com coloração hemorrágica, há o adelgaçamento da parede intestinal e a serosa pode apresentar-se inflamada, com presença de fibrina. A forma crônica é bem menos freqüente, acomete animais com 2 a 4 semanas de vida e as fezes apresentam coloração amarelada a esbranquiçada, sendo facilmente confundida com enterites virais e coccidiose (Mc KEAN, 1987).

O histórico, padrão de mortalidade e morbidade, sintomatologia clínica, lesões macroscópicas e microscópicas além da presença abundante do agente em impressões da mucosa com posterior coloração pelo método de Gram, geram informações suficientes para o diagnóstico presuntivo da enterite causada pelo CpC. O diagnóstico definitivo é baseado no isolamento bacteriano de amostras a partir do conteúdo intestinal. Seguindo o isolamento, provas bioquímicas e biológicas podem ser utilizadas para caracterizar fenotipicamente as amostras de CpC quanto à produção de suas toxinas. O teste de neutralização em camundongos (TNC) foi considerado o teste padrão para tipificação do *C. perfringens*, todavia apresenta diversas desvantagens como o tempo necessário (2–3 dias), a baixa disponibilidade de reagentes para o teste, o preço e a necessidade de usar animais vivos (GUEDES et al., 2006a)

A caracterização genotípica é feita através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR multiplex) que identifica os genes que codificam as toxinas do CpC. Quando comparada ao TNC, essa técnica é mais sensível e específica, além de ser mais rápida. Genes silenciosos codificadores dessas toxinas são raros (SONGER & UZAL, 2005) tornando o PCR uma técnica bastante confiável. No Brasil, raramente é feita a tipificação do CpC de isolados de leitões com diarreia, assumindo-se que os isolados obtidos de casos clínicos sejam do tipo C (VIEIRA et al., 2005). Guedes et al. (2006a) observaram que apenas 12,5% ($n=24$) dos isolados de *C. perfringens* provenientes de leitões com diarreia e submetidos à PCR multiplex confirmaram a presença do gene codificador da toxina beta.

A infecção pelo CpC pode ser prevenida através da vacinação das fêmeas com o toxóide produzido com a toxina beta, que geralmente é associado à *E. coli* na vacina que rotineiramente é usada nas granjas de suínos no Brasil. Esse manejo vem sendo

utilizado desde a década de 90 e pode ser uma das explicações para a baixa importância do agente no nosso meio como causador de diarreia neonatal. Até que a vacinação de todas as fêmeas seja concluída, existe a possibilidade do tratamento curativo de leitões recém nascidos com uma antitoxina produzida contra o CpC, principalmente em granjas que apresentarem surto de enterotoxemia pela primeira vez.

2.4 *Clostridium difficile*

O *Clostridium difficile* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia, oportunista e é encontrada no solo, água e trato intestinal de diversos mamíferos, aves e répteis (SONGER et al., 2000). É considerado um importante agente causador de enterites em humanos (colite pseudomembranosa), cobaias, hamsters, eqüinos, coelhos e suínos (YAEGER, 2007). O primeiro isolamento em suínos foi realizado em 2 leitões com 8 semanas de vida (JONES & HUNTER, 1983). A partir desse relato, diversos autores têm descrito surtos com diferentes mortalidades e morbidades em leitões neonatos (NAGY & BILKEI, 2003) e porcas (KISS & BILKEI, 2005). Todavia, é na primeira semana de vida do leitão onde o *C. difficile* é mais freqüentemente diagnosticado (YAEGER et al., 2002).

A diarreia causada pelo agente em suínos pode estar associada à utilização de antimicrobiano no início da vida do leitão, tanto na forma preventiva como curativa. Esse fator predisponente leva a um desequilíbrio da microbiota entérica e oportuniza a colonização, proliferação e produção de toxinas (MENIN et al., 2005). Em humanos, essa associação (agente + tratamento antimicrobiano) é bem conhecida, havendo uma forte relação entre a utilização prolongada de cefalosporinas, penicilinas de segunda geração (ampicilina e amoxicilina) e clindamicina na ocorrência da diarreia (YAGER et al., 2002). Diferente de outras espécies, no suíno a infecção é mais freqüente entre o 1º e 7º dias de vida. Os animais podem apresentar leve depressão, inapetência e diarreia pastosa à aquosa de coloração amarelada (SONGER et al., 2002). Waters et al. (1998) observaram que, além dos sintomas citados anteriormente, os leitões acometidos podem apresentar dispnéia, edema facial e escrotal e morte súbita. Nesses casos as toxinas provavelmente tenham atingido a via hematogênica. Segundo Songer et al. (2004) leitões infectados pelo *C. difficile* apresentam redução no peso ao desmame de até 15%. É uma doença freqüentemente confundida com outros problemas entéricos presentes nessa idade, como a colibacilose neonatal e rotavirose.

Dados de prevalência do agente são escassos em suínos, entretanto Yaeger et al. (2002) diagnosticaram a infecção pelo *C. difficile* em fezes diarréicas de 39% ($n = 100$) dos leitões com diarréia neonatal com idade média de 3 dias entre 2000 e 2001. Em um estudo retrospectivo, Yaeger (2007) observou que entre 2005 e 2006 a prevalência de diarréia neonatal causada pelo *C. difficile* foi de 10 % ($n=273$) das amostras submetidas a diagnóstico na Universidade de Iowa. Todavia essa prevalência entre 2006 e 2007 subiu para 48% ($n=77$). Segundo Glock et al. (2004), as enterites causadas pelo *Clostridium difficile* parecem ser mais comuns em leitões filhos de primíparas comparadas com fêmeas pluríparas. No Brasil, não há relatos na literatura da associação do agente com diarréia neonatal.

Considera-se que flagelo, cápsula e enzimas necrosantes participem da patogenia da infecção. No entanto, o principal fator de virulência são duas toxinas produzidas pelo agente: toxina “A”, uma enterotoxina que causa o aumento de fluídos no lúmen intestinal e a toxina “B”, uma citotoxina, que apresenta um alto poder citopático. As duas ligam-se aos enterócitos, sofrem endocitose e levam à perda da integridade estrutural da célula, causando a desorganização do citoesqueleto e lesões nas microvilosidades. Além disso, promovem o rompimento das junções intercelulares. Essas toxinas, devido o seu alto peso molecular, são potencialmente antigênicas e induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, recrutando grande número de polimorfonucleares para o local da infecção (VOTH & BALLARD, 2005).

Os leitões infectados geralmente apresentam edema de mesocólon e tiflocolite. Nota-se conteúdo amarelado que varia de pastoso a aquoso no lúmen do intestino grosso. Microscopicamente, observa-se desde esfoliação superficial das células epiteliais acompanhada de infiltrado neutrofílico na superfície da lâmina própria, até erosões focais ou extensas na mucosa, que se encontra coberta por exsudato que pode variar de fibrinosupurativo a fibrinonecrótico. Algumas vezes, ocorrem microerosões focais no cólon de onde extravasa um exsudato fibrinosupurativo, conferindo às lesões um aspecto de “vulcão” (“*volcano lesions*”) (YAEGER et al., 2002).

Yaeger (2007) observou que a relação entre a presença de edema de mesocólon e a detecção de toxina A e B nas fezes foi baixa (42%). Entretanto, em leitões que apresentaram colite, essa relação elevou-se para 84%.

O diagnóstico presuntivo da doença deve ser baseado no histórico, observação dos sinais clínicos e nas lesões macroscópicas e microscópicas. Os procedimentos laboratoriais que têm sido empregados no diagnóstico da infecção pelo *C. difficile*

incluem: isolamento bacteriano, teste de citotoxicidade em cultivo celular, aglutinação em látex e quantificação das toxinas A e B através do teste de ensaio imuno-enzimático (ELISA). A detecção de toxinas nas fezes, através da demonstração de citotoxicidade em cultivo de células de ovário de hamster chinês, é considerado o método de referência para o diagnóstico da infecção pelo *C. difficile*. Entretanto, a técnica demanda muito tempo para ser realizada (5–7 dias) e não detecta a toxina A (POST et al., 2002). O isolamento do agente e o teste de aglutinação em látex não diferenciam entre cepas toxigênicas e não toxigênicas que podem estar presentes no trato intestinal (YAEGER et al., 2002). O teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos para as toxinas A e B pode ser utilizado para identificar bactérias portadoras de cópias desses genes, todavia não podem ser utilizados para determinar se os genes estão codificando as proteínas - toxinas (POST et al., 2002). O teste de ELISA, que detecta isoladamente a toxina A ou as toxinas A e B associadas, tornou-se ferramenta corrente no diagnóstico da doença causada pelo *C. difficile*. O teste é rápido, sensível e de fácil manipulação e tem a vantagem de detectar as toxinas diretamente nas fezes (POST et al., 2002). Esses autores compararam o teste de citotoxicidade em cultivo celular com o teste de ELISA e observaram uma correlação de 88%.

As amostras a serem usadas para a detecção das toxinas A e B por ELISA podem ser coletadas do conteúdo do cólon ou diretamente do reto do animal. Ao comparar esses dois locais de coleta em relação aos níveis de toxinas detectados no ELISA, Yaeger (2002) observou uma correlação de 95%. As enterotoxinas são instáveis e a desnaturação pode ocorrer se o material coletado não for imediatamente resfriado. Além disso, as toxinas produzidas pelo *Clostridium difficile* podem estar presentes em leitões aparentemente normais e, dessa forma, o diagnóstico definitivo deve ser feito através da soma de diversos exames, além da exclusão de outros possíveis agentes (YAEGER et al., 2002).

Segundo Post & Songer (2004), a tetraciclina, tilosina, tiamulina e virginamicina apresentaram-se eficientes no controle do *Clostridium difficile* quando adicionadas à ração. Outras formas de controle incluem a aplicação de vacinas autógena (bacterinas e toxóides), sendo que vacinas comerciais não estão disponíveis no mercado até o momento. É citada também como forma de controle a melhoria de práticas de manejo e de ambiência, principalmente a remoção mecânica de esporos da bactéria eventualmente presentes no ambiente, utilizando lavagem com água sob alta pressão.

2.5 Rotavírus

O rotavírus é considerado o mais importante entre os agentes etiológicos das gastroenterites virais de caráter agudo tanto em crianças quanto em animais jovens em todo mundo (ALFIERI, 2004). A enteropatogenicidade do agente em suínos é caracterizada pela sua habilidade em produzir uma gastroenterite severa, com atrofia das vilosidades do intestino delgado (PAUL & STEVENSON, 1999). Acomete suínos mais freqüentemente em idade variando de 15 até 30 dias (79%) e a infecção é pouco freqüente em leitões com menos de 10 dias de vida (10%) (ROEHE et al., 1989). O 1º relato de rotavírus como causa de diarréia em suínos foi realizado no ano de 1975 (WOODE et al., 1976).

O rotavírus é um vírus não envelopado pertencente à família *Reoviridae*. Apresenta como características morfológicas a presença de duplo capsídeo, simetria icosaédrica e RNA com dupla fita. Divide-se em 8 grupos (A–G) baseados no capsídeo interno, os mais comumente encontrados nos suínos são A, B, C e E (PAUL & STEVENSON, 1999). A maioria das diarréias causadas pelo rotavírus em suínos é pelo grupo A, compreendendo até 89% dos casos (WILL et al., 1994). Apresenta 11 segmentos genômicos, sendo que 6 deles codificam proteínas estruturais e 5 proteínas não estruturais. O rotavírus pode também ser classificado em 2 tipos, G e P, de acordo com diferenças na antigenicidade de duas proteínas do capsídeo externo, VP7 e VP4, respectivamente. Ao menos 16 sorotipos “G” e 27 sorotipos “P” já foram identificados em seres humanos e animais (PARRA et al., 2008). Os sorotipos “G” mais freqüentemente encontrados nos suínos são o G3, G4, G5 e G11 e os sorotipos “P” são o P6 e P7 (GOUVEA et al., 1994).

Três importantes características virais são responsáveis pela perpetuação dos rotavírus nas granjas de suínos. A primeira é a grande resistência da partícula viral ao meio ambiente e ação de produtos químicos, como os desinfetantes. O vírus é estável em matéria orgânica à temperatura de 60° C por 30 minutos e pode resistir em temperaturas que variam de 18–20° C durante 7–9 meses. A segunda é a grande quantidade de partículas virais eliminadas nas fezes de leitões com diarréia, podendo chegar a 10^{12} partículas virais por grama de fezes, fazendo com que a sua erradicação, ou mesmo a redução na quantidade dessas partículas no meio ambiente, seja muito difícil. A terceira é a presença de animais portadores assintomáticos do vírus, como as matrizes, que devido ao estresse do período ao redor do parto eliminam o vírus pelas fezes, constituindo assim fonte de infecção para os leitões (ALFIERI, 2004).

A principal via de transmissão é a fecal-oral, sendo a matriz a principal fonte de infecção para o leitão neonato. A proteção do leitão depende da quantidade e qualidade do colostro ingerido, mas principalmente de anticorpos provenientes do leite da matriz (IgA) (DEWEY et al., 2003)

A imunidade passiva pode perdurar 3–5 semanas (TZIPORI et al., 1980). Todavia, leitões nascidos de primíparas são mais susceptíveis à infecção pelo rotavírus, quando comparados aos nascidos de múltiparas (SVENSMARK et al., 1989).

A morbidade pode chegar a 20% e a mortalidade pode passar de 15%, dependendo do status imunológico do plantel (PAUL & STEVENSON, 1999). Fitzgerald et al. (1988) realizaram um levantamento etiológico das diarreias em suínos pré e pós desmame nos EUA. O rotavírus sozinho apareceu como o maior causador de diarreia pré desmame com 33,1% das amostras positivas, sendo que esse vírus associado com outros agentes apareceu como 12,8% das causas de diarreia nas amostras positivas. No Brasil um estudo de prevalência de rotavírus foi realizado por Roehe et al. (1989) no estado do Rio Grande do Sul, onde o agente foi encontrado em 18,6% das amostras de fezes diarreicas, sendo que a maioria (79%) dos animais encontrava-se entre 15 e 30 dias de vida. Recentemente, Barry et al. (2007) observaram que amostras de fezes de leitões com idade entre 1 e 4 semanas, positivas para, rotavírus do grupo A têm 4,36 vezes mais chance de serem diarreicas do que não diarreicas ($p=0,0001$). Em infecções naturais, o agente pode ser excretado tanto em fezes normais quanto em fezes diarreicas (GATTI et al., 1989).

A patogenia da rotavirose se deve à má absorção e má digestão dos alimentos. O período de incubação é relativamente curto (12 a 24 horas) e o agente tem tropismo por enterócitos maduros localizados no ápice das vilosidades e, em menor extensão, pelas células M presentes na superfície epitelial do intestino delgado (BULLER & MOXLEY, 1988). Ao sair das células, após sua replicação, o rotavírus causa lise e descamação dos enterócitos e atrofia das vilosidades, podendo ocorrer fusão das mesmas. As células mortas são substituídas por enterócitos imaturos com baixa capacidade de absorção e há uma diminuição da produção das dissacaridases, principalmente a lactase. Isso leva a um acúmulo de dissacarídeos o que causa um aumento da osmolaridade do lúmen intestinal, resultando em diarreia osmótica (GRAHAM et al., 1984).

A patogenia da infecção é complementada pelo efeito de uma proteína não estrutural (chamada NSP4), que atua como enterotoxina e determina aumento no fluxo de líquidos e eletrólitos para a luz intestinal (PAUL & STENVENSON, 1999).

De 12 a 24 horas após a infecção pelo rotavírus, os animais apresentam anorexia, depressão e, ocasionalmente, vômito. As fezes têm consistência variando de aquosa a cremosa, com coloração branco-amarelada, contendo leite não digerido. A diarreia continua em média por 4 dias, retornando progressivamente ao normal em 7 a 14 dias (PAUL & STENVENSON, 1999). A mortalidade varia com a idade, geralmente ocorrendo entre 3 a 7 dias após o início da diarreia, quando o leitão se apresenta desidratado. Em granjas recém estabelecidas, devido à baixa imunidade das fêmeas primíparas, a doença pode ocorrer nos leitões já na primeira semana de vida, com sintomatologia mais grave e perdas muito altas (SOBESTIANSKY et al., 1999). As paredes do intestino delgado ficam dilatadas e tornam-se finas e translúcidas, com conteúdo líquido no seu interior. Microscopicamente, ocorre atrofia das vilosidades em até 2/3 da sua altura original. Além disso, os enterócitos do ápice das vilosidades afetadas aumentam de volume e descolam-se facilmente da lâmina própria (TORRES-MEDINA & UNDERDHAL, 1980). Em leitões com 3 dias de vida, a regeneração do epitélio afetado é mais lenta e pode durar até 10 dias. Em contrapartida, a regeneração do epitélio de leitões com 21 dias pode ocorrer em menos de 4 dias (DEWEY et al., 2003).

O método de referência para o diagnóstico da infecção por rotavírus é a microscopia eletrônica, todavia apresenta diversos inconvenientes como a falta de praticidade e o custo elevado (MARTINEAU et al., 1995). Os métodos mais utilizados para diagnosticar a infecção por rotavírus são:

A imunohistoquímica, que utiliza cortes histológicos e detecta no local da lesão (MAGAR & LAROCHELLE, 1992);

O teste de aglutinação em látex, que é um método simples, rápido e barato e é disponibilizado em “kits” comerciais. Esse teste e o anterior apresentam a desvantagem de só detectar o rotavírus do grupo A.

O teste de ELISA e a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) são amplamente utilizados em estudos de prevalência do agente que utilizam amostras fecais. Os dois testes têm a vantagem de diagnosticar todos os grupos de rotavírus.

A PCR pode ser uma alternativa na detecção e diferenciação dos sorotipos de rotavírus. Mais recentemente, foi desenvolvido um teste de RT-PCR que quantifica as partículas virais presentes nas amostras

2.6 *Escherichia coli*

A infecção por *Escherichia coli* causa, em leitões recém nascidos, uma forma de diarreia denominada colibacilose neonatal. É mais comum entre 1 e 4 dias de vida e é resultante da infecção por cepas enterotoxigênicas de *E.coli* (ETEC), mas cepas enteroinvasivas podem ocasionalmente causar a doença (WADA et al., 2004).

A ETEC é considerada, até o momento, a maior causa de diarreia em leitões neonatos e no período de creche. Estudos de prevalência mais recentes, todavia, mostram que a ETEC tem diminuído sua importância (KATSUDA et al., 2006; WIELER et al., 2001) perdendo lugar para agentes como o *Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium difficile* (YAEGER et al., 2002; YAEGER, 2007).

A maioria das cepas de *E. coli* está presente em títulos baixos e constitui parte da microbiota normal do intestino delgado de suínos saudáveis. O agente é classificado sorologicamente pela identificação dos antígenos O (somáticos), K (capsulares), H (flagelares) e F (fimbriais) (FAIRBROTHER, 1999). A ETEC patogênica diferencia-se da comensal por apresentar dois importantes fatores de virulência: fimbrias e enterotoxinas (FRANCIS, 2002). As fimbrias são responsáveis pela aderência da bactéria na mucosa do intestino delgado, sendo esse um mecanismo essencial para evitar a eliminação através do peristaltismo intestinal normal (SOBESTIANSKY et al., 1999). As principais fimbrias presentes nas amostras de *E. coli* isoladas de casos de colibacilose neonatal classificam-se em F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987), F41 e AIDA. As fimbrias aderem a receptores polissacarídicos presentes nos enterócitos e no muco presente logo acima dessas células (glicocálice). Após aderir ao epitélio intestinal, a ETEC inicia a produção de enterotoxinas que alteram o fluxo de água e eletrólitos do intestino delgado, podendo levar a diarreia se o intestino grosso não for capaz de absorver o excesso de fluido. Duas principais classes de toxinas são produzidas pelas ETEC: LT (toxina termolábil) e ST (toxina termoestável), dividida em STa e STb (FAIRBROTHER, 1999). A toxina LT aumenta a produção do AMP cíclico resultando em aumento da secreção de Cl^- , Na^+ , HCO_3^- e água do interior da célula para o lúmen intestinal. A toxina STa estimula a produção de GMP cíclico que causa a diminuição da absorção de eletrólitos e água através do intestino, e finalmente a STb assim como a LT aumentam a secreção de água e eletrólitos para o lúmen intestinal, provavelmente através da ação da prostaglandina E2 (ALEXANDER, 1994).

Até recentemente, as ETECs mais frequentes encontradas em casos de colibacilose neonatal pertenciam aos sorotipos O149, O8 e O147, continham a fimbria

F4 e produzem as toxinas LT e STb. Um aumento no número de isolados pertencentes aos sorotipos O8, O9, O64 e O101, positivos para F5, F6 e F41 e produzindo a toxina STa, vem ocorrendo (FAIRBROTHER, 1999). No Brasil, Guimarães et al. (2006) observaram que os principais fatores de virulência de amostras de ETEC provenientes de colibacilose neonatal foram a F4 e F6, além das toxinas STa e STb, em associação.

Determinadas linhagens de suínos não apresentam o receptor para a fímbria F4 no intestino delgado, tornando-as naturalmente resistentes à infecção por cepas que produzem esse fator. Essa resistência está intimamente ligada ao cromossomo 13 (LI et al., 2007). Outra forma de resistência frente à infecção pela ETEC é dependente da idade. Leitões na primeira semana de vida são mais suscetíveis a infecções por cepas de ETEC produtoras de F5 e F6 quando comparados a leitões mais velhos no período de maternidade. Essa maior sensibilidade pode ser devido ao maior número de receptores para essas fímbrias, encontradas no epitélio intestinal de leitões mais novos (RUNNELS et al., 1980).

O leitão adquire a ETEC através da contaminação fecal-oral logo após o nascimento, a partir do ambiente contaminado ou pelas fezes da matriz, que pode ser portadora assintomática de cepas patogênicas de *E. coli* no intestino. O colostro apresenta papel fundamental na prevenção da colibacilose neonatal, pois contém fatores bactericidas não específicos e anticorpos específicos que inibem a aderência da ETEC ao intestino (FAIRBROTHER, 1999).

A severidade da doença depende dos fatores de virulência presentes na cepa, da quantidade de bactérias ingeridas, status imunológico da matriz e idade (FRANCIS, 2002). A colibacilose neonatal apresenta um curso rápido e pode ser observada 2 a 3 horas após o nascimento, afetando um número variável de leitões, podendo atingir toda a leitegada. Em casos severos, leitões aparentemente sem diarreia podem ser encontrados mortos pelo curso rápido da doença que, se não tratada, pode levar à morte de 4 a 24 horas após o início dos sinais clínicos. Os principais sinais são diarreia com consistência líquida e coloração não hemorrágica, desidratação, prostração e irritação da pele na região perianal devido à alcalinidade das fezes (GUEDES, 2006). Um grande número de leitões pode ser afetado na sala de maternidade, o que geralmente resulta em alta mortalidade e morbidade (FAIRBROTHER, 1999). Poucas alterações patológicas específicas podem ser atribuídas a colibacilose neonatal. Macroscopicamente, observa-se desidratação, dilatação do estômago (com presença de leite coagulado) e flacidez do intestino delgado com conteúdo líquido no seu interior. Microscopicamente as bactérias

encontram-se aderidas principalmente às criptas de Lieberkühn. Pode ocorrer também congestão da lâmina própria, além do aumento no número de neutrófilos no local (ALEXANDER, 1994).

A observação dos sinais clínicos, histopatologia e detecção de grande quantidade de cocobacilos Gram-negativos aderidos à mucosa do intestino delgado permitem um diagnóstico presuntivo (WILSON & FRANCIS, 1986). Uma estimativa na concentração de *E. coli* pode ser realizada através da impressão da mucosa, com posterior coloração de Gram. Mais de 100 bactérias por campo no aumento de 1000 X no microscópio ótico seria um indicativo de colibacilose (MULLANEY et al., 1991). Outro método para determinar a existência da infecção por *E. coli* é o exame de imunohistoquímica de esfregaço de íleo ou de corte histológico (FRANCIS, 1999).

O diagnóstico laboratorial é realizado através do isolamento do agente. Amostras patogênicas de *E. coli* que são isoladas em placas de ágar sangue geralmente são hemolíticas, pois o gene responsável pela expressão do principal fator de virulência da bactéria (F4-K88) usualmente está presente no mesmo plasmídeo que alberga o gene codificador da hemolisina (SOBESTIANSKY et al., 1999). Pode-se também utilizar um meio seletivo e diferencial (como o ágar MacConkey), pois o crescimento abundante de colônias de *E. coli* fenotipicamente similares pode ser indicativo da infecção por uma população uniforme de *E. coli*, mas não se conseguem informações sobre a patogenicidade da amostra isolada.

A confirmação da patogenicidade das cepas de *E. coli* isoladas é realizada através de análises fenotípicas e genotípicas. Análises fenotípicas são conduzidas pela detecção da produção de fímbrias de aderência através do teste de ELISA ou imunofluorescência indireta. Uma falha potencial do teste de ELISA é a perda de expressão de fímbrias de organismos cultivados “in vitro”. Além disso, organismos de cápsula espessa podem apresentar resultado falso-negativo. Outra limitação referente a ambos os testes é a disponibilidade restrita dos anticorpos específicos contra as fímbrias e o seu custo (GUEDES et al., 2006b). A análise genotípica é realizada através da PCR, que identifica genes que codificam fatores de virulência, incluindo fímbrias de adesão F4, F5, F6, F18 e F41 e as toxinas LT, STa, STb e Stx-e.

No Brasil a colibacilose neonatal é frequentemente diagnosticada apenas através do isolamento do agente de amostras de fezes, sem nenhum tipo de tipificação baseado em fatores de virulência. Para exemplificar a importância da identificação dos fatores de virulência presentes nas cepas de *E. coli* isoladas, em estudos realizados em São Paulo,

Rio Grande do Sul e Minas Gerais, demonstrou-se que somente 30% possuíam algum fator de virulência, sendo todos os outros casos provavelmente provocados por outros agentes.

2.7 *Isospora suis* e *Eimeria* spp.

A coccidiose dos leitões é uma doença entérica, causada por protozoários intracelulares da família *Eimeriidae*. Diversas espécies dessa família, pertencentes ao gênero *Isospora* sp. (3 espécies) e *Eimeria* sp. (13 espécies) são encontradas em suínos, todavia o *Isospora suis* é o principal agente responsável pelas perdas causadas pela enfermidade (MUNDT et al., 2006). Por esse motivo, a coccidiose é muitas vezes chamada de isosporose suína. O *I. suis* foi descrito pela primeira vez em 1934 em suínos jovens que apresentavam diarreia e enterite (BIESTER & MURRAY, 1934). Somente a partir do final da década de 70 a isosporose foi reconhecida como doença clínica distinta e o *I. suis* como importante agente enteropatogênico em leitões jovens.

O leitão se infecta através da ingestão de oocistos esporulados logo após o nascimento, presentes no piso contaminado e nas tetas das porcas, ou de oocistos excretados de leitões provenientes de outras leitegadas durante a uniformização dos lotes na maternidade. A infecção pode também ocorrer a partir de oocistos presentes nas fezes das mães, mas esse é um fato pouco freqüente. A dose infectante é baixa, sendo necessários apenas 1×10^4 oocistos esporulados por leitão para desencadear a doença clínica (LINDSAY et al., 1999).

Em estudos de prevalência realizados na Alemanha (WIELER et al., 2001), Japão (KATSUDA et al., 2006) e Brasil (CALDERARO et al., 2001), onde se buscou o diagnóstico do *Isospora suis* em leitões no período neonatal (1–7 dias), observou-se uma baixa ocorrência do agente, correspondendo a 7,3% (n=41), 0,0% (n=60) e 11,1% (n=36) respectivamente. Se utilizarmos os mesmos dados trocando apenas a idade dos leitões (de 1–7 dias para 8–14 dias), observa-se um aumento significativo da prevalência: 39,2% (n=102), 36,4% (n=44) e 45% (n=60), respectivamente.

Os ciclos biológicos dos coccídeos são semelhantes e devem ser compreendidos para que sejam visualizados seus efeitos sobre o hospedeiro. Os oocistos são organismos com paredes espessas, habitualmente ovóides, proporcionando um modo eficiente de transferência da infecção de um hospedeiro a outro. Os oocistos de cada espécie são morfologicamente diferentes, mas essencialmente têm características análogas (FORTES, 2004). A *Isospora suis* pertence à família *Eimeriidae* e o seu

oocisto contém dois esporocistos e quatro esporozoítos. Cada um possui, em um dos pólos, um diminuto poro, a micrópila. Resistem 26 dias à temperatura de congelamento, 15 meses em temperaturas de 40° C a 45° C e à maioria dos desinfetantes utilizados comercialmente na suinocultura. São destruídos a 65°C em 15 minutos (SOBESTIANSKY et al., 1999). Em um estudo recente, Langkjær & Roepstorff (2006) observaram que oocistos de *I. suis* mantidos a uma temperatura constante de 30° C demonstraram ser sensíveis em uma baixa umidade relativa do ar e tornaram-se totalmente inviáveis em 18 horas a uma umidade de 53%.

O ciclo de vida do coccídeo divide-se em três fases distintas: esporogonia, excitação e desenvolvimento endógeno. A esporogonia, que exige a presença de oxigênio, acontece no ambiente fora do hospedeiro e compreende o processo em que o oocisto passa de um estágio não infectante para um estágio infectante através da esporulação. Para isso, são necessárias temperatura e umidade adequada. Segundo Lindsay et al. (1982) a *Isospora suis* esporula rapidamente em temperaturas entre 20° C e 37° C. Por esse motivo, a prevalência de diarreia causada pelo *Isospora suis* é maior no verão (MORIN et al, 1983). A fase seguinte, chamada de excitação, ocorre após a ingestão do oocisto esporulado (infectante). Os oocistos chegando ao intestino delgado sofrem ação da tripsina que digere a micrópila e, através dessa abertura, os esporozoítos diminutos, agora possuidores de vigorosa motilidade, escapam do oocisto. Cada esporozoíto penetra em apenas uma célula epitelial dando início à terceira fase do ciclo, chamada de desenvolvimento endógeno. Dentro do citoplasma das células epiteliais do intestino delgado (principalmente do jejuno e íleo), o esporozoíto, por reprodução assexuada, gradualmente aumenta em tamanho e complexidade, tornando-se primeiramente um trofozoíto e, finalmente, esquizonte, que literalmente enche o citoplasma da célula hospedeira, deslocando o núcleo para um dos pólos. Cada esquizonte maduro contém muitos esporos alongados, conhecidos como merozoítos. O esquizonte rompe sua parede e a da célula hospedeira, liberando os merozoítos, que infectam outras células epiteliais e continuam o ciclo biológico assexuado. Alguns merozoítos entram na fase sexuada do ciclo biológico, conhecida como gametogênese. Cada um dos merozoítos evolui no interior de uma célula epitelial hospedeira, resultando numa forma fêmea (macrogameta) ou numa forma macho (microgameta). O microgameta termina sofrendo ruptura, liberando grande número de microgametas diminutos e possuidores de motilidade. Um dos microgametas une-se a um só

macrogameta que, assim que tenha sido fertilizado nesse processo, se transforma num oocisto (FORTES, 2004).

O período pré-patente é de aproximadamente 5 dias e a excreção dos oocistos geralmente não coincide com o desenvolvimento da diarreia. Existem ainda divergências com relação ao momento em que se inicia a excreção dos oocistos pelas fezes de leitões contaminados. Diversos autores descrevem que em leitões infectados experimentalmente a excreção de oocistos ocorre antes do início da diarreia (STUART et al., 1982; KOUDELA & KOUČEROVÁ, 2000; BACH et al., 2003), já Martineau & Del Castillo (2000) encontraram o oposto em leitões infectados naturalmente em condições de campo. Essa divergência pode ser resultante de co-infecções por patógenos oportunistas (virais ou bacterianos) que também causam enterite (MUNDT et al., 2006). Recentemente, Mundt et al. (2006) observaram que no 6º dia após a infecção, todos os leitões ($n=50$) excretaram oocistos e que a maioria (58%) excretou-se diariamente ou todos os dias exceto um, no período de 6 a 11 dias após a infecção. Todavia, a quantidade de oocistos excretados foi muito variável entre os indivíduos com a apresentação de dois picos, no 5º dia e no 10º dia após a infecção.

A coccidiose caracteriza-se pela alta morbidade e baixa mortalidade e tem como principal consequência a redução no peso ao desmame. Mundt et al. (2006) observaram que aos 28 dias de vida (desmame) os animais que foram infectados experimentalmente com oocistos de *I. suis* pesaram 2,125Kg a menos do que os controles que não adoeceram.

O desenvolvimento dos sinais clínicos depende principalmente do número de oocistos esporulados ingerido pelo leitão. A sintomatologia clínica consiste em diarreia de consistência cremosa a pastosa, não hemorrágica, e pode persistir de 1 a 6 dias, com média de 3 dias (MUNDT et al., 2006). Em função da diarreia, os leitões desidratam e apresentam queda no ganho de peso diário (LINDSAY et al., 1999). As lesões localizam-se principalmente na mucosa do jejuno e íleo, raramente no ceco e cólon. Lesões macroscópicas são detectadas em casos severos, com presença de membrana fibrinocrótica na superfície mucosa do jejuno e íleo, além de conteúdo líquido no lúmen do intestino delgado. Microscopicamente, há discreta descamação do epitélio, hiperplasia das criptas, acompanhadas de necrose e atrofia focal moderada a acentuada das vilosidades, observadas principalmente no jejuno e íleo. O tecido linfóide, principalmente do íleo, apresenta hiperplasia, podendo ocorrer edema e congestão da lâmina própria com infiltrado inflamatório misto com predomínio de células

mononucleadas (CALDERARO et al., 1997). As lesões desenvolvem-se geralmente 4 dias após a infecção e estão associadas à presença da forma assexuada do parasito (LINDSAY et al, 1999).

Anticorpos colostrais têm pouca importância na proteção do leitão contra o desenvolvimento da forma clínica da coccidiose (KOUDELA & KOUČEROVÁ, 2000). A imunidade mediada por células atua como o principal fator no desenvolvimento de resistência à doença (KOUDELA & KOUČEROVÁ, 2000). Leitões que tenham sido uma vez infectados pela *Isoospora suis* tornam-se naturalmente resistentes a re-infecções (STUART et al., 1982).

O diagnóstico de diarreia causada pelo *Isoospora suis* é geralmente realizado através da observação em microscópio de oocistos nas fezes, utilizando métodos de centrífugo-flutuação com solução hipersaturada de açúcar (método de Sheather) ou de NaCl (método de Willis Molay). Esses métodos podem ser modificados para obter um caráter quantitativo através da contagem dos oocistos em câmara de Mc Master. Oocistos de *Isoospora suis* são diferenciados de oocistos de *Eimeria* sp. por apresentarem estruturas chamadas *hazy bodies* entre a parede do oocisto e os esporocistos e por apresentarem 2 esporocistos e 4 esporozoítos, detectáveis somente após a esporulação (LINDSAY et al., 1999). O exame histopatológico de fragmentos do intestino delgado com posterior coloração pelo método de Wright ou Giemsa pode ser utilizado como exame complementar do método de centrífugo-flutuação, já que a presença de oocistos nas fezes pode ser apenas sugestiva, uma vez que leitões normais podem eliminar oocistos nas fezes (LINDSAY et al., 1999). O esfregaço de mucosa com posterior coloração pelo método de Wright ou Giemsa foi descrito por Stevenson & Andrews (1982) como método de diagnóstico para a detecção de oocistos. É importante que leitões que venham a serem examinados com essa técnica apresentem sinais clínicos típicos de coccidiose e que o esfregaço seja feito imediatamente após a eutanásia. Além disso, a impressão deve ser feita a partir de vários segmentos do intestino delgado de cada leitão, para evitar resultados falso-negativos. Ambos os métodos (flutuação modificada e impressão de mucosa), apresentam baixa sensibilidade e são inadequados para detecção de baixo número de oocistos (DAUGSCHIES et al., 2001).

A microscopia de fluorescência também pode ser utilizada para detecção de oocistos de *Isoospora suis* nas fezes. Oocistos de *E. scabra*, *E. polita*, *Cryptosporidium parvum* e *Isoospora suis* emitem luz após excitação com raio ultravioleta (DAUGSCHIES et al, 2001; VAREA et al., 1998). Segundo Dauschies et al. (2001)

essa técnica pode ser utilizada em amostras com elevado índice de gordura (fezes de leitões lactentes) e apresenta-se mais sensível do que os métodos tradicionais de flutuação e de impressão de mucosa. A técnica de nested-PCR é considerada a mais sensível na detecção de oocistos diretamente das fezes e pode ser empregada quando há uma grande quantidade de amostras para serem testadas, todavia tem a desvantagem de não diferenciar os oocistos de outras fases do parasita presentes nas fezes (JOACHIM et al., 2004).

2.8 *Cryptosporidium* spp.

A criptosporidiose é uma enfermidade causada por um coccídeo (*Cryptosporidium* spp.) que pode afetar uma variedade de vertebrados incluindo os suínos e seres humanos (ZORANA et al., 2003). Parasita principalmente células do epitélio intestinal e respiratório e, nos suínos, causa uma diarreia não hemorrágica geralmente em leitões recém desmamados. Comumente está associado com outros enteropatógenos como o rotavírus e adenovírus, tendo um caráter secundário no curso da diarreia (VITOVEC et al., 2006). Todavia em infecções experimentais o *Cryptosporidium* spp. foi confirmado como agente primário de diarreia de leitões lactentes (VITOVEC & KOUDELA, 1992).

O *Cryptosporidium* spp. infectando suínos foi descrito inicialmente em 1977 nos EUA (KENNEDY et al., 1977) e, a partir dessa data, diversos estudos demonstraram a distribuição mundial do agente em diferentes países (XIAU, et al., 1994; FREIRE et al., 1995; QUILEZ et al., 1996; IZUMIYAMA et al., 2001; WIELER et al., 2001; SUARÉZ-LUEGAS et al., 2007).

Duas espécies de *Cryptosporidium* spp. são responsáveis por desencadear a doença clínica em suínos: o *Cryptosporidium parvum* que se divide em genótipo bovino e é capaz de parasitar suínos, bovinos e inclusive humanos, demonstrando ser uma importante zoonose, e o genótipo suíno, específico dessa espécie. Através de análises biológicas e moleculares, o *Cryptosporidium suis* foi definido como uma nova espécie de *Cryptosporidium* spp., específica dos suínos (RYAN et al., 2004).

A principal via de transmissão é fecal-oral e os animais adultos (matrizes) representam a principal fonte de infecção para animais jovens (ZORANA et al., 2003). Em suínos com idade entre 3 e 12 meses e nos animais adultos, a infecção pelo *Cryptosporidium* spp. pode ser assintomática, ou seja, sem diarreia. Uma outra forma de infecção é através da água ou contato com bovinos, quando se tratando do *C. parvum*

genótipo bovino (GUSELLE et al., 2003). Vitovec et al. (2006) não encontraram relação entre diarreia e infecção em 4338 amostras de fezes analisadas em animais lactentes e na fase de creche. O principal fator de risco para leitões é o sistema imune debilitado. Especialmente em hospedeiros imunocomprometidos e neonatos que não tiveram acesso ao colostro, os sinais clínicos podem se tornar mais severos, com uma taxa de mortalidade elevada (GUSELLE et al., 2003). A imunidade passiva parece apresentar papel importante na proteção do leitão. Tzipori et al. (1980) citam que, em áreas endêmicas, as fêmeas em lactação conferem uma boa imunidade lactogênica até os 15 dias de idade em leitões, após o qual eles desenvolveriam uma resistência própria. Isso explicaria a maior prevalência da enfermidade em leitões recém desmamados comparados com leitões lactentes (IZUMIYAMA et al., 2001).

Pouco se sabe sobre a real prevalência desse agente no Brasil. Freire et al. (1995) e Calderaro et al. (2001) observaram que em leitões lactentes com diarreia o *C. parvum* obteve uma prevalência de 7,35% e 1,2%. Em países como a República Tcheca, essa prevalência manteve-se baixa, 5,7% de um total de 3368 leitões lactentes (VITOVEC et al., 2006).

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp. é muito semelhante ao da *Isospora suis*. Membros do gênero *Cryptosporidium* spp. diferem de outros coccídeos por não invadirem células epiteliais das vilosidades intestinais, mas por aderir à região das microvilosidades e, a partir daí, formam um vacúolo parasitóforo localizado entre o citoplasma e a membrana celular que por ocasião do seu rompimento, provoca a morte dos enterócitos (SOBESTIANSKY et al., 1999). Portanto, o agente é considerado um parasito intracelular e extracitoplasmático. Alguns autores têm relatado a presença de dois tipos de oocistos: os de parede espessa que são excretados nas fezes e transmitem a infecção para outros hospedeiros suscetíveis e os de parede fina, que são menos resistentes, sofrem excitação ainda no hospedeiro, liberam os esporozoítos e são responsáveis pela auto-infecção (FAYER & UNGAR, 1986). O período pré-patente é de 4 a 5 dias e prolonga-se por um período médio de 28 dias (GUSELLE et al., 2003). A diarreia é observada de 4–6 dias após a infecção (GUSELLE et al., 2003 & ENEMARK et al., 2003). Diferentemente da *Isospora suis*, os oocistos estão completamente esporulados são infectantes no momento da excreção. Não foi observado sazonalidade na prevalência da criptosporidiose como é observado na isosporose (SANFORD, 1987).

O principal sinal clínico é uma diarreia não hemorrágica profusa e, ocasionalmente, vômito (ENEMARK et al., 2003). A diarreia ocorre por má absorção

e, algumas vezes, é autolimitante. Em leitões neonatos os sinais clínicos geralmente são mais severos.

Os *Cryptosporidium* spp. podem causar lesões no jejuno, íleo, ceco, cólon, reto e, inclusive em outros tecidos como a vesícula biliar (FLETA et al., 1995). Entretanto o principal sítio de localização é o epitélio do íleo (VITOVEC et al., 2006). Macroscopicamente as lesões são inespecíficas e microscopicamente há um notável dano da mucosa com encurtamento das vilosidades e, ocasionalmente, fusão das mesmas. A lâmina própria apresenta grande quantidade de infiltrado inflamatório mononuclear, com poucos eosinófilos. Os *Cryptosporidium* spp. podem ser vistos aderidos à mucosa, em alguns casos (NUÑEZ et al., 2003; VITOVEC et al., 2006).

O diagnóstico presuntivo é realizado levando em conta os sinais clínicos, histopatologia e, principalmente, a exclusão de outros possíveis patógenos causadores de diarreia nessa fase. Como na isosporose, a detecção de oocistos nas fezes através do método de centrífugo-flutuação pode ser utilizado (método de Sheather). É importante lembrar que o oocisto de *Cryptosporidium* spp. encontra-se no plano mais elevado do foco no microscópio quando comparado com outros oocistos de coccídeos. O esfregaço de fezes com posterior coloração pela técnica de Ziehl Neelsen modificada (HENRIKSEN & POHLENS, 1981) é o método de diagnóstico mais utilizado atualmente na medicina veterinária e cora de rosa os oocistos do *Cryptosporidium* spp. sendo identificado facilmente em objetiva de imersão. Assim como o *Isospora suis*, os oocistos de *Cryptosporidium parvum* são autofluorescentes sob lâmpada ultravioleta, o que torna a identificação do agente através do microscópio de epifluorescência uma alternativa no diagnóstico (VAREA et al., 1998). Testes sorológicos como a imunofluorescência indireta e ELISA são utilizados com uma menor frequência.

2.9 Diarréias nutricionais

A diarreia nutricional, também chamada de diarreia do leite ou diarreia por indigestão, é aquela que não apresenta nenhum agente infeccioso como causa primária do evento (ALEXANDER, 1981). Afeta comumente leitões no período neonatal e logo após o desmame e é relacionada principalmente a alterações tanto na morfologia quanto na fisiologia do trato gastrointestinal.

Diversos fatores têm sido relacionados com o desencadeamento da diarreia nutricional em leitões no período neonatal:

2.9.1 Ingestão insuficiente de colostro: Além das características de imunização, o colostro também tem a função de prover energia e nutrientes promotores da maturação e do desenvolvimento do epitélio intestinal, a fim de modular alterações anatômicas e fisiológicas importantes, para tornar o sistema digestório competente tanto do ponto de vista imunológico quanto fisiológico (JENSEN et al., 2001). Diversas substâncias encontradas no colostro são responsáveis pelo desenvolvimento morfológico e fisiológico do trato gastrointestinal. O fator de crescimento epidermal (FCE) é responsável pela estimulação do crescimento epitelial, diferenciação celular e maturação enzimática, os fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (FCSI-1 e 2) são capazes de estimular a síntese de DNA e a mitose de vários tipos celulares, aumentando a profundidade das criptas e altura das vilosidades intestinais (BANDEIRA et al., 2007). Além disso o colostro contém hormônios como a insulina, cortisol e tiroxina, que são importantes para a modulação da atividade enzimática e maturação intestinal (XU et al., 1992), lactoferrina e vitamina A que estimulam a absorção de carboidratos e mantém a integridade das células epiteliais. A avitaminose A é também uma causa reconhecida de diarreia em leitões que não mamaram o colostro (JENNINGS, 1959).

Xu & Wang (1996) compararam a atividade de enzimas digestivas e massa intestinal de leitões neonatos recebendo diferentes dietas no período neonatal: 1) solução contendo 5% de lactose, 2) colostro de porca e 3) colostro de porca tripsinizado. Foi observado que os leitões que receberam as dietas 2 e 3 apresentaram maiores pesos e comprimentos de intestino delgado, assim como maior peso da mucosa e do intestino grosso.

A consequência direta da não ingestão de colostro logo após o nascimento é, muitas vezes, a ocorrência de diarreia, não só pela baixa ingestão de imunoglobulinas, mas também pela falta de desenvolvimento e maturação intestinal precoce (BLECHA, 1998; XAVIER et al., 2006). THORUP et al. (2004) observaram que leitões de baixo peso ou que tiveram ordem de nascimento superior ao sétimo apresentavam menor ingestão de colostro e/ou ingestão de colostro de qualidade inferior. A ingestão de colostro também diminui com a queda da temperatura ambiental de 30°C para 20°C (LE DIVIDICH et al., 2004).

2.9.2 Excesso de ingestão de leite: Diversos autores citam que a ingestão de leite em excesso é uma das principais causas de diarreia nutricional em leitões neonatos (JENNINGS, 1959; JONES, 1967; ALEXANDER, 1981; SOBESTIANSKY & WENTZ, 1981). Matrizes com boa produção de leite e leitões que apresentam um alto

vigor são considerados fatores de risco para o desenvolvimento dessa diarreia. Além disso, leitegadas pequenas e/ou desuniformes possibilitam que leitões mais fortes eventualmente mamem em duas ou mais tetas. Jennings (1959) sugere que em leitões neonatos que ingerem uma excessiva quantidade de leite, ocorre uma passagem excessivamente rápida do alimento do estômago para o intestino antes de uma digestão gástrica eficiente, principalmente pela lipase gástrica, o que poderia desencadear um quadro de diarreia. Young & Underthal (1953) demonstraram que em leitões que não mamam o colostro, a diarreia é facilmente induzida pelo excesso de fornecimento de leite.

Outra provável causa de diarreia nutricional em leitões neonatos é o excesso de energia na ração da matriz antes e depois do parto, o que poderia alterar qualitativamente a composição do leite (ALEXANDER, 1981; SOBESTIANSKY & WENTZ, 1981).

Na maioria dos casos os leitões afetados são fortes e apresentam um bom vigor para mamar. Há uma diarreia leve a moderada, as fezes não são hemorrágicas e apresentam quantidade elevada de gordura (JONES, 1967; MOUWEN et al., 1972). Os leitões afetados geralmente se recuperam sem a utilização de antimicrobianos e o prognóstico é favorável. Em alguns casos a diarreia pode ser mais profusa, mas sem anorexia, febre ou anemia. A mortalidade é rara.

2.10 Prevalência dos principais agentes causadores de diarreia em leitões lactentes no Brasil

Poucos são os estudos sobre a etiologia das diarreias em leitões lactentes no Brasil. Na maioria das vezes, apresentam-se focados na prevalência de apenas um agente. O quadro 1 mostra os principais trabalhos publicados sobre os agentes causadores de diarreia em leitões no Brasil entre os anos de 1980 e 2007. Não há relato até o momento do *Clostridium difficile* como agente de diarreia em leitões lactentes no nosso país.

Quadro 1: Estudos de prevalência publicados no Brasil entre 1980 e 2007 relacionados aos principais agentes infecciosos causadores das diarreias em leitões de diferentes idades.

AUTORES	Nº DE AMOSTRAS	IDADE	ETIOLOGIA	FREQÜÊNCIA
Barcellos et al (1980)	803	Todas as idades	<i>E. Coli</i>	42,00%
			<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	6,80%
			<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,60%
			<i>Clostridium perfringens</i> tipo C	1,10%
			<i>Salmonella</i> sp.	0,74%
			<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0,30%
San Juan et al (1985)	350	1-56 dias	Rotavírus	22%
Roehle et al (1985)	69	10-75 dias	Rotavírus	10,14%
			<i>E. coli</i>	2,89%
Wentz et al (1988)	27	Lactentes	Rotavírus	18,60%
			<i>E. coli</i>	3,70%
			<i>Isospora suis</i>	3,70%
			Enterovírus	11,00%
			Rotavírus + <i>E. coli</i>	18,60%
			<i>E. coli</i> + Enterovírus	7,40%
			Rotavírus + Enterovírus	7,40%
			Rotavírus + <i>I. suis</i>	3,70%
			<i>I. suis</i> + Enterovírus	3,70%
			Rotavírus + Enterovírus + <i>E. coli</i>	3,70%
			Rotavírus + <i>E. coli</i> + <i>I. suis</i>	3,70%
			Rotavírus + Enterovírus + <i>I. suis</i>	3,70%
			Rotavírus + Adenovírus + <i>I. suis</i>	3,70%
			<i>E. coli</i> + Enterovírus + <i>I. suis</i>	3,70%
Alfieri et al (1989)	11	Até 7 dias	Rotavírus	18,20%
	110	15-28 dias		41,80%
	112	Acima 28 dias		16,10%
Roehle et al. (1989)	231	1-60 dias	Rotavírus	18,60%
Freitas et al (1991)	80	5 dias - pós desmame	<i>E. coli</i>	17,50%
	183		Rotavírus	14%
Trevisol et al (1991)	491	15-25 dias	Picobirnavírus	5,50%
			Picobirnavírus + <i>E.coli</i>	11,40%
			Rotavírus	13,80%
Sayd & Kawazone (1991)	112	Lactentes	<i>Isospora suis</i>	17,80%
Alfieri et al (1995)	107	Lactentes	Rotavírus	31,80%
Rostagno et al (1999)	200	Lactentes	<i>Isospora suis</i>	15,00%
Freire et al. (1995)	219	1-50 dias	<i>Criptosporidium spp.</i>	8,67%
Calderaro et al (2001)	174	1-40 dias	<i>E. coli</i>	28,00%
			<i>Isospora suis</i>	20,00%
			Rotavírus	5,20%
			<i>I. suis</i> + <i>E. coli</i>	10,40%
			<i>E. coli</i> + Rotavírus	4,00%
			<i>I. suis</i> + Rotavírus	1,20%
			<i>Clostridium perfringens</i> tipo C	0,00%
			<i>E. coli</i>	0,00%
Rotavírus	0,00%			
Barry et al (2007)	165	1-28 dias	Calicivírus	27,3%
Barry et al. (2007)	681	1-28 dias	Rotavírus	28,3%

3 ARTIGO 1

ARTIGO A SER APRESENTADO À COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA
“PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA”

Case-control study assessing the frequency of the main agents potentially associated with neonatal diarrhea in pigs in Brazil¹

Ricardo T. Lippke^{2*}, Sandra M. Borowski³, Sandra M. T. Marques⁴, Suelen O. Paesi⁵,
Laura L. Almeida⁶, Luiz G. Corbellini⁷ e⁷ David E. S. N. de Barcellos²

Abstract

Several infectious agents can cause diarrhea in neonatal pigs. The main consequences are the decrease in daily weight gain, losses in feed conversions and raised in mortality rates. The present study aimed the identification of the main viral agents (rotavirus), bacterial (*E. coli*, *Clostridium perfringens* type A e C and *Clostridium difficile*) and parasitic (coccidian and *Cryptosporidium* spp.) commonly involved in neonatal diarrhea in pigs, in fecal samples from litters with and without diarrhea, originated from commercial pig farms from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. From 147 litters with diarrhea (cases) and 129 without diarrhea (controls) 276 fecal samples were collected. The most frequently diagnosed agents in herds were coccidian (42.86%) and rotavirus (39.29%). In case litters, the most frequent agent was *Clostridium perfringens* type A (7.5%) and in control litters, coccidian and *Clostridium difficile*. No agent was significantly associated with diarrhea found in case litters. Only *Clostridium perfringens* type A (p=0.16) and rotavirus (p=0.20) showed a tendency to present higher frequency in these litters. Outbreak of diarrhea in young pigs during sampling was not present in any farm, and it is possible that in them the enteropathogenic agents were present in an endemic form. *Clostridium difficile* infection has been diagnosed in 13.6% of the litters; however a relationship between infection and diarrhea was not observed. Only 29,34% samples were positive for at least one agent. It is possible that nutritional diarrhea, related to morphologic and physiologic changes of the gastrointestinal tract were the origin of diarrhea in cases where no infectious agent was diagnosed. The present results suggest the need for special attention when sampling for the diagnosis or monitoring diarrhea in the neonatal period, as chances for obtaining false-positive results are high, especially when diseases are occurring endemically.

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

² Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre – RS, 91540-000, Brasil. * Autor para correspondência: rppvvet@hotmail.com

³ Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde, 6000, Eldorado do Sul, RS/Brasil, 92990.000.

⁴ Laboratório de protozoologia, FAVET, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS/Brasil, 91540.000.

⁵ Laboratório de diagnóstico molecular, Instituto de biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, Caxias do Sul, RS/Brasil, 95070 – 560.

⁶ Laboratório de virologia, FAVET, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS/Brasil, 91540.000.

⁷ Departamento de Medicina veterinária preventiva, FAVET, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS/Brasil, 91540.000.

Estudo Caso Controle Avaliando a Frequência dos Principais Agentes Potencialmente Causadores de Diarréia Neonatal em Suínos

RESUMO

Vários são os agentes infecciosos que causam diarréia em suínos no período neonatal. As principais conseqüências são a redução no ganho de peso diário, piora na conversão alimentar e aumento da mortalidade. O presente trabalho teve como objetivo identificar os principais agentes virais (rotavírus), bacterianos (*E. coli*, *Clostridium perfringens* tipo A e C e *Clostridium difficile*) e parasitários (coccídeos e *Cryptosporidium* spp.) envolvidos nas diarréias neonatais de suínos, em amostras de fezes de leitegadas com e sem diarréia provenientes de granjas comerciais localizadas no estado do Rio Grande do Sul. Foram coletadas 276 amostras de fezes em 28 granjas localizadas no Estado do Rio Grande do Sul, 147 de leitegadas “caso” e 129 de leitegadas “controle”. Os agentes mais freqüentemente encontrados nas granjas foram os coccídeos (42,86%) e o rotavírus (39,29%). Nas leitegadas caso, o agente mais freqüente foi o *Clostridium perfringens* tipo A (7,5%) e nas leitegadas controle, os coccídeos e o *Clostridium difficile*. Nenhum dos agentes pesquisados apresentou associação significativa com a diarréia presente nas leitegadas caso. Apenas o *Clostridium perfringens* tipo A ($p=0,16$) e o rotavírus ($p=0,20$) demonstraram uma tendência de serem mais freqüentes nessas leitegadas. Em nenhuma granja havia surto de diarréia em leitões jovens no momento da amostragem, sendo possível que os agentes enteropatogênicos estivessem presentes de forma endêmica. A infecção pelo *Clostridium difficile* foi diagnosticada em 13,6% das leitegadas, mas não houve relação entre a infecção e a diarréia. Apenas 29,34% das amostras foram positivas para pelo menos um agente. É possível que uma diarréia nutricional, relacionada com alterações morfológicas e fisiológicas do trato gastrintestinal, fosse a origem da diarréia nos casos em que não foi encontrado nenhum entre os agentes pesquisados. Os resultados obtidos indicam a necessidade de cuidados especiais quando da coleta de amostras para diagnósticos de monitoria de diarréias no período neonatal, pois é alta a chance de se obterem resultados falso positivos, especialmente nos casos em que as doenças estiverem ocorrendo numa forma endêmica.

Palavras-chave: diarréia neonatal, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* tipo A

INTRODUÇÃO

Entre as atividades adotadas para maximizar a produção suinícola nas últimas décadas, sobressai uma substituição progressiva das criações extensivas por intensivas (confinadas). Nesse novo contexto as diarreias, principalmente na primeira semana de vida do leitão ganharam grande importância, pois a sua ocorrência depende do efeito sinérgico do agente infeccioso com diversos fatores de risco, como a dificuldade de acesso ao colostro e leite, higiene inadequada das instalações, ambiente desfavorável e baixa imunidade da matriz (Barcellos, 2002).

As diarreias no período pré-desmame causam aumento significativo na mortalidade, piora na conversão alimentar e ganho de peso diário, além de gastos excessivos com medicamentos (Tubbs et al. 1993, Wittum et al. 1995, Dewey et al. 1995, Johansen et al. 2004).

Em muitos trabalhos sobre esse tema, podem ser encontradas falhas na amostragem, a investigação se restringir à análise pontual de problema de diarreia, falta de informações sobre a utilização de antimicrobianos, coccidiostáticos e/ou probióticos e a pesquisa de apenas um agente infeccioso sem a realização do diagnóstico diferencial (Morin et al. 1983, Fitzgerald et al. 1988, Wieler et al. 2001).

Uma forma de verificar a real participação dos agentes patogênicos no desenvolvimento das diarreias é através de estudos do tipo caso-controle, utilizando animais da mesma idade, provenientes da mesma granja, onde os “casos” são as leitegadas que apresentam diarreia e os “controles” são aquelas sem diarreia.

Os principais agentes causadores de diarreia neonatal de leitões podem ser divididos em virais (rotavírus e coronavírus), bacterianos (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* tipo A e C e o *Clostridium difficile*) e parasitários (*Isospora suis*, *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp.) (Wieler et al. 2001, Calderaro et al. 2001, Yaeger et al. 2002).

O presente trabalho teve como objetivo identificar os principais agentes bacterianos, parasitários e virais potencialmente envolvidos nas diarreias neonatais de suínos, em amostras de fezes de leitegadas com e sem diarreia provenientes de granjas comerciais localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de maio a setembro de 2007 foram coletadas amostras de fezes e suabes retais de 276 leitegadas de 28 unidades produtoras de leitões (UPL's) com mais de 200 matrizes, pertencentes a 6 agroindústrias do Estado do Rio Grande do Sul: 147 leitegadas com diarreia (casos) e 129 leitegadas sem diarreia (controles) com idade entre 1 e 7 dias de vida. As leitegadas classificadas como “com diarreia” apresentavam dois ou mais leitões com a consistência das fezes variando de cremosa a líquida e as leitegadas “sem diarreia” eram aquelas onde a consistência das fezes era normal ou pastosa. Procurou-se respeitar o critério de que, para cada leitegada caso, uma leitegada controle fosse escolhida com a mesma idade ou com no máximo 1 dia de diferença. Em todas as UPL's pesquisadas era usada uma bacterina contra *E. coli* enterotoxigênica nas matrizes no terço final da gestação, com o objetivo de prevenir a colibacilose neonatal.

Amostras. Todas as amostras de fezes e suabes retais (constituídas de “pools” de dois ou mais leitões) foram coletadas diretamente da ampola retal de animais não submetidos a medicações antimicrobianas e/ou coccidiostáticos. A seguir as fezes foram acondicionadas em coletores universais estéreis e os suabes em meio de transporte de Stuart e armazenados a uma temperatura de 2 a 8° C por, no máximo, 24 horas. Após esse período os suabes retais eram encaminhados para os exames bacteriológicos e as amostras de fezes divididas em alíquotas, duas delas para exames parasitológicos e duas outras congeladas a -20° C e enviadas para exames virológicos e imunoenzimático (ELISA).

Exames bacteriológicos. Os suabes retais foram semeados em ágar sangue ovino a 5% e ágar Mac Conkey e incubados a 37° C por 24 horas, em aerobiose. O diagnóstico de colibacilose neonatal era feito quando mais de 80% das colônias eram beta hemolíticas e apresentavam características fenotípicas compatíveis com as da *E. coli* (Barcellos et al. 1980). Para o isolamento do *Clostridium perfringens* as amostras foram semeadas em ágar seletivo SPS⁸ e incubadas em jarra de anaerobiose contendo uma atmosfera de 5% CO₂, 5% H₂ e 80% N₂, na presença de catalisador de paládio, a 37° C por 24 horas (Angelotti et al. 1962). As amostras que apresentavam mais de 20% das colônias com coloração preta (características do *Clostridium perfringens* quando semeado no ágar SPS) foram congeladas a -20° C e encaminhadas para tipificação do agente através da reação em cadeia da polimerase (PCR *multiplex*). O *C. perfringens* foi

⁸ SPS AGAR (Sulfite-polymyxin-sulfadiazine) HiMedia[®], Mumbai, India

diagnosticado como tipo C (CpC) quando as amostras eram positivas para genes *cpa* e *cpβ* e do tipo A (CpA) se eram encontrados os genes *cpa* e *cpβ2* seguindo a metodologia descrita por Moreno et al. (2003).

Pesquisa de parasitas. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados através de esfregaços de fezes corados pela técnica de Ziehl Neelsen modificada (Henriksen & Pohlens, 1981; Vítovec et al. 2006), além da pesquisa qualitativa de oocistos de coccídeos (*Eimeria* spp e *Isospora suis*) através da técnica modificada de centrifugação e flutuação em solução saturada de sacarose (Hoffman, 1987). Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados em microscópio de luz com objetiva de 100X e os oocistos de coccídeos em microscópio de epifluorescência sob excitação ultravioleta (340 – 365 nm) com objetiva de 20X.

Pesquisa do rotavírus. Foi realizada através de duas técnicas: Kit comercial de aglutinação em látex (ROTA Rich^{®9}) que detecta apenas o rotavírus do tipo A e a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata (PAGE) de acordo com o método descrito por Herring et al. 1992, para o diagnóstico de outros tipos de rotavírus. Para uma amostra ser considerada positiva para rotavírus no presente trabalho, ela precisaria ser positiva para aglutinação em látex e/ou PAGE

Pesquisa do *Clostridium difficile*. O exame foi realizado numa parte das amostras de fezes coletadas (n=132), sendo 66 amostras de fezes diarréicas e 66 amostras de fezes não diarréicas, com o objetivo de avaliar qualitativamente e quantitativamente a presença das toxinas A e B, utilizando um teste de ELISA comercial¹⁰.

Análise estatística. Foi usado o teste de qui-quadrado e de regressão logística univariada para medir a probabilidade de que as diferenças encontradas nos grupos caso (com diarréia) e controle (sem diarréia) fossem devidas ao acaso ou à presença de algum agente enteropatogênico (SAS 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados da frequência, nas UPL's, dos agentes infecciosos pesquisados constam na Tabela 1. Observou-se que os principais agentes envolvidos na diarréia neonatal estavam presentes na maioria das UPL's pesquisadas. Em 25 (89,28%) das 28 granjas, pelo menos um agente pode ser diagnosticado nas amostras fecais, sendo os

⁹ Rota Rich[®] Hemocor Indústria e Comércio - Brasil

¹⁰ Ridascreen *Clostridium difficile* toxin A/B[®] R-Biopharm, Darmstadt, Germany

coccídeos os mais freqüentes (42,86%). Valores semelhantes foram encontrados no estado de Minas Gerais por Rostagno et al. (1999) que constataram que 42,5% ($n=40$) das granjas pesquisadas foram positivas para oocistos de coccídeos nas fezes de leitões lactentes, porém outros trabalhos encontraram valores muito superiores, chegando a 76,2% ($n=21$) em granjas no estado de São Paulo (Calderaro et al. 2001). O rotavírus foi o segundo agente mais freqüente, presente em 39,29% das granjas ($n=11$). Resultados semelhantes foram encontrados por Yaeger et al. (2002) nos Estados Unidos, em que 42% das granjas foram positivas para o rotavírus em amostras de fezes de leitões de 1 a 7 dias de vida. No Brasil, outros trabalhos determinaram a ocorrência do rotavírus em granjas comerciais, com resultados variando entre 47% a 89,2% (Calderaro et al. 2001; San Juan et al. 1985), todavia, nenhum analisou amostras coletadas exclusivamente na primeira semana de vida dos leitões, induzindo assim a uma maior ocorrência do agente, já que a infecção é mais freqüente a partir da segunda semana de idade. Na maioria das UPL's, dois ou mais agentes foram diagnosticados, porém nenhuma combinação entre enteropatógenos foi predominante. Em 10,71% das granjas ($n=3$) não houve diagnóstico positivo para nenhum dos agentes pesquisados.

A Tabela 2 sumariza a freqüência dos diversos enteropatógenos pesquisados. Das 276 leitegadas amostradas, 29,34% ($n=81$) foram positivas para pelo menos um agente, sendo os coccídeos os mais freqüentes (7,2%). O *Clostridium perfringens* tipo A (8,8%) e o rotavírus (7,5%) foram os principais agentes diagnosticados nas amostras pertencentes às leitegadas com diarreia. Nas leitegadas sem diarreia, os coccídeos (8,5%) e o *C. difficile* (16,6% - 11/66) foram os agentes mais freqüentemente encontrados. Em 11 amostras, foram diagnosticados mais de um agente patogênico, sendo seis, nas leitegadas com diarreia e 5 nas leitegadas sem diarreia. Nenhuma associação entre os enteropatógenos foi predominante.

Nenhum agente pesquisado no experimento mostrou diferença significativa na presença ($p<0,05$) entre as leitegadas caso e controle. As hipóteses mais prováveis para explicar esses resultados serão divididas por agente, a seguir: segundo Yaeger et al. (2007) a detecção das toxinas A e B do *C. difficile* não representa um bom indicador para a presença ou ausência de diarreia. Em um estudo caso-controle recente, os mesmos autores observaram que a maioria (59%) dos leitões positivos para as toxinas A e B não apresentavam diarreia (fezes normais) quando comparados com os leitões negativos para as duas toxinas (25%), ($p<0,001$). Os autores comentam sobre o possível caráter subclínico da infecção pelo agente. Além disso especula-se que possa haver

algum outro fator, além das toxinas A e B, que seja essencial para o desencadeamento da diarreia (Yaeger et al. 2007). Não foi observada associação entre a maior quantidade de toxinas detectadas nas fezes e diarreia ($p=0,35$). Yaeger et al. (2007) observaram que, nas amostras onde a quantidade de toxinas A e B eram mais altas, a maioria dos animais (67%) encontravam-se constipados e/ou com a consistência das fezes normais.

Para o *Cryptosporidium* spp., além de não haver associação entre a diarreia e a presença de oocistos nas fezes, a quantidade de oocistos desse agente encontrados em todas as amostras positivas foi baixa (1–2 oocistos por lâmina). Diversos autores em diferentes países demonstraram que não há associação entre a ocorrência de diarreia e a presença de oocistos nas fezes, principalmente em leitões com baixo nível de infecção pelo *Cryptosporidium* spp.. A explicação dada pela maioria dos autores é que as diarreias observadas provavelmente tenham sido causadas por outros agentes e o *Cryptosporidium* spp. agiria como um agente oportunista, causando apenas lesões superficiais e atingindo poucas células ou áreas epiteliais limitadas, não sendo suficiente para causar diarreia. De outra parte, esses trabalhos não realizaram o diagnóstico diferencial para outros enteropatógenos em potencial (Xiao et al. 1994, Quílez et al. 1996, Guselle et al. 2003, Vitovec et al. 2006).

As amostras de fezes positivas para os coccídeos, tanto nas leitegadas caso quanto nas leitegadas controle, apresentavam baixo número de oocistos e não houve relação entre a diarreia e a presença de oocistos nas fezes ($p=0,44$). Resultados semelhantes foram observados por Sayd & Kawazoe (1996) no Brasil, onde 58,5% dos leitões com amostras de fezes positivas para os coccídeos apresentavam diarreia. Uma possível explicação seria o fato de que os leitões infectados com o *Isoospora suis* podem ter a excreção de oocistos antes do início da diarreia (Koudela & Koucerová 1999, Bach et al. 2003). Além disso, quando a dose infectante for baixa, o leitão pode desenvolver uma enterite e os oocistos de coccídeos podem ser detectados nas fezes, mas a diarreia está ausente pela baixa gravidade das lesões. Outra possibilidade seria nos casos em que, apesar de ocorrerem perdas expressivas de fluidos no intestino delgado, o excesso gerado fosse absorvido no intestino grosso e as fezes apresentassem um aspecto “normal”, resultando em um caso de enterite no intestino delgado clinicamente cursando sem diarreia (Mundt et al. 2006).

Apesar das amostras positivas para o rotavírus não demonstrarem diferença significativa entre as leitegadas caso e controle, houve uma tendência ($p=0,20$) de que o agente fosse mais frequente nas leitegadas “caso”. Diferença significativa foi

encontrada por Barry et al. (2007a), que observaram que as amostras de fezes positivas para o rotavírus do grupo A tinham 4,36 vezes mais chance ($p < 0,0001$) de serem diarreicas. No presente trabalho, para que uma amostra fosse considerada positiva para o rotavírus, ela precisaria ser positiva no teste de aglutinação em látex e/ou no PAGE. Esse critério adotado poderia aumentar indiretamente o número de leitogadas controles com diagnóstico positivo para rotavírus. A alta positividade para rotavírus entre os controles poderia advir do fato de que alguns leitões estivessem excretando uma baixa quantidade de partículas virais sem apresentarem diarreia, mas com positividade pelo teste de aglutinação em látex. Leitões infectados podem eliminar o vírus independentemente de estarem ou não com diarreia (Markowska-Daniel et al. 1996). Leitões com diarreia causada pelo rotavírus excretam geralmente grandes quantidades de partículas virais (10^{12}) e por isso o PAGE, apesar da sua baixa sensibilidade, tem sido a técnica mais usada para a detecção dos rotavírus de suínos (Herring et al. 1982). Das 16 amostras diagnosticadas, apenas 2 foram positivas para o rotavírus do tipo A, o restante além de serem negativas para o teste de aglutinação em látex apresentaram um padrão eletroforético diferente do rotavírus do tipo A no PAGE. Morilla et al. (1991) sugere os rotavírus pertencentes aos grupos B, C, D e E, geralmente infectam leitões mais novos quando comparados com o rotavírus do grupo A.

O *Clostridium perfringens* foi positivo em 7,6% (21/276) das amostras através do isolamento bacteriano. Todas elas foram tipificadas através da PCR *multiplex* e classificadas como do tipo A, exceto em duas, pois foram positivas para o *cpa* e negativas para o *cpb2*. Nenhuma amostra foi positiva para *C. perfringens* tipo C. Assim como no rotavírus, os diagnósticos positivos para CpA apresentaram tendência de serem mais frequentes em leitogadas com diarreia ($p=0,16$). Yaeger (2007) confirma essa tendência em um estudo utilizando 77 leitões com menos de 7 dias de vida, sendo 25 caso e 52 controle. Os autores observaram que as amostras de fezes de 20 (26%) leitões foram positivas para o *C. perfringens* tipo A, através da detecção do *cpa* e o *cpb2* na ausência de outros enteropatógenos e que 95% (19/20) apresentavam diarreia.

As diarreias, principalmente no período neonatal, são multifatoriais e a presença de um agente infeccioso isoladamente não é suficiente para o desenvolvimento da diarreia. Muitos outros fatores podem apresentar ação sinérgica no desencadeamento das diarreias, incluindo os distúrbios ambientais, imunológicos, nutricionais e de manejo (Wittum et al. 1995, Dewey et al. 1995, Barcellos 2008). Outra hipótese para explicar a ausência de diferença significativa entre as leitogadas caso e controle seria o

fato de que as amostras foram coletadas em granjas que não estavam apresentando diarreia em leitões jovens na forma de surtos no momento da amostragem, sendo provável que nas mesmas os agentes enteropatogênicos estivessem presentes de forma endêmica. É possível e mesmo provável que, a coleta em situações de alto desafio (na forma de surtos epidêmicos) pudesse ter resultado numa maior frequência de resultados positivos em leitegadas “caso”.

Um resultado inesperado foi ausência de diagnóstico para a colibacilose neonatal, dentro da metodologia adotada. Em muitas placas houve crescimento de colônias hemolíticas com características de *E. coli*, todavia em nenhuma delas houve crescimento de cultura dentro do critério adotado para definir a positividade (acima de 80% de colônias hemolíticas nas placas). Resultados positivos para colibacilose são encontrados especialmente em granjas que apresentam surtos de diarreia neonatal com alta mortalidade até o terceiro dia de vida. O diagnóstico laboratorial geralmente revela cultivo abundante (acima de 80%) de *E. coli* em ágar sangue e presença predominante de colônias produtoras de hemólise (Barcellos et al. 1980). Além disso, em todas as granjas pesquisadas, as fêmeas eram vacinadas no terço final da gestação para a colibacilose neonatal.

Apenas 81 (29,34%) amostras foram positivas para um ou mais entre os agentes pesquisados, sendo 42 (52%) nas leitegadas “caso”. Diversos trabalhos com objetivo de obter a frequência dos principais agentes enteropatogênicos no período neonatal também apresentaram amostras negativas, podendo corresponder a 57,6% dos casos (Wieler et al. 2001). A hipótese mais provável para explicar a negatividade nos exames laboratoriais seria a ocorrência de “diarreias nutricionais” ou “não infecciosas”, relacionadas principalmente com alterações na morfologia e/ou fisiologia do trato gastrointestinal (Alexander 1981). A ingestão insuficiente de colostro é citada por diversos autores como sendo uma causa provável de diarreia não infecciosa em leitões neonatos (Jennings 1959, Jensen et al. 2001). A diarreia ocorre não só pela baixa ingestão de imunoglobulinas, mas também pela falta de desenvolvimento e maturação intestinal precoce (Xavier et al. 2006). Outros autores citam que a ingestão de leite em excesso seria uma das principais causas de diarreia nutricional em leitões novos (Jennings 1959, Alexander 1981). Fêmeas com boa produção leiteira e leitões vigorosos são considerados fatores de risco para as diarreias na fase de aleitamento (Jennings, 1959). Ele sugere que nos leitões a diarreia possa ser causada pela passagem excessivamente rápida do leite do estômago para o intestino, antes de uma digestão

gástrica eficiente (principalmente pela lipase gástrica), o que poderia resultar em diarreia. Contudo, novos estudos são necessários para elucidar a real importância dessas causas nutricionais no desenvolvimento de diarreias em leitões no período neonatal.

Outros patógenos causadores de diarreia não foram pesquisados no presente trabalho e poderiam estar envolvidos com as diarreias. Podem ser citados o Calicivírus (Barry et al. 2007b), Picobirnavírus (Trevisol & Roehle 1993), *Strongyloides ransomi* (Nishi et al. 2000) e o *Enterococcus durans* (Yaeger et al. 2002). Em diversos estudos, o coronavírus e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS) têm sido associados à diarreia em leitões na primeira semana de vida (Johnson et al. 1992, Yaeger et al. 2002). No Brasil, Brentano et al. (1985) através da pesquisa de anticorpos neutralizantes para o vírus em 5859 reprodutores, em 24 municípios do estado de Santa Catarina, não verificaram animais soropositivos para o coronavírus e em apenas 2 plantéis do Estado de São Paulo, foi confirmado sorologicamente a presença da infecção. A baixa ocorrência da infecção do coronavírus no Brasil talvez possa estar relacionada à grande sensibilidade do vírus ao calor, o que dificulta a sua sobrevivência em países de clima tropical (Saif & Wesley 1999).

Yaeger et al. (2002) encontraram o vírus da PRRS causando diarreia neonatal em 10% dos leitões submetidos a diagnóstico nos EUA. Até o momento, esse vírus não foi diagnosticado no rebanho brasileiro (Silva et al., 2007) e, por esse motivo, não foi pesquisado no presente trabalho.

A figura 1 descreve a associação entre a idade das leitegadas e a predisposição à diarreia. Observa-se que a maioria das amostras de fezes diarreicas (69%) foi proveniente de leitegadas com até 3 dias de vida. Observou-se que as leitegadas com 1 dia tiveram 2,28 vezes mais chance de ter diarreia comparada com leitegadas com mais de 5 dias de vida ($p=0,014$). Tubbs et al. (1993), em um estudo que objetivou a determinação das principais causas de morbidade e mortalidade no período pré-desmame nos EUA, observaram que 65% dos casos de diarreia na primeira semana de vida ocorriam entre os dias 1 e 3.

A distribuição dos enteropatógenos com relação à idade é apresentada na tabela 3. O CpA (14,95%), os coccídeos (9,23%) e os coccídeos (20,51%) novamente, foram os agentes mais frequentes em leitegadas com 1 e 2 dias, 3 e 4 dias e acima de 5 dias respectivamente.

O CpA obteve sua maior frequência em leitegadas com 1 e 2 dias de vida. Uma das explicações mais aceitas para esse fato seria que as toxinas beta são sensíveis à

tripsina que, em leitões recém nascidos, encontram-se no trato gastrintestinal em níveis muito baixos, devido a fatores inibidores da tripsina presentes no colostro (Niilo 1993). Tanto coccídeos quanto o *Cryptosporidium* spp. não obtiveram diagnóstico em leitegadas com 1 e 2 dias de vida, condizendo com resultados presentes na literatura. Segundo Enemark et al. (2003), o início da excreção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes pode variar de 2 a 9 dias após a infecção, já para os coccídeos, o período pré-patente é variável e depende principalmente da idade em que ocorreu a infecção, o *status* sanitário do animal e a técnica diagnóstica utilizada, e normalmente inicia 5 dias após a infecção (Mundt et al. 2006). Todas as amostras positivas para a infecção do *C. difficile* foram coletadas de leitões com idade entre 1 e 4 dias de vida. Assim como as toxinas beta do *Clostridium perfringens*, as toxinas A e B do *C. difficile* são destruídas pela ação da tripsina, fazendo com que a ocorrência de casos de infecção por esse agente concentrem-se no início do período neonatal (Voth & Ballard 2005).

CONCLUSÃO

- a) Os agentes mais freqüentemente encontrados nas UPL's pesquisadas foram: Coccídeos (n=12), rotavírus (n=11) e *C. difficile* (n=10) sendo que a maioria das UPL's apresentaram mais de um agente diagnosticado;
- b) Os agentes encontrados com maior freqüência nas leitegadas com diarreia (caso) foram o *C. perfringens* tipo A (13/147) e o rotavírus (11/147). Já nas leitegadas sem diarreia (controle), os agentes mais freqüentes foram os coccídeos (11/129) e o *C. difficile* (11/129);
- c) Nenhum dos agentes pesquisados demonstrou diferença na freqüência entre as leitegadas caso e controle ($p > 0,05$), todavia o *C. perfringens* tipo A ($p = 0,16$) e o rotavírus ($p = 0,20$) apresentaram tendência 1,99 vez maior de ser encontrada nas leitegadas caso;
- d) Nenhuma amostra pesquisada foi positiva para a presença da *E. coli* hemolítica, provavelmente porque nas UPL's pesquisadas não estava ocorrendo surto com característica de colibacilose neonatal;
- e) Foi realizado o primeiro diagnóstico da infecção pelo *C. difficile* em suínos no Brasil, sendo que todas as amostras apresentavam idade menor ou igual a 4 dias de vida;
- f) 71,4% das leitegadas caso foram negativas para todos os agentes pesquisados;

- g) 69% das leitegadas afetadas tinham até 3 dias de idade, sendo que as leitegadas com 1 dia tiveram 2,29 vezes mais chance de apresentarem diarreia quando comparadas com as de mais de 5 dias ($p=0,014$);
- h) Todas as amostras positivas para o *Cryptosporidium* spp. e os coccídeos foram diagnosticados em leitegadas com idade maior ou igual a 3 dias de vida.

REFERÊNCIAS

Alexander T.J.L. 1981. Piglet diarrhoea: A guide to diagnosis and control. Br. Vet. J. 137: 651-662.

Angelotti R., Hall H.E., Foter M.J. & Lewis K.H. 1962. Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. Appl. Microbiol. 10:193-199.

Bach U., Kalthoff V., Mundt H.C., Popp A., Rinke M., Dauschies A. & Lüttge B. 2003. Parasitological and morphological findings in porcine isosporosis after treatment with symmetrical triazintriones. Parasitol Res. 91: 27-33.

Barcellos D.E.S.N., Guizzardi I.I. & Falavena L.C.B. 1980. Frequência e causa de diarreias bacterianas em suínos nas zonas criatórias do Vale do Taquari e Missões; Rio Grande do Sul; Brasil. Bol. IPVDF. 80: 27-37.

Barcellos D.E.S.N. 2002. Avaliação de medidas de controle para as principais formas de diarreia em suínos. Anais. I Simpósio Latino Americano de Suinocultura, Foz do Iguaçu, Paraná, p. 130-142.

Barcellos D.E.S.N. 2008. FAVET-UFRGS comunicação pessoal

Barry A.F., Linares R.C., Alfieri A.F., Feronato C., Grieder W. & Alfieri, A.A. 2007a. Frequency rate of group a rotavirus in diarrheic suckling piglets from unvaccinated brazilian pig herds. Anais. XIII Congresso da Abraves, Florianópolis, Santa Catarina.

Barry A.F., Alfieri A.F., Feronato C., Grieder W. & Alfieri, A.A. 2007b. Frequency of porcine enteric calicivirus infection in Brazilian pig herds. Anais. XIII Congresso da Abraves, Florianópolis, Santa Catarina.

Brentano L., Flores R.M.S., Marques J.L., Rowe C.A. & Romero C.H. 1984. Evidência sorológica da presença da gastroenterite transmissível no Brasil. Anais I Congresso 7 da Abraves, Curitiba, Paraná, p. 133.

Calderaro F.F., Baccaro M.R., Moreno A.M., Ferreira A.J.P., Jerez A.J. e Pena H.J.F. 2001. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol. 68: 29-34.

Dewey C.E., Wittum T.E., Hurd H.S., Dargatz D.A. & Hill G.W. 1995. Herd and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 4-14 days of age. *Swine Health and Production*. 3: 105-112.

Enemark H.L., Ahrens P., Bille-Hansen V., Heegaard P.M.H., Vigre H., Thamsborg S.M. & Lind P. 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the porcine genotype. *Parasit*. 126: 407-416.

Fitzgerald G.R., Barker T., Welter M.W. & Welter C.J. 1988. Diarrhea in young pigs: Comparing the incidence of the five most common infectious agents. *Vet. Med.* 83: 80-86.

Guselle N. J., Appelbee A.J. & Olson M.E. 2003. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Vet. Parasitol.* 113: 7-18.

Herring A.J., Inglis N.F., Ojeh C.K., Snodgrass D.R. & Menzies J.D. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16: 473-477.

Henriksen S.A. & Pohlens J. 1981. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand.* 22: 594-596.

Hoffman R.P. 1987. Exame parasitológico de fezes, p. 24 – 59. In: Hoffman R.P. (ed). *Diagnóstico de Parasitismo Veterinário*. Sulina, Porto Alegre.

Jennings A.R. 1959. Gastro-enteritis in the pig. *Vet. Rec.* 71: 766-771.

Jensen A.R., Elnif J., Burrin D.G. & Sangild P.T. 2001. Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs diet dependent. *J. Nutr.* 131: 3259-3265.

Johansen M., Alban L., Kjærsgard H.D. & Bækbo P. 2004. Factors associated with suckling piglet average daily weight gain. *Prev.Vet.Med.* 63: 91-102.

Johnson M.W., Fitzgerald G.R., Welter M.W. & Welter C.J. 1992. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. *Vet. Med.* 87: 382-386.

Koudela B. & Kučerová S. 1999. Role of acquired immunity and natural age resistance on course of *Isospora suis* coccidiosis in nursing piglets. *Vet. Parasitol.* 82:93-99.

Markowska-Daniel I., Winiarczyk S., Gradzki Z. & Pejsak Z. 1996. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 219-232.

Moreno A.M., Baccaro M.R., Ferreira A.J.P., Hirose F. & Campos D.S. 2003. Detection of $\beta 2$ toxin gene from *Clostridium perfringens* isolated in diarrheic piglets. *Arq. Inst. Biol.* 70: 135-138.

- Morilla A., Arriaga C., Ruiz A., Martínez A.G., Cigarroa R. & Velázquez A. 1991. Association between diarrhoea and shedding of group A and atypical groups B to E rotaviruses in suckling pigs. *Ann. Rech. Vét.* 22: 193-200.
- Morin M., Turgeon D., Jolette J., Ribinson Y., Phaneuf J.B., Sauvageau R., Beauregard M., Teusher E., Higgins R. & Larivière S. 1983. Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: Infectious causes of significant outbreaks. *Can. J. Comp. Med.* 47: 11-17.
- Mundt H.C., Joachim A., Becka M. & Dauschies A. 2006. *Isoospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. *Parasitol. Res.* 98: 167-175.
- Niilo L. 1993. Enterotoxemic *Clostridium perfringens*, p.114 – 123. In: Gyles C.L. & Thoen C.O. (ed). *Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals*. Iowa State University Press, Ames.
- Nishi S.M., Gennari S.M., Lisboa M.N.T.S., Silvestrim A., Jr. Caproni L. & Umehara O. 2000. Parasitas intestinais em suínos confinados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Arq. Inst. Biol.* 67:199-203.
- Quílez J., Sánchez-Acedo C., Clave A., Del Cacho E. & López-Bernad F. 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 56: 345–348.
- Rostagno M.H., Bicalho K.A., Lage A.P., Martins N.E., Leite R.C. & Leite R.C. 1999. Prevalência de *Isoospora suis* em leitões de granjas comerciais de ciclo completo. *Anais. IX Congresso da Abraves, Belo Horizonte, Minas Gerais*, p. 195.
- Saif L.J. & Wesley R.D. 1999. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus, p. 295-325. In Straw B.E., D’Allaire S., Mengeling W.L. & Taylor D.J. (ed.), *Disease of Swine*. Iowa State University Press, Ames.
- San Juan C.S., Waack R.S., Bellinzoni R. & Scodeller E.A. 1985. Ocorrência de rotavirose em leitões em rebanhos da região leste do estado de São Paulo. *Anais. II Congresso de Abraves, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro*, p. 135.
- SAS Institute INC. 1999. *SAS user’s guide: statistics*. Cary, North Carolina.
- Sayd S.M.O. & Kawazoe U. 1996. Prevalence of porcine neonatal isosporosis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 67: 169-174.
- Silva S.C., Schiochet M.F., Dambros R.M.F., Zimmerman, J. & Ciacci-Zanella J.R. 2007. Estudo sorológico da infecção pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS) em leitões de crescimento. *Anais. XIII Congresso da Abraves, Florianópolis, Santa Catarina*.
- Trevisol I.M. & Roehe P.M. 1993. Presença de picobirnavirus em fezes normais e diarreicas de leitões de maternidade. *Anais. VI Congresso da Abraves, Goiânia, Goiás*, p.77.

Tubbs R.C., Hurd H.S., Dargatz D.A. & Hill G.W. 1993. Prewaning morbidity and mortality in the United States swine herds. *Swine Health and Production*. 01: 21-28.

Vitovec J., Hamadejová K., Landová L., Kvác M., Kventonová D. & Sak B. 2006. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J. Vet. Med. B*. 53: 239-243.

Voth D.E. & Ballard J.D. 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin. Microb. Rev.* 18: 247-263.

Wieler L.H., Ilieff A., Herbst W., Bauer C., Vieler E., Bauerfeind R., Failing K., Klös H., Wengert D., Baljer G. & Zahner H. 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. *J. Vet. Med. B*. 48: 151-159.

Wittum T.E., Dewey C.E., Hurd H.S., Dargatz D.A. & Hill G.W. 1995. Herd and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea, morbidity and mortality in piglets 1 to 3 days of age. *Swine Health and Production* 3: 99-104.

Xavier E.G., Rutz F. & Roll V.F.B. 2006. Imunonutrientes na produção de suínos. *Anais. I Simpósio UFRGS de Produção Reprodução e Sanidade Suína*, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, p.174-195.

Xiao L., Herd R.P. & Bowman G.L. 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. *Vet. Parasitol.* 52: 331-336.

Yaeger M.J. 2007. Prospective and retrospective studies on *Clostridium perfringens* type A enteritis in neonatal swine. *Proc. 38th A.A.S.V. annual meeting*, Ames, Iowa. p. 101-104.

Yaeger M.J., Funk N., Hoffman L. A. 2002. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 281-287.

Yaeger M.J., Kinyon J.M. & Songer J.G. 2007. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 52-59.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Frequência dos principais agentes enteropatogênicos causadores de diarreia neonatal em 28 unidades produtoras de leitões localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Agentes	Nº de UPL's (n=28)	%
Coccídeos	12	42,86%
Rotavírus	11	39,29%
<i>Clostridium difficile</i>	10	35,71%
<i>Clostridium perfringens</i> A	8	28,57%
<i>Cryptosporidium</i> spp.	6	21,43%
Sem diagnóstico	3	10,71%
TOTAL	50*	

* Na maioria das UPL's, mais de um agente foi diagnosticado

Tabela 2. Frequência dos principais agentes enteropatogênicos diagnosticados nas leitegadas caso (n=147) e controle (n=129) com idade entre 1 e 7 dias de vida no período de maio a setembro de 2007, em 28 unidades produtoras de leitões localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Agentes	Leitegadas caso (n=147)		Leitegadas controle (n=129)		Razão de chance	IC (95%)	p	
	n	%	n	%				
	<i>E. coli</i> hemolítica	0	0,0	0				0,0
CpC	0	0,0	0	0,0				
CpA	13 [§]	8,8	6 [£]	4,6	1,99	0,68	6,08	0,16
Rotavírus	11 [□]	7,5	5 [¢]	3,9	2,01	0,62	6,84	0,20
Coccídeos	9 [#]	6,1	11 [*]	8,5	0,70	0,26	1,89	0,44
<i>C. difficile</i> **	7	10,6	11	16,6	0,59	0,19	1,81	0,31
<i>Crypto. spp.</i>	2	1,4	6	4,6	0,28	0,04	1,58	0,10
TOTAL	42		39					

[§] 1 leitegada positiva para *C. difficile* e CpA

[£] 1 leitegada positiva para *C. difficile* e CpA e 1 leitegada positiva para *Crypto. spp.* e CpA

[□] 1 leitegada positiva para rotavírus e *C. difficile*, 1 leitegada positiva para rotavírus e CpA

[¢] 1 leitegada positiva para rotavírus e *C. difficile*

[#] 2 leitegadas positivas para coccídeos e rotavírus e 1 leitegada positiva para coccídeos e *C. difficile*

^{*} 1 leitegada positiva para coccídeos e *Crypto. spp.* e 1 leitegada positiva para coccídeos e *C. difficile*

** n=132 (66 caso e 66 controle)

CpC = *Clostridium perfringens* tipo C

CpA = *Clostridium perfringens* tipo A

Crypto. spp. = *Cryptosporidium* spp.

I.C. = Intervalo de confiança

Tabela 3: Distribuição da frequência dos agentes enteropatogênicos em relação à idade das leitegadas, provenientes de 28 unidades produtoras de leitões no Estado do Rio Grande do Sul no período de maio a setembro de 2007.

Agentes	Idade (dias)		
	1 e 2	3 e 4	> 5
<i>C. perfringens</i> tipo A	14,95 ^a (16/107)	1,54 ^b (2/130)	2,56 ^b (1/39)
Rotavírus	6,54 ^{ab} (7/107)	2,31 ^a (3/130)	15,38 ^b (6/39)
Coccídeos	0,00 ^a (0/107)	9,23 ^b (12/130)	20,51 ^b (8/39)
<i>Cryptosporidium spp.</i>	0,00 ^a (0/107)	1,69 ^{ab} (2/130)	10,26 ^a (4/39)
<i>C. difficile</i>	13,11 ^{ab} (8/61)	18,52 ^a (10/54)	0,00 ^b (0/17)

a,b letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

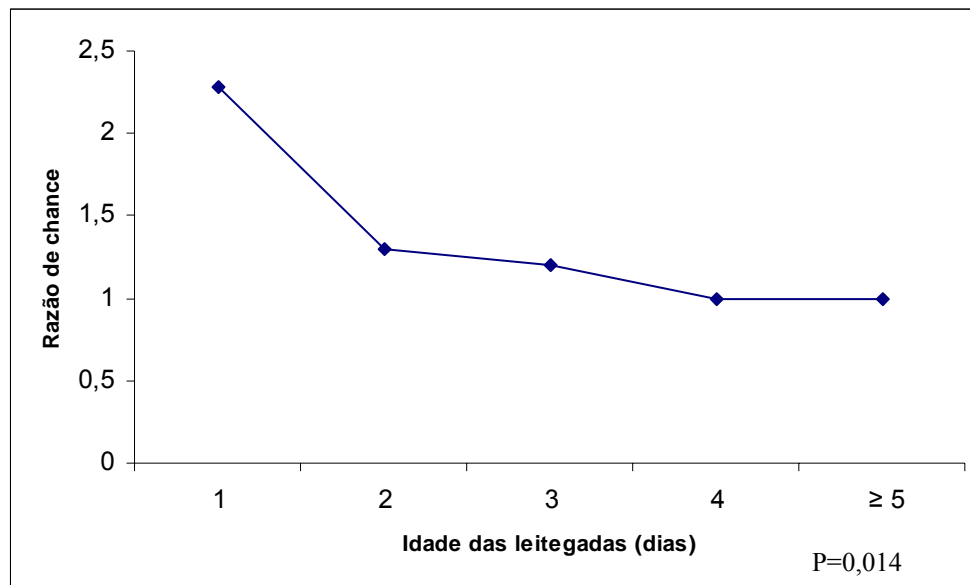


Figura 1: Razão de chance entre a frequência das diarreias e a idade nas leitegadas pesquisadas no período de maio a setembro de 2007 em 28 unidades produtoras de leitões localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diarréias neonatais nos leitões determinam consideráveis prejuízos econômicos para a suinocultura intensiva, como redução do ganho de peso diário e baixo peso ao desmame, aumento da mortalidade na maternidade e maiores gastos com medicamentos. São consideradas multifatoriais e apenas a presença do agente infeccioso não é capaz de desencadear o quadro clínico. Os principais agentes envolvidos geralmente fazem parte da microbiota normal do intestino do leitão e apenas sob condições especiais conseguem exercer o seu efeito patogênico. Esse fato dificulta o diagnóstico final e geralmente uma só técnica não é suficiente para a detecção do agente. Assim, para determinar a causa da doença, é recomendável que seja realizada uma criteriosa avaliação de fatores não infecciosos, a anamnese e observados sinais clínicos e lesões nos animais afetados.

Na prática, quando se analisam as diarréias em leitões na maternidade, os primeiros agentes lembrados são a *E. coli* (geralmente associada à diarréia na primeira semana de vida) e a *Isospora suis* (associada com diarréias a partir da segunda semana). O *Clostridium perfringens* tipo C é lembrado quando o leitão, logo após o nascimento, apresentar uma diarréia hemorrágica, com mortalidade elevada. Houve por anos um investimento maciço em pesquisas e na prevenção desses três agentes, com o desenvolvimento de vacinas, antimicrobianos e coccidiostáticos cada vez mais eficazes. O resultado desse processo, por um lado, foi um controle adequado dos mesmos, porém outros patógenos (*C. perfringens* tipo A e *Clostridium difficile*), que muitas vezes não eram diagnosticados ou apresentavam pouco importância, tiveram um aumento da frequência, principalmente na última década.

Inicialmente, no desenvolvimento da metodologia do atual experimento, pensou-se em coletar fezes apenas de animais com diarréia, realizando um estudo de prevalência. Entretanto, para determinar a real importância do agente infeccioso no desencadeamento da diarréia, optou-se por um estudo caso-controle, utilizando amostras de fezes diarréicas e não diarréicas para os exames bacteriológicos, virais e parasitológicos. Escolheu-se como unidade de coleta um *pool* de fezes de leitões da mesma leitegada, pois para realização de todos os exames propostos no experimento apenas um leitão não geraria volume suficiente de fezes.

Um outro ponto no planejamento do trabalho foi a importância dada à qualidade das amostras coletadas. As granjas eram contactadas previamente à coleta e solicitado que fosse feita a retirada de antibióticos e/ou coccidiostáticos tanto na forma preventiva quanto curativa. Na ocasião da visita para a amostragem todas as granjas visitadas apresentavam diarreia em leitões no período neonatal de forma endêmica, com baixa gravidade, sem características de “surto”.

Diferente do que era esperado, o *Clostridium perfringens* tipo A foi um dos agentes mais frequentemente diagnosticados. Esse resultado está de acordo com uma tendência no aumento da frequência da bactéria em leitões de granjas comerciais nos EUA. Todavia, no trabalho, não houve diferença da frequência do CpA entre as leitegadas com e sem diarreia. O papel desse agente como causador de diarreia em leitões novos é ainda difícil de ser avaliado, pois o mesmo pertence à microbiota normal do intestino do leitão e já pode encontrado nesse local poucas horas após o nascimento. O diagnóstico baseia-se na histopatologia através da detecção de grande quantidade de bacilos Gram-positivos aderidos ao epitélio do intestino delgado, o isolamento de moderada a grande quantidade de colônias características de CpA em anaerobiose e a genotipagem do isolado, com o objetivo de detectar a toxina beta 2 em conjunto com a toxina alfa. Apesar de todas essas etapas, o diagnóstico após a classificação fenotípica do agente e a identificação das toxinas pela PCR ainda é impreciso, pois o fato de detectar os genes codificadores das toxinas beta 2 e alfa não indica que estejam sendo expressas (produzidas). Sendo assim, futuras pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de desenvolver técnicas de diagnóstico capazes de detectar as toxinas diretamente nas fezes. Os resultados obtidos no presente trabalho representam o primeiro registro da ocorrência desse agente em granjas localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Um resultado inesperado foi a ausência de diagnóstico para colibacilose neonatal nas amostras de fezes pesquisadas. Em todas as placas houve crescimento de colônias características de *E. coli*, todavia em nenhuma delas houve crescimento de culturas dentro do critério de positividade adotado (acima de 80% de colônias beta hemolíticas nas placas). Alguns fatores poderiam ser suspeitados como causa desses resultados: nas granjas, apesar do veterinário responsável ter sido avisado previamente para que todos os antimicrobianos fossem retirados das leitegadas a serem amostradas, poderia ter havido falha no cumprimento da recomendação. Além disso, em todas as granjas pesquisadas, as fêmeas eram vacinadas no terço final da gestação para colibacilose

neonatal. Resultados positivos para essa infecção são encontrados geralmente em granjas que apresentam surtos de diarreia neonatal e caracterizam-se por alta mortalidade até o terceiro dia de vida e o diagnóstico laboratorial em surtos geralmente revela cultura pura de *E. coli* beta hemolíticas em ágar sangue. Esse cenário foi diferente do encontrado no presente estudo, onde as granjas, apesar de apresentarem casos de diarreia neonatal, apresentavam sinais clínicos esporádicos e de baixa gravidade. Antes do início do presente trabalho foi realizado um experimento piloto para avaliação da técnica, assim como dos critérios propostos no diagnóstico laboratorial da *E. coli*. Em 2 granjas com surto de diarreia neonatal com alta morbidade e mortalidade, 18 amostras de fezes foram coletadas. Entre elas, 16 apresentaram crescimento puro de *E. coli* beta-hemolítica em placas de ágar sangue. As outras 2 amostras foram positivas apenas para rotavírus. Esse fato sugere a correção das técnicas de diagnóstico que foi utilizado e que a negatividade no exame para *E. coli* realmente representou um resultado válido.

O primeiro registro de infecção pelo *Clostridium difficile* em suínos no Brasil foi obtido no presente trabalho. Sete amostras das leitegadas caso e onze das leitegadas controle foram positivas para as toxinas A e B do *Clostridium difficile*. Apesar de recentemente esse agente ter sido descrito como um dos principais causadores de diarreia em leitões neonatos nos EUA, no presente trabalho não houve diferença entre a presença de toxinas nas fezes e a diarreia. Tentou-se fazer uma correlação entre a quantidade de toxinas detectadas e a presença de diarreia através da análise dos valores da absorbância no teste de ELISA, e novamente não foi encontrada correlação. Especula-se que a infecção pelo *C. difficile* possa ter um caráter subclínico, ou que outro fator de virulência possa estar envolvido no desencadeamento da diarreia. Em humanos, a diarreia causada pelo agente está fortemente associada com antibioticoterapia prévia, principalmente com derivados da penicilina, cefalosporinas e clindamicina. Em suínos, essa relação ainda não foi comprovada.

Uma questão importante que poderia explicar (pelo menos em parte) a falta de associação entre os agentes e a diarreia seria o fato de que todos os agentes pesquisados no presente estudo, com exceção do *C. difficile*, têm suas células alvo no intestino delgado. Apesar de apresentarem diferentes mecanismos de patogenia, seja osmótico ou por má absorção, a consequência é uma excessiva presença de líquido no lúmen do intestino delgado. A diarreia caracterizada pela eliminação de fezes líquidas só ocorre se o intestino grosso não conseguir absorver o excesso de fluidos produzidos no intestino

delgado. Em resumo, muitas vezes o enteropatógeno está causando uma enterite e é detectado nas amostras de fezes, mas não existem sinais clínicos de diarreia, o que caracteriza uma infecção subclínica (assintomática). Nesses casos, é de grande valia a utilização da histopatologia ou da imunohistoquímica para definir através do exame dos tecidos potencialmente afetados a significação da presença do agente nas fezes, o que não foi realizado no presente trabalho.

Um outro resultado a ser discutido é o fato de que apenas um baixo percentual de amostras de fezes foi positivo para pelo menos um agente (29,34%). A hipótese mais provável para explicar a origem da diarreia nos animais negativos seria a ocorrência da chamada “diarreia nutricional” (“não infecciosa”, “diarreia do leite”), relacionada principalmente às alterações na morfologia e fisiologia do trato gastrointestinal. Sugere-se que elas possam ser desencadeadas pela ingestão insuficiente de colostro ou por excessiva ingestão de leite. Na prática, acomete principalmente leitões na primeira semana de vida, tem prognóstico bastante favorável e geralmente é autolimitante. A literatura sobre esse tipo de diarreia é bastante escassa e novos trabalhos são necessários para explicar mais claramente a sua significação no complexo das diarreias neonatais. Outra hipótese para explicar a alta ocorrência de diagnósticos negativos seria o fato de que, no momento da coleta das fezes, a infecção pudesse estar já na fase de resolução, com o animal não apresentando mais a diarreia, mas o agente ainda continuando a ser excretado. No curso de algumas enfermidades (como coccidiose e criptosporidiose), o desencadeamento da diarreia é dependente da quantidade do agente ingerido. Uma baixa ingestão de patógenos, nesse caso, poderia gerar uma enterite, mas sem a presença de sinais clínicos de diarreia.

Fatores de risco como o manejo e ambiente inadequados, nutrição deficiente e baixo grau de imunidade do rebanho possibilitam que agentes que compõe a microbiota normal se tornem potencialmente patogênicos. A escolha do melhor método diagnóstico, a interpretação correta dos resultados e a detecção dos principais fatores de risco não infecciosos em granjas que apresentam diarreias neonatais possibilitam ao médico veterinário a adoção de medidas efetivas na prevenção e controle, além de alertar para os reflexos em saúde pública, em virtude do potencial zoonótico de vários destes patógenos entéricos.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, T.J.L. Piglet diarrhoea: A guide to diagnosis and control. **British Veterinary Journal**. v.137, n. 6, p. 651-662, 1981.

ALEXANDER, T.J.L. Neonatal diarrhea in pigs. In: GYLES, C.L. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Guildford: CAB International, 1994. p. 151-170.

ALFIERI, A.F. et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da rotavirose suína. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, IV, 1989, Itapema. **Anais**. Itapema: Comissão científica do IV congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1989, p.52.

ALFIERI, A. A. et al. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, VII. 1995, Blumenau. **Anais**. Blumenau: Comissão Organizadora e Científica do VII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 1995. p. 91.

ALFIERI, A.A. Epidemiologia da rotavirose suína. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, II. 2004, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu: Animalworld, 2004. p. 69.

ANGUS, K.W. et al. Staining of faecal yeasts and *Cryptosporidium* oocysts. **The Veterinary Record**, v.21, p. 173, fev. 1981.

BACH, U. et al. Parasitological and morphological findings in porcine isosporosis after treatment with symmetrical triazinones. **Parasitology Research**. v.91, p.27-33, 2003.

BAKER, S.R. *Clostridium perfringens* type A: Associated pathogens, lesions, control methods, impact, and shedding. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 19. 2006, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: Scientific committee of the 19th IPVS congress, 2006. v. 1, p.146.

BANDEIRA, C.M. et al. Saúde intestinal dos leitões: um conceito novo e abrangente. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE SUINOCULTURA, 2., 2007, Lavras. **Anais**. p. 85-123.

BARCELLOS, D.E.S.N.; GUIZZARDI, I.I.; FALLAVENA, L.C.B. Frequência e causa de diarreias bacterianas em suínos nas zonas criatórias do vale do Taquari e Missões; Rio Grande do Sul; Brasil. **Boletim do IPVDF**, Guaíba, Anais, Guaíba, 1980, p. 27-37.

BARCELLOS, D.E.S.N. Comunicação pessoal, 2008.

BARRY, A.F. et al. Frequency rate of group a rotavirus in diarrheic suckling piglets from unvaccinated brazilian pig herds. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13. 2007,

Florianópolis, **Anais**. Florianópolis: Comitê científico da 13º congresso da ABRAVES, 2007.

BARRY, A.F. et al. Frequency of porcine enteric calicivirus infection in Brazilian pig herds. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13. 2007, Florianópolis, **Anais**. Florianópolis: Comitê científico da 13º congresso da ABRAVES, 2007.

BIESTER, H.E.; MURRAY, C. Studies in infectious enteritis of swine. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v.85, p. 207-219, 1934.

BLECHA, F. Immunological aspects: comparison with other species. In: VERSTEGEN M.W.A. et al. **The Lactation Sow**. Wageningen: Wageningen pers, 1998. p.23 – 44.

BUESCHEL, D.M. et al. Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. **Journal of Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 121-129, 2003.

BULLER, C.R.; MOXLEY, R.A. Natural infection of porcine ileal dome M cells with rotavirus and enteric adenovirus. **Journal of Veterinary Pathology**. n.25, p. 516-517, 1988.

CALDERARO, F.F. et al. Caracterização morfológica das lesões intestinais na coccidiose em leitões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 8. 1997, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu: Comitê científico da 8º congresso da ABRAVES, 1997. p. 207.

CALDERARO, F.F. et al. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**. v.68, n.1, p. 29-34, jan./jun. 2001.

COLLINS, J.E. et al. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 1, p. 351-353, 1989.

COSTA G.M. et al. 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.

DAUGSCHIES, A. et al. Autofluorescence microscopy for the detection of nematode eggs and protozoa, in particular *Isospora suis*, in swine feces. **Parasitology Research**. n. 87, p. 409-412, 2001.

DEWEY, C. et al Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**. v.44, p. 649 – 653, Ago. 2003.

DRIESEN, S. J.; CARLAND, P. G.; FAHY, V. A. Studies of preweaning piglet diarrhoea. **Australian Veterinary Journal**. v. 70, n. 7, p. 259-262, jul. 1993.

ENEMARK, H.L. et al. Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* - evaluation of an animal infection model. **Veterinary Parasitology**. v.113, p. 35-57, 2003.

FAIRBROTHER, J.M. Neonatal *Escherichia Coli*. In: **Disease of Swine**. 8 ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. v.1, cap. 32, p. 433-441.

FAYER, R.; UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiology Reviews**. v.50, p. 458-483, 1986.

FITZGERALD, G.R. et al. Diarrhea in young pigs: Comparing the incidence of the five most common infectious agents. **Journal of Veterinary Medicine**. v.38, p. 80-86, jan. 1988.

FLETA, J. et al. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissue of sheep and pigs. **Veterinary Parasitology**. v.59, n. 3-4, p. 201-205, 1995.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4ª ed. São Paulo: Ícone, 2004.

FRANCIS, D.H. Colibacillosis in pigs and its diagnosis. **Journal of Swine Health and Production**. v. 7, n. 5, p. 241-244, out. 1999.

FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **Journal of Swine Health and Production**. v. 10, n. 4, p. 171-175, 2002.

FREIRE, R.L. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium spp* em leitões com diarreia em granjas suínolas do Paraná. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, VII, 1995, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu: Comissão científica do VII congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1995, p.93.

FREITAS, J.C. et al. Ocorrência de *Escherichia Coli* e rotavirus nas fezes de leitões. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, V, 1991, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia: Comissão científica do V congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1991, p. 61.

GARMORY, H.S. et al. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals determined using genotyping and subtyping PCR assay. **Journal of Epidemiology and Infecion**, Cambridge, v. 124, p. 61-67, fev. 2000.

GATTI, S.M.V. et al. Presence of group A and non A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, São Paulo. Brazil. **Journal of Microbiology and Immunology**. v.178, p. 347-349, 1989.

GLOCK, R.D. et al. *Clostridium difficile* associated disease in neonatal swine: new findings. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 18, 2004, Hamburg. **Proceedings**. Hamburg: Scientific committee of the 18th IPVS congress, 2004. v.1, p. 261.

GOUVEA, V. et al. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v.32, p. 1338-1340, 1994.

GRAHAM, D.W. et al. Pathogenesis of rotavirus-induced diarrhea. Preliminary studies in miniature swine piglets. **Digestive Disease Science**. n.29, p.1028-1035, 1984.

GUEDES, R.M.C. et al. Multiplex PCR for typification of *Clostridium perfringens* in feces of diarrheic piglets in Brazil. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 19, 2006, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: Scientific committee of the 19th IPVS congress, 2006. v.1, p. 332 a.

GUEDES, R.M.C. et al. Virulence determinant genes and antimicrobial sensitivity of *Escherichia Coli* strains isolated from diarrheic piglets in the state of Minas Gerais, Brazil. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 19, 2006, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: Jens Peter Nielsen and Sven Erik Jorsal, 2006. v. 2, p. 326 b.

GUEDES, R.M.C. Avanços na detecção de patógenos entéricos de leitões jovens. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu. **Anais**. 2006. p. 157-161.

GUIMARAES, W.V. et al. Detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolated from pigs by multiplex PCR. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 19. 2006, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: Scientific committee of the 19th IPVS congress, 2006. v. 2, p.328.

GUO, M. et al. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. **Journal of Virology**, v.75, p. 9239-9251, 2001.

GUSELLE, N.J.; APPELBEE, A.J.; OLSON, M.E. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. **Veterinary Parasitology**. v.113, p. 7-18, 2003.

HAMMER, J.M.; FUHRMAN, M.; WALZ, M. *Clostridium perfringens* type A toxoid field findings in a pig herd. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 38., 2007, Iowa. **Proceedings**. 2007. p. 249-254.

HANSEN-DECUADRO. Abordagem prática da síndrome diarreica na maternidade. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3., 2006, Foz do Iguaçu. **Anais**. 2006. p. 167-178.

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

HOEFLING, D.C. Recognizing diarrhea caused by *Clostridium perfringens* type C. **Veterinary Medicine**. p.437-440, abr. 1989.

HOLMGREN, N. et al. *Clostridium perfringens* type A from indoor and outdoor sows and piglets. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY,

19, 2006, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: Scientific committee of the 19th IPVS congress, 2006. v.1, p. 322.

IZUMIYAMA, S. et al. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. **Japanese Journal of Infectious Disease**. v.54, p. 23-26, 2001.

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

JENSEN, A.R. et al. Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs's diet dependent. **Journal of Nutrition**. v.131, p. 3259 – 3265, 2001.

JESTIN, A.; POPOFF, M.R.; MAHE, S. Epizootiologic investigations of a diarrheic syndrome in fattening pigs. **American Journal of Veterinary Research**. n. 46, p. 2149-2151, 1985.

JOACHIM J. et al., Detection of *Isospora suis* (Biester and Murray 1934) in Piglet Faeces – Comparison of Microscopy and PCR. **Journal of Veterinary Medicine**. n.51, p. 140-142, 2004.

JOHNSON, M.W. et al. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 87, p. 382-386, abr. 1992.

JONES, M.A.; HUNTER, D. Isolation of *Clostridium difficile* from pigs. **The Veterinary Record**. n.112, p. 253-254, 1983.

JONES, J.E.T. Alimentary disorders. **The Veterinary Record**. v.80, n. 25, p. 1-6, 1967.

KATSUDA, K. et al. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.18, p. 350-354, 2006.

KENNEDY, G.A. et al. Criptosporidiosis in three pigs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.170, p. 348-350, 1977.

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

KLAASEN, H.L.B.M. et al. Detection of beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 325-332, 1999.

KOUDELA, B.; KOUČEROVÁ, S. Immunity again *Isospora suis* in nursing pigs. **Parasitology Research**. v.86, p. 861-863, 2000.

KUBO, M.; WATASE, H. Electron microscopy of *Clostridium perfringens* in the intestine of neonatal pigs with necrotic enteritis. **Japanese Journal of Veterinary Science**. n.47, p. 497-501, 1985.

- LANGKJÆR, M.; ROEPSTORFF, A. Viability of *Isospora suis* oocysts under various environmental conditions. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 19. 2006, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: Scientific committee of the 19th IPVS congress, 2006. v. 1, p.281.
- LE DIVIDICH, J.; ROOKE, J.A.; HERPIN, P. Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. **Journal of Agricultural Science**. v.143, p. 469-485, 2005.
- LI, Y. et al. Adhesive patterns of *Escherichia coli* F4 in piglets of three breeds. **Journal of Genetics and Genomics**. v.34, n.7, p. 591-599, 2007.
- LINDSAY et al. Sporogony of *Isospora suis* of swine. **Journal of Parasitology**. n.68, p. 861-865, 1982.
- LINDSAY et al. Coccidia and other protozoa. In: **Disease of Swine**. 8 ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. v.1, cap. 46, p. 655-667.
- MAGAR, R.; LAROCHELLE, R. Immunohistochemical detection of porcine rotavirus using immunogold silver staining (IGSS). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. n.4, p. 3-7, 1992.
- MARTINEAU, G.P. et al. Principal neonatal disease. In: VARLEY, M.A. **The Neonatal Pig: Development and Survival**. Leeds: CAB International, 1995. p. 240 – 267.
- MARTINEAU, G.P.; DEL CASTILLO, J. Epidemiological, clinical and control investigations on field porcine coccidiosis: clinical, epidemiological and parasitological paradigms? **Parasitology Research**. v.86, p.834-837, 2000.
- McKEAN, J.D. *Clostridium perfringens* diarrhea. **Swine Health Fact Sheet**, Ames, n.12, p. 1-4, nov. 1987.
- MENIN, A. et al. Infecção de suínos pelo *Clostridium difficile*. **Hora Veterinária**. n.143, p. 37-40, fev. 2005.
- MORENO, A.M. et al. Detection of $\beta 2$ toxin gene from *Clostridium perfringens* isolated in diarrheic piglets. **Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo**, v.70, n. 2, p. 135-138, jun. 2003.
- MORIN, M. et al. Neonatal Diarrhea of pigs in Quebec: Infectious causes of significant outbreaks. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Quebec, n.47, p. 11-17, jan. 1983.
- MOUWEN, J.M.V.M. et al. Some biochemical aspects of white scours in piglets. **Tijdschr Diergeneesk**. v.97, n. 2, p. 65-89, 1972.
- MULLANEY, C.D. et al. Comparison of seroagglutination, ELISA and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K8 and 987P pilus antigens of

Escherichia Coli. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. n. 3, p. 115-118, 1991.

MUNDT, H.C. et al *Isoospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. **Parasitology Research**. v.98, p. 167-175, 2006.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. Reference of Swine Health and Management Practices in the United States, 2006. Disponível em: <http://nahms.aphis.usda.gov/swine/swine2006/Swine2006_Pt1.pdf> Acesso em: 18 jan. 2007.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. Reference of Swine Health and Management Practices in the United States, 2000. Disponível em: <<http://nahms.aphis.usda.gov/swine/swine2000/swine2kPt3.pdf>> Acesso em: 18 jan. 2007.

NAGAHAMA, M. et al. Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.278, n. 38, p. 36934-36941 Set. 2003.

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.

NISHI, S.M. et al. Parasitas intestinais em suínos confinados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**. v.67, n.2, p. 199-203, jul./dez. 2000.

NUÑEZ, A. et al. Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.5, p. 255-258, 2003.

PARRA, G.I. et al. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. **Veterinary Microbiology**. v.126, n.1, p. 243-250, Jan. 2008.

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

POST, K.W.; SONGER, J.G. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from neonatal pigs. INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 18, 2004, Ames. **Proceedings**. Ames: Scientific committee of the 17th IPVS congress, 2004. v. 2, p.62.

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.

QUILEZ, J. et al. Comparison of oocyst shedding and the serum immune response to *Cryptosporidium parvum* in cattle and pigs. **Parasitology Research**. v.82, p. 529-534, 1996.

ROEHE, P.M. et al. Rotavirus em suínos na região sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n.9, p. 45-49, abr. 1989.

ROEHE, P.M. et al. Ocorrência de rotavirus em granjas de suínos no Rio Grande do Sul. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, II, 1985, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Comissão científica do II congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1985, p. 123.

ROSTAGNO, M.H. et al. Prevalência de *Isospora suis* em leitões de granjas comerciais de ciclo completo. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, IX, 1999, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: Comissão científica do IX congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1999, p. 195.

RUNNELS, P.I. et al. Development of resistance with host age to adhesion of K99 *Escherichia Coli* to isolated intestinal epithelial cells. **Journal of Infection and Immunity**. n.28, p. 298-300, 1980.

RYAN, U.M. et al. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**. v.90, p. 769-773, 2004.

SANFORD, S.E. Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981 – 1985). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.190, n. 6, p. 695 – 698, mar. 1987.

SAN JUAN, C.S. et al. Ocorrência de rotavirose em leitões em rebanhos da região leste do estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, II. 1985, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Comissão científica do II congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1985. p. 135.

SAYD, S.M.O.; KAWAZOE, U. Prevalência de *Isospora suis* em granjas de suínos do estado de São Paulo. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, V, 1991, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia: Comissão científica do V congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1991. p. 76.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e Patologia Suína**. 2. ed. Goiânia: Art3 impressos especiais, 1999. p. 380-383.

SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I. Diarréia não infecciosa dos leitões. **Suinocultura Catarinense**. Jan, p. 31 – 37, 1981.

SONGER, J.G. Clostridial enteric disease in domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p. 216–234, Apr. 1996.

SONGER J. G.; GLOCK, R. D. Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. **Journal of Swine Health and Production**. v.6, n.5, p. 223-225, 1998.

SONGER, J.G. et al. Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. **Journal of Swine Health and Production**. v.8, n.4, p. 185-189, Jul – Ago, 2000.

SONGER, J.G.; JOST, B.H.; POST, K.W. Diagnosis of *Clostridium difficile* associated disease (CDAD) in neonatal swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 17, 2002, Ames. **Proceedings**. Ames: Scientific committee of the 17th IPVS congress, 2002. v.2, p. 88.

SONGER, J.G. et al. Clostridial diarrhea diseases: neonatal infections that affect postweaning performance. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 35., 2004, Iowa. **Proceedings**. 2004. p. 491.

SONGER, J. G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infection in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 17, p. 528-536, 2005.

STEVENSON, G.W.; ANDREWS, J.J. Mucosal impression smears for diagnosis of piglet coccidiosis. **Veterinary Medicine / Small Animal Clinician**. p. 111-115, jan. 1982.

STUART, B.P. et al. Coccidiosis in swine: dose and age response to *Isospora suis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v.46, p. 317-332, 1982.

SUÁREZ-LUEGAS, L. et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**. v.148, p. 231-235, 2007.

SVENSMARK, B. et al. Epidemiological studies of piglet diarrhea in intensively managed Danish sow herd. III . Rotavirus infection. **Acta Veterinaria Scandinavia**. n.30, p.63-70, 1989.

TORRES-MEDINA, A.; UNDERDAHL, A. Scanning electron microscopy of intestine of gnotobiotic piglets infected with porcine rotavirus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v.44, p. 403 – 411, Out. 1980.

TREVISOL, I.M.; ROEHE, P.M. Presença de picobirnavirus em fezes normais e diarréicas de leitões de maternidade. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, VI, 1993, Goiânia. **Anais**. Goiânia: Comissão científica do VI congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1993, p.77.

TREVISOL, I.M. et al. Picobirnavirus em casos de diarréia em suínos. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, V, 1991, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia: Comissão científica do V congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1991, p. 69.

TUBBS, R.T. et al. Prewaning morbidity and mortality in the United States swine herds. **Journal of Swine Health and Production**. v. 01, n. 01, p. 21-28, Jan. 1993.

TZIPORI, S. et al. *Escherichia Coli* and Rotavirus infection in four-week-old gnotobiotic piglets fed milk of dry food. **Australian Veterinary Journal**. n.56, p.279-284, 1980.

VAREA, M. et al. Fuchsin fluorescence and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isospora* and *Cyclospora* oocysts. **International Journal for Parasitology**. v.28, p. 1881-1883, 1998.

VIEIRA, A.A.S. et al. Padronização de uma técnica de PCR multiplex para identificação e tipificação de amostras de *Clostridium perfringens* A,B,C,D e E. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, XII. 2005, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: Comissão Organizadora e Científica do XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005. p. 19.

VITOVEC, J. et al. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. **Journal of Veterinary Medicine B**. v.53, p. 239-243, 2006.

VITOVEC, J.; KOUDELA, B. Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. **Veterinary Parasitology**. v.43, p. 25-36, 1992.

VOTH, D.E.; BALLARD, J.D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v.18, n. 2, p. 247-263, Abr. 2005.

WADA, Y. et al. Invasive ability of *Escherichia coli* O18 isolated from swine neonatal diarrhea. **Veterinary Pathology**. v.41, n.4, p. 433-437, 2004.

WATERS, E.H. et al. Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. n. 10, p. 104-108, 1998.

WENTZ, I. et al. Agentes infecciosos envolvidos com diarréia em leitões lactentes. INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 10, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings**. Rio de Janeiro: Scientific committee of the 10th IPVS congress, 1988. v. 1, p.136.

WIELER, L.H. et al. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine B**. v. 48, p. 151-159, 2001.

WILL, L.A. et al. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.6, n.4, p. 416-422, 1994.

WILSON, R.A.; FRANCIS, D.H. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia Coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. **American Journal of Veterinary Research**. n. 22, p 277-290, 1986.

WILSON, K.A. Diagnostic approach to enteric diseases of swine. **Journal of Swine Health and Production**, Worthington, v.8, n.5, p. 235 – 236, out. 2000.

WOODE, G.N. et al. The isolation of reovirus-like agents (rotaviruses) from acute gastroenteritis of piglet. **Medical Microbiology**. v. 9, p. 203-209, 1976.

XAVIER, E.G. et al. Imunonutrientes na produção de suínos. In: SIMPÓSIO UFRGS SOBRE PRODUÇÃO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 1., 2006, Porto Alegre. **Anais**. 2006. p.174-195.

XIAO, L.; HERD, R.P.; BOWMAN, G.L. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. **Veterinary Parasitology**. v.52, p. 331-336, 1994.

XU, R.J. et al. Growth and morphological changes in the small intestine and the large intestine in piglets during the first three days after birth. **Journal of the Development of Physiology**. v.18, p. 161-172, 1992.

XU R.J.; WANG, T. Gastrointestinal absorption of insulin-like growth factor-1 in neonatal pigs. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*. v.23, p. 430-437, 1996.

YAEGER, M.J. Clostridial enteritis: diagnosis, significance, control. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 33., 2002, Iowa. **Proceedings**. 2002. p. 261-264.

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. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 38., 2007, Iowa. **Proceedings**. 2007. p. 101-104.

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.

YOUNG, G.A.; UNDERDHAL, N.R. Isolation units for growing baby pigs without colostrum. **American Journal of Veterinary Research**. v.14, n.53, p. 571-574, 1953.

ZORANA, M. et al. Cryptosporidium infection in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the Belgrade district. **Acta Veterinaria (Beograd)**. v.53, n. 5-6, p. 361 – 366, 2003.