

OCORRÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI*, ROTAVÍRUS, PICOBIRNAVÍRUS E *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* EM UM FOCO DE DIARRÉIA DO PÓS-DESMAME EM SUÍNOS

AMAURI ALCINDO ALFIERI¹
ALICE FERNANDES ALFIERI¹
JULIO CESAR DE FREITAS³
CAIO ABERCIO DA SILVA⁴
ROBERTA LEMOS FREIRE²
ANDREA RODRIGUES BARROS²
MARCO ANTONIO BACELLAR BARREIROS²
ERNST ECHEHARDT MULLER³

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; FREITAS, J.C.; SILVA, C.A.; FREIRE, R.L.; BARROS, A.R.; BARREIROS, M.A.B.; MULLER, E.E. Ocorrência de *Escherichia coli*, rotavírus, picobirnavírus e *Cryptosporidium parvum* em um foco de diarréia do pós-desmame em suínos. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.15, n.1, p.5-7, março 1994.

RESUMO: No presente trabalho é descrita a etiologia de um foco de diarréia em leitões de creche em uma granja de ciclo completo. Os exames laboratoriais mostraram o envolvimento simultâneo de *E. coli*, rotavírus, picobirnavírus e *Cryptosporidium parvum*. Em células VERO três amostras de *E. coli* produziram LT (toxina termolábil) e cinco VT (verotoxina).

PALAVRAS-CHAVES: Suínos, diarréia, etiologia.

1 – INTRODUÇÃO

A suinocultura quando explorada de forma intensiva, pode ter seu desenvolvimento e produtividade comprometidos por diversos processos mórbidos.

As diarréias neonatais e as do pré e pós-desmame causam à suinocultura importantes perdas econômicas, determinadas por mortalidade e decréscimo na taxa de ganho de peso e conversão alimentar (MEBUS, 1982).

O período pós-desmame apresenta-se como a fase mais crítica para os leitões, pois uma série de efeitos estressantes incide sobre estes animais tornando-os predispostos principalmente a problemas entéricos. A precocidade do desmame também ajuda a expor os leitões imunitária e fisiologicamente imaturos a esses problemas. Condições do ambiente como limpeza, ventilação, aquecimento e o manejo zootécnico e alimentar pré e pós-desmame, quando mal conduzidos, favorecem o desencadeamento dos quadros de diarréia (TZIPORI et al., 1980; SOBESTIANSKY & WENTZ, 1985; MORES et al., 1991).

Entre os principais agentes causadores de diarréia no período pós-desmame podemos citar a *Escherichia coli* (*E. coli*), o rotavírus e o *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) (HALL, 1989; GELBERG, 1989).

A diarréia pode ser provocada por dois mecanismos principais. A *E. coli*, através da produção de toxinas citotônicas causa perda de água e eletrólitos. O rotavírus e o *C. parvum* impedem a absorção pela atrofia de vilosidades dos ápices dos enterócitos do intestino delgado (HALL, 1989; GELBERG, 1989; LINDSAY & BLAGBURN, 1991).

Estes agentes causam sinais clínicos semelhantes e consequentemente de pouco valor no diagnóstico etiológico e podem desencadear infecções isoladamente ou em associação (MARTINS et al., 1991).

O objetivo deste trabalho é demonstrar a associação de *E. coli*, rotavírus, picobirnavírus e *C. parvum* em um foco de diarréia do pós-desmame em leitões.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

INSTALAÇÕES E ANIMAIS: Este trabalho foi realizado em uma granja de ciclo completo com 130 matrizes localizada na região Norte do Paraná. Foram utilizados 75 leitões de creche mantidos em três baias, os quais apresentavam diarréia aquosa de coloração amarelada e com perda de peso. As instalações da creche eram do tipo convencional em alvenaria com cobertura em telha de barro e o piso compacto com cama de maravalha. A ventilação do ambiente era controlada por cortinas. A densidade utilizada era de 0,45m²/animal. O manejo alimentar orientava uma restrição nos primeiros dez dias após desmame, sendo a água oferecida à vontade.

AMOSTRAS: Foram colhidas amostras de fezes diarréicas de 21 leitões (sete de cada baia) através de "swabs" estéreis para o exame bacteriológico. Para os exames virológicos e parasitológicos as amostras de fezes foram obtidas do solo sob a forma de "pool" representando uma amostragem de baia. Desta maneira foram colhidos três "pools" de fezes por baia.

1. Professor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Laboratório de Virologia / Centro de Ciências Agrárias / Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, Caixa Postal 6001, 86051-970.
2. Mestrando em Sanidade Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Centro de Ciências Agrárias / Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, Caixa Postal 6001, 86051-970.
3. Professor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Laboratório de Bacteriologia / Centro de Ciências Agrárias / Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, Caixa Postal 6001, 86051-970.
4. Professor do Departamento de Zootecnia / Centro de Ciências Agrárias / Universidade Estadual de Londrina.

EXAMES LABORATORIAIS:

— **Bacteriológico:** Os swabs foram semeados diretamente em placas de ágar MacConkey e incubados a 37°C por 24 horas. As bactérias foram identificadas como pertencentes a espécie *E. coli* segundo EDWARDS & EWING, 1972.

— **Produção de Toxinas:** Amostras de *E. coli* foram semeadas em Tryptic Soy Broth (TSB) e incubadas a 37°C por cinco horas. Após centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 500ul de tampão salina fosfato (PBS) contendo 0,1mg/ml de polimixina B, incubado a 37°C/30 minutos e centrifugado. Após a adição de 10ug de gentamicina ao sobrenadante, foram realizados testes de esterilidade em ágar sangue ovino.

— **Ensaio em cultivo celular:** Células VERO mantidas em "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DME) suplementado com 10 por cento de Soro Fetal Bovino (SFB), 2mM de glutamina, 40mg/ml de gentamicina e 2,5mg de anfotericina B foram cultivadas em microplacas de 96 "wells" a 37°C em atmosfera de 5 por cento de CO₂. Após lavagem da monocamada com PBS pH 7,2, alíquotas de 20ul/well de cada extrato foram incubadas em duplicata. As células foram mantidas a 37°C em DME sem SFB e observadas por sete dias para visualização de efeito citopático.

— **Virologia:** Extratos Fecais a 20 por cento (p/v) foram preparados em PBS pH 7.2. A demonstração de rotavírus nas fezes foi efetuada por duas metodologias distintas. O ácido nucléico vírico, RNA fita dupla segmentado, foi detectado pela técnica de Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) seguida de coloração pela prata segundo PEREIRA et al., 1983. A presença de antígenos de rotavírus foi demonstrada através de um ensaio imunoenzimático policlonal grupo A (ELISA, EIRA — FIOCRUZ) de acordo com a metodologia descrita por PEREIRA et al., 1985.

— **Parasitológico:** A detecção do *Cryptosporidium sp.* foi realizada pelo método de coloração de Ziehl Neelsen e técnica de flutuação em solução de sacarose (SHEATHER, 1923, HENRIKSEN & POHLENZ, 1981). A espécie *C. parvum* foi determinada através de micrometria.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de *E. coli*, rotavírus, picobirnavírus e *C. parvum* foi demonstrada nas três baías que abrigavam leitões com diarreia. A *E. coli* foi isolada nas 21 amostras de fezes analisadas. Em células VERO três amostras de *E. coli* produziram LT (toxina termolábil) e cinco VT (verotoxina).

As nove amostras (pool) submetidas ao teste de ELISA grupo A foram negativas para rotavírus. Estas mesmas amostras submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida do RNA viral seguida de coloração pela prata foram positivas. A análise do perfil genômico revelou mobilidade eletroforética dos segmentos distinta do perfil

padrão de rotavírus grupo A. Três perfis genômicos diferentes, todos atípicos foram encontrados nas nove amostras positivas.

A técnica de EGPA permitiu também a detecção, em cinco destas amostras, de picobirnavírus (PBV). Este vírus tem sido recentemente descrito em fezes de várias espécies animais e também do homem (PEREIRA et al., 1988a; PEREIRA et al., 1988b), porém ainda não correlacionado à diarreias.

Cryptosporidium parvum também foi detectado nas nove amostras tanto pela técnica de Ziehl Neelsen assim como pela de Sheather.

A etiologia complexa das diarreias em suínos tem sido mostrada por vários autores, considerando-se também de fundamental importância a participação dos fatores predisponentes.

A infecção simultânea por *E. coli* e rotavírus é bastante freqüente (LECCE et al., 1981; HALL, 1989; FREITAS et al., 1991). TZIPORI et al., (1980), verificaram a presença simultânea de rotavírus e *E. coli* causando diarreia no pós desmame, aliada a problemas de manejo, nutrição e meio ambiente. Estes mesmos autores demonstraram em leitões gnotobióticos que a presença de rotavírus aumentou sensivelmente o período de susceptibilidade dos leitões à *E. coli* enteropatogênica.

KENNEDY et al., (1977), relatam que a maioria das infecções por *Cryptosporidium* em leitões são assintomáticas. SANFORD (1987) analisando 3.491 suínos, verificou histologicamente a presença de *Cryptosporidium* em 184 (5,3%) dos animais e destes apenas 48 (26%) apresentavam diarreia. Na grande maioria dos animais diarreicos o autor detectou outro agente primário ou lesões capazes de provocar a diarreia.

MARTINS et al., (1991) no Rio Grande do Sul detectaram *Cryptosporidium sp* associado a rotavírus e *E. coli* em um único leitão com diarreia.

Estes dados são compatíveis com os de outros autores os quais encontraram nos casos de diarreia a associação deste parasito a outros agentes etiológicos (LINDSAY & BLAGBURN, 1991).

Em nosso trabalho, a detecção simultânea dos três agentes pode justificar a gravidade dos sintomas clínicos observados em que a mortalidade média mensal na creche, da propriedade estudada, que era de 2,34%, elevou-se para 15,5% por ocasião do problema. Entretanto, as medidas adotadas como antibióticoterapia orientada nos antibiogramas associados à limpeza e desinfecção rigorosa das instalações possibilitaram a recuperação dos animais comprometidos bem como evitaram a infecção dos animais alojados nas baías adjacentes.

4 — CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos podemos concluir que a infecção simultânea por vários agentes foi a responsável pela alta mortalidade e morbidade descritas neste trabalho. Com isto, enfatizamos que somente com a correta identificação laboratorial dos agentes envolvidos nas diarreias suínas, medidas corretivas nos manejos zootécnico e sanitário bem como terapia orientada devem ser adotadas.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; FREITAS, J.C.; SILVA, C.A.; FREIRE, R.L.; BARROS, A.R.; BARREIROS, M.A.B. MULLER, E.E. Occurrence of *Escherichia coli*, rotavirus, picobirnavirus and *Cryptosporidium parvum* in a postweaning diarrhoea focus in swine. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.15, n.1, p.5-7, march 1994.

ABSTRACT: This work describes the etiology of a postweaning diarrhoea focus in a intensive piggery. The results of identification procedures showed the simultaneous occurrence of *Escherichia coli*, rotavirus, picobirnavirus and *Cryptosporidium parvum*. In VERO cells culture, was detected the LT (termolabile toxin) production by three *E. coli* samples and VT (verotoxin) production by five samples.

KEY WORDS: Swine, diarrhoea, etiology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. *Identification of enterobacteriaceae*. 3. ed. Minneapolis, 1972.
- FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; MULLER, E.E.; CONTE, L.E.; ROCHA, L.A. Ocorrência de *E. coli* e rotavírus nas fezes de leitões. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 5. Águas de Lindóia, SP., 1991, 114p.
- GELBERT, H. Porcine rotavirus and the problems it causes. *Vet. Med.*, abril, p. 428-431, 1989.
- HALL, W. A review of colibacillosis in neonatal swine. *Vet. Med.*, abril, p. 449-452, 1989.
- HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl - Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.*, v.22, p.594-596, 1981.
- KENNEDY, G.A.; KREITNER, G.L.; STRAFUSS, A.C. Cryptosporidiosis in three pigs. *J.A.V.M.A.*, v.170, p. 348-350, 1977.
- LECCE, J.G.; BALSBAUGH, R.; KING, M.W. Rotavírus, enterotoxigenic hemolytic *Escherichia coli* and management in piglet weaning diarrhea. *J. An. Sci.*, v.53, p.187, 1981.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium parvum* infections of swine. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.13, n.5, p.891-894, 1991.
- MARTINS, J.R.; BARCELLOS, D.E.S.N.; STEPAN, A.L.; CORREA B.L.; SCAINI, C.J. Associação de *Cryptosporidium sp.* com diarréia em suínos recentemente desmamados. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 5. Águas de Lindóia, SP. 1991, 75p.
- MEBUS, C.A. Rotavirus and coronavirus diseases of animal in the Americas. IN: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE O IMPACTO DE DOENÇAS VIRAIS NO DESENVOLVIMENTO DOS PAÍSES LATINO-AMERICANOS E DA REGIÃO DO CARIBE. *Anais da Fundação Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, n. 1, 1982, p.185-190.
- MORES, N.; SOBESTIANSKY, J.; CIALLI, J.R.; AMARAL, A.L.; BARIONI JUNIOR, W. Concórdia: EMBRAPA-CNPQA, 1991. 5p. (Comunicado Técnico, 178).
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; BARTH, O.M.; SUTMOLLER, F.; FARIAS, de V.; VIDAL, M.N.P. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron microscopy (IME) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, n. 78, p.483-490, 1983.
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; ANDRADE, Z.P.; CASTRO, L.A. Combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIRA). *J. Virol. Methods*, v.10, p. 21-28, 1985.
- PEREIRA, H.G.; FIALHO, A.M.; FLEWETT, T.H.; TEIXEIRA, J.M.; ANDRADE, Z.P. Novel viruses in human faeces. *Lancet*, v.2, p. 103-104, 1988a.
- PEREIRA, H.G.; FLEWETT, T.H.; CANDEIAS, J.A.N.; BARTH, O.M. A virus with bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Orizomis nigripes*). *J. Gen. Virol.*, v.69, p.2749-2754, 1988b.
- SANFORD, S.E. Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1991-1985). *J.A.V.M.A.*, V. 190, n.6, p. 695-698, 1987.
- SHEATHER, A.L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J. Comp. Pathol.*, n. 36, p. 266-275, 1923.
- SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I. Aspectos sanitários relacionados com o leitão desde o nascimento até o abate. IN: MANEJO EM SUINOCULTURA. Aspectos Sanitários, reprodutivos e de meio ambiente. Concórdia: p. 11-61, 1985.
- TZIPORI, S.; CHANDLER, D.; SMITH, M.; MAKIN, T.; HENNESSY, D. Factors contributing to postweaning diarrhoea in a large intensive piggery. *Aust. Vet. J.*, v. 56, p.274-278, 1980.

Recebido para publicação em 13/10/1993