

PRINCIPAIS AGENTES BACTERIANOS ENVOLVIDOS EM GASTROENTERITES EM LEITÕES NA FASE DE MATERNIDADE

MAIN BACTERIAL AGENTS INVOLVED IN GASTROENTERITIS IN PIGLETS IN THE MATERNITY PHASE

Jaqueline Mombach¹
Natalia Beatriz Ansolin²
Idaihana Rostirolla Saucedo³
Keli Daiane Cristina Libardi Ramella⁴
Mônica Regina de Matos⁵

RESUMO: A suinocultura é um dos segmentos mais importantes da pecuária no Brasil. Com o aumento da tecnificação na suinocultura, os desafios sanitários se intensificaram causando grandes danos para a produtividade. As gastroenterites que acometem os leitões causam muitas perdas econômicas para a suinocultura. Este projeto possui o objetivo de coletar dados sobre as principais bactérias envolvidas nas gastroenterites que acometem leitões em fase de maternidade na cidade de Toledo – PR. Para o exame microbiológico foram coletados conteúdo intestinal e acondicionadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e cultivadas em estufa a 37°C durante 24 a 48 horas. Após, as amostras foram semeadas em estrias em placas de Petri com meios de cultura Ágar Sangue (AS)^a, Ágar MacConkey (MC)^a e Ágar *Eosin Methylene Blue* (EMB). Imediatamente, uma placa de AS^a era acondicionada em estufa a 37°C em anaerobiose durante 24 horas, e as três restantes permaneciam em estufa a 37°C por 24 horas em aerobiose. Foram realizadas provas bioquímicas para determinação do gênero das colônias. Para o histopatológico, fragmentos de intestino delgado, intestino grosso e linfonodo mesentérico foram acondicionados em formalina a 10% e processados pela técnica de desidratação e inclusão de parafina, e as lâminas eram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina. O resultado da microbiológica incluiu 22 amostras positivas para *Escherichia coli*, 18 amostras positivas para *Salmonella* spp. e 7 amostras positivas para *Clostridium* spp. Na histologia, foram observadas lesões intestinais como hiperplasia de célula caliciforme, enterite aguda, fusão de vilosidade, etc. Em todas as amostras foi isolado algum agente bacteriano, sendo a *E. coli* a mais prevalente. Ademais, as amostras em totalidade apresentaram alguma lesão histopatológica com padrão semelhante.

2135

Palavras-chave: Suinocultura. Colibacilose. Clostridiose. Histologia. Diarreia.

¹Graduanda em Medicina Veterinária pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo- PR, Brasil.

² Graduanda em Medicina Veterinária pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo- PR, Brasil.

³Pesquisadora júnior pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

⁴Doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina. Docente do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo – PR, Brasil.

⁵Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal do Paraná. Docente do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo – PR, Brasil.

ABSTRACT: Pig farming is one of the most important sectors of livestock farming in Brazil. With the increase in technification advancements in pig farming, sanitary challenges have been intensified, causing a significant damage to the productivity. Gastroenteritis that affects piglets causes substantial economic losses in the swine industry. This project aims to collect data on the main bacteria involved in gastroenteritis that affects piglets during the maternity phase in the city of Toledo, Paraná state. For the microbiological examination, intestinal contents were collected and placed in Brain Heart Infusion (BHI), then incubated at 37°C for 24 to 48 hours. Subsequently, the samples were streaked onto Petri dishes containing Blood Agar (BA), MacConkey Agar (MA), and Eosin Methylene Blue Agar (EMB). Immediately, one BA plate was transferred to an anaerobic incubator at 37°C for 24 hours, while the remaining three plates were incubated aerobically at 37°C for 24 hours. Biochemical tests were performed to determine the genus of the colonies. For histopathology, fragments of the small intestine, large intestine, and mesenteric lymph node were fixed in 10% formalin, processed using the dehydration and paraffin embedding technique, and stained with Hematoxylin and Eosin. The microbiological results showed 22 positive samples for *Escherichia coli*, 18 positive samples for *Salmonella* spp., and 7 positive samples for *Clostridium* spp. The histological examination revealed intestinal lesions such as hyperplasia of goblet cells, acute enteritis, villous fusion, etc. In all samples, some bacterial agents were isolated, being *E. coli* being the most prevalent. Furthermore, all samples exhibited similar histopathological lesions.

Keywords: Pig farming. Colibacillosis. Clostridiosis. Histology. Diarrhea.

1. INTRODUÇÃO

2136

A suinocultura representa um importante segmento na geração de renda e empregos no Brasil, impactando a economia nacional, além de criar laços com países importadores da carne suína. De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) de 2021, a produção de carne suína vem aumentando nos últimos anos, onde em 2021 foi produzido 4,436 milhões de toneladas (GUIMARÃES, *et al.*, 2017).

Os suínos são monogástricos e possuem uma alta eficiência na digestão alimentar, precisando de dietas balanceadas para ter uma boa conversão alimentar. No entanto, encontramos diversos patógenos que acometem o trato digestório dos suínos, causando doenças de grande importância a nível nacional e mundial (ZANELLA; MORÉS; BARCELLOS, 2016).

Com o aumento da tecnificação na suinocultura para atender a grande demanda do mercado associado a alta densidade de animais alojados, os desafios sanitários se intensificaram causando grandes danos para a produtividade. Além disso, ao analisarmos onde ocorre os maiores prejuízos podemos atribuir principalmente à maternidade, causando além da alta mortalidade problemas na absorção dos alimentos, que diminuem o desempenho dos leitões e refletem em toda a vida do animal (ARAÚJO; BROGGIO, 2021).

Dentre os principais agentes bacterianos que acometem o trato entérico dos leitões na fase da maternidade, podemos destacar a *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* tipo A e C, bem como o *Clostridium difficile*, que tem como principal sinal clínico a diarreia em animais jovens (ARAÚJO; BROGGIO, 2021).

A diarreia pode provocar uma mortalidade de até 70% dos leitões, e além das causas infecciosas podem estar associadas a um manejo ineficiente. A principal fonte de infecção para animais sadios são os próprios animais infectados, bem como o ambiente contaminado. A diarreia neonatal que ocorre nos primeiros dias de vida do leitão reflete em alta mortalidade, assim como animais atrofiados, com baixa eficiência alimentar e retardo de crescimento. Os animais afetados apresentam grande perda de líquidos e íons de cloreto, uma vez que sua fonte de alimentação é o leite materno, acarretando em desidratação grave. Para confirmar qual o agente envolvido na diarreia é necessário observar lesões macro e microscópicas além de testes laboratoriais (SOUZA, 2020).

A gastroenterite causada por cepas enterotoxigênicas (ETEC) de *Escherichia coli* é uma das doenças entéricas mais expressivas na suinocultura, acometendo principalmente leitões na maternidade e creche. A infecção ocorre via feco-oral de origem ambiental ou maternal, onde a bactéria se adere na mucosa intestinal e produz enterotoxinas que resulta em um acréscimo do fluxo secretório que provocam diarreia aquosa e amarelada, como também desidratação. O diagnóstico ocorre por meio do exame bacteriológico de amostras do conteúdo intestinal inoculados em Ágar Sangue e Ágar MacConkey, onde a ETEC pode ou não apresentar hemólise. O teste por reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizado para codificar as fímbrias e toxina da cepa isolada. A histopatologia também pode ser realizada, onde observamos a bactéria colonizando a porção do jejuno distal e íleo, podendo causar atrofia e aumento de neutrófilos na lâmina própria, áreas hemorrágicas e inflamatórias (MORÉS; BARCELLOS, 2012).

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria Gram positiva presente na microbiota intestinal dos suínos, no entanto, alguns tipos são produtoras de toxinas que causam uma gastroenterite severa. Pode ser causada pelo *C. perfringens* tipo A que produz a toxina beta-2, provocando uma diarreia com muco e retardando o crescimento dos leitões, ou então pelo *C. perfringens* tipo C, causando uma diarreia aquosa ou hemorrágica, podendo ou não conter necrose, associada a uma drástica desidratação geralmente fatal. A infecção ocorre normalmente pela ingestão dos esporos que se encontram no ambiente ou nas fezes da matriz (SOUZA, 2017; BORTOLOZZO *et al.*, 2019).

As cepas toxigênicas do *Clostridium difficile* causam uma enterite que cursa com diarreia pastosa ou aquosa amarelada, desidratação, anorexia e distensão do abdômen. A doença está associada a falhas de manejo, como estresse, alta contaminação do ambiente, pelo uso indiscriminado de antibióticos, que resulta no desequilíbrio da microbiota intestinal, possibilitando o surgimento de patógenos que desenvolvem a doença. As toxinas produzidas pelo *C. difficile* são as A, B e Cdt, sendo enterotóxica, citotóxica e sinérgica, respectivamente. A infecção ocorre através da ingestão de esporos no ambiente ou pelas fezes da matriz infectada, a germinação acontece no duodeno e em seguida migram para o intestino grosso, e sob condição de anaerobiose realizam a colonização, se ligando na superfície dos enterócitos e produzindo as toxinas, causando necrose local, arredondamento celular e dano no citoesqueleto, seguido da morte das células (SALVARANI, 2011).

Para o diagnóstico da clostridiose pode ser realizado o isolamento bacteriano, inoculando a amostra em ágar sangue a 37°C sob condição de anaerobiose, as colônias crescidas são brancas, opacas e não hemolíticas, e quando realizado os testes bioquímicos a bactéria não fermenta lecitinase, catalase, oxidase e lipase. Outra forma de realizar o diagnóstico é pela identificação das toxinas que acontece pelo teste *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), ou seja, teste imunoenzimático. Na histopatologia observa-se inflamação da mucosa intestinal com a presença de muitos neutrófilos, colite e edema de mesocólon (SALVARANI, 2011).

2138

Uma vez apresentada a problemática das doenças bacterianas entéricas que acometem os leitões na fase da maternidade, sabendo em como a sanidade reflete na entrega de produtos de qualidade e na lucratividade do produtor, aliado ainda a alta negligência de práticas de biossegurança nas granjas do Oeste do Paraná, o presente projeto tem por objetivo coletar dados sobre as principais bactérias envolvidas nas gastroenterites que acometem leitões por meio de análises microbiológicas e histopatológicas de 35 animais que vieram a óbito em granjas na cidade de Toledo – PR.

2. Metodologia

2.1 Coleta de amostras

Foram realizadas coletas amostras de 35 leitões na fase da maternidade que vieram a óbito apresentando sinais clínicos de gastroenterites, provenientes de granjas localizadas na cidade de Toledo (24°43'11.12"S/53°44'35.86"O), município situado na região Oeste do Paraná, localizada na região Sul do Brasil. As amostras obtidas foram oriundas de produtores

que assinaram o termo de consentimento de uso animal, e passaram pela necropsia e exame histopatológico no laboratório de Patologia Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus Toledo. As amostras para isolamento bacteriano serão realizadas no laboratório de Microbiologia Veterinária da mesma instituição.

2.2 Processamento laboratorial

As amostras previamente identificadas foram coletadas sob condições de assepsia. Para o exame microbiológico foi coletado conteúdo intestinal com o auxílio de um *swab* estéril, e acondicionado em um meio de transporte até o laboratório de Microbiologia Veterinária, onde foram passadas para o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) que é um meio de cultura rico indicado para desenvolver microrganismos exigentes, e acondicionadas em estufa a 37°C e 85% de umidade relativa do ar durante 24 a 48 horas. Após esse período, as amostras enriquecidas no BHI foram semeadas em estrias nas placas de Petri com meios de cultura Ágar Sangue (com 5% de sangue de equino desfibrinado) (AS)^a, no Ágar MacConkey (MC)^a e Ágar Eosin Methylene Blue (EMB). Cada amostra era identificada e semeada por estriamento em duas placas de ágar AS^a, e em uma placa de ágar MC^a e EMB. Em sequência, uma das placas de ágar AS^a era acondicionada em estufa a 37°C sob condições de anaerobiose durante 24 horas, e as três restantes permaneciam em estufa a 37°C por 24 horas em aerobiose.

2139

Após o crescimento das culturas bacterianas nas placas, as mesmas eram fotografadas e tomava-se nota das características encontradas em cada uma delas. Em sequência era realizado a técnica de coloração de gram e leitura em microscópio óptico, junto a isso eram realizados testes de catalase por meio da inoculação de uma alçada da cultura em uma gota de peróxido de hidrogênio, e também o teste de oxidase através das fitas reagentes. Para testes bioquímicos, as amostras foram semeadas pela técnica de picada a fundo e estriamento em tubos de ensaio com ágar *Triple Sugar Iron* (TSI) e por estriamento em tubos de ensaio com ágar Citrato de Simmons, ambos os tubos foram acondicionados em estufa a 37°C por 24 horas.

Para identificação da bactéria, foram analisados um conjunto de fatores como a observação das colônias crescidas em AS^a em anaerobiose, fermentação de lactose em ágar MC^a, observação das colônias em ágar EMB, leitura microscópica, leitura pela fermentação de glicose, lactose e/ou sacarose, ou produção de sulfeto de hidrogênio no ágar TSI, e pela leitura da utilização de citrato como fonte de carbono pelo ágar Citrato de Simmons. Através

destes fatores, foi possível identificar as bactérias em *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp.

No entanto, não foi possível determinar sorotipos de *E. coli* enteropatogênica, sorotipagem de *Salmonella* spp. e de *Clostridium* spp. devido às limitações de materiais no laboratório e financeira.

2.3 Processamento histopatológico

Após a coleta do material para o exame microbiológico, seguia para a necropsia como exame macroscópico das vísceras e coleta de fragmentos de intestino delgado, intestino grosso e linfonodo mesentérico que permaneciam acondicionados em um coletor universal estéril com solução formalina a 10%. As amostras permaneciam em fixação no formol por no mínimo 3 dias, e depois eram processadas pela técnica histológica de desidratação e inclusão de parafina, onde posteriormente as lâminas eram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina.

Com as lâminas prontas, era realizado a leitura microscópica das amostras para identificação das lesões encontradas nos tecidos como, por exemplo, lesões de vilosidades, presença de necrose ou infiltrado inflamatório, hiperplasia linfoide, hemossiderose entre outras alterações, tomando nota desses processos para posteriormente realizar a análise casuística.

2140

3. RESULTADOS

Para a pesquisa foram utilizados 35 leitões em fase de maternidade, com em média 25 dias de vida, machos e fêmeas, que vieram a óbito em granjas do município de Toledo – PR. Desses animais, 21 leitões apresentaram sinal clínico de diarreia, assim como mostra na Figura 1, ou seja, 60% dos animais vieram a óbito em decorrência de gastroenterites.



Figura 1 - Leitão com sinal clínico de diarreia

3.1 Análise microbiológica

As amostras de conteúdo intestinal dos 35 leitões foram inoculadas por estriamento em placas de Petri de AS^a em aerobiose e anaerobiose, MC^a e EMB em aerobiose. Em todas as placas ocorreram o crescimento de colônias bacterianas.

A hemólise em AS^a é muito descrita na *E. coli* ETEC. No experimento foram observadas 26 amostras (74,2%) com hemólise parcial, 7 amostras (20%) com hemólise completa e apenas 2 amostras (5,7%) que não apresentam hemólise. Além disso, no cultivo em AS^a em condição de anaerobiose, foram observadas o crescimento em 7 (20%) amostras de colônias sugestivas de *Clostridium* spp. como mostra na Figura 2.

Na cultura em MC^a, como mostrado na Figura 2, foi observado que 28 amostras (80%) apresentam lactose positiva, indicando que as colônias eram fermentadoras de lactose, característico de bactérias Gram negativas. Em 4 amostras (11,4%) não ocorreu a fermentação de lactose, e em 3 amostras (8,5%) foram observadas o crescimento de duas colônias diferentes, uma fermentadora de lactose a outra não.

O crescimento de colônias com reflexo verde metalizado no ágar EMB podem indicar a presença de *E. coli*, enquanto as colônias incolores a âmbar podem indicar *Salmonella* spp. Das 35 amostras, em 15 (42,8%) ocorreu o crescimento de apenas colônias verdes metalizadas, como mostra na Figura 2, em 4 (11,4%) cresceu apenas colônias âmbar, e em 16 amostras (45,7%) ocorreu o crescimento de mais de uma colônia, sendo uma verde metalizada e outra âmbar

2141



Figura 2 - Placa com Ágar Sangue cultivada em anaerobiose com crescimento bacteriano sugestiva de *Clostridium* spp. (A). Placa com Ágar MacConkey demonstrando amostra com lactose positiva (lado esquerdo) e lactose negativa (lado direito) (B). Placa com Ágar BEM indicando crescimento de colônia verde brilhante sugestivo de *E. coli*. (C).

Na coloração de Gram, 35 amostras (100%) apresentaram bactérias Gram negativas principalmente em forma de bastonetes, no entanto, em algumas amostras também foram

observadas algumas bactérias Gram positivas. Em 11 amostras (31,42%) analisadas, com as bactérias Gram negativas foram encontradas alguns cocos e bastonetes Gram positivas.

Os testes bioquímicos realizados foram o Citrato de Simmons e o *Triple Sugar Iron* (TSI). No teste do Citrato de Simmons é observado as bactérias que utilizam o citrato como fonte principal de energia, mudando a coloração de verde para azul intenso em 24 horas, no caso da *E. coli* o resultado é negativo, como mostra na Figura 3, na amostra de número 26. Em 17 amostras (48,5%) se obteve o resultado negativo, e em 18 amostras (51,4%) resultado positivo.

No teste de TSI, são diferenciados os bacilos entéricos Gram negativos com base na fermentação dos carboidratos e na produção de sulfeto de hidrogênio. A cor púrpura (alcalina) e amarela (ácido) condiz a fermentação de apenas glicose, enquanto a cor totalmente amarela significa a fermentação de glicose e lactose/sacarose. A presença de bolhas no meio expressa a presença de gás (dióxido de carbono), já a presença de um precipitado negro revela a presença de sulfeto de hidrogênio. Na *E. coli* encontra-se reação ácida, com ou sem gás na profundidade, e ausente de sulfeto de hidrogênio, enquanto na *Salmonella* spp. são observados reação ácida com superfície alcalina e com ou sem gás em superfície, produzindo ou não sulfeto de hidrogênio, assim como demonstrado na Figura 3. Os resultados obtidos foram 19 amostras (54,2%) com produção de sulfeto de hidrogênio, e 16 amostras (45,7%) com reação ácida e/ou produção de gás na profundidade.

2142

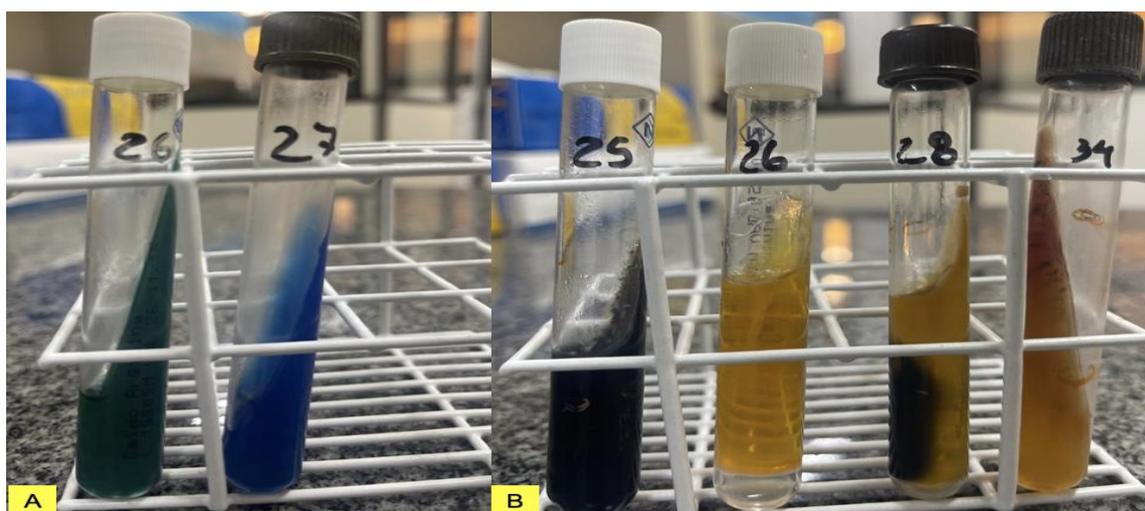


Figura 3 - Citrato de Simmons com resultado negativo em amostra 26 e positivo em amostra 27 (A). Teste TSI com reação de sulfeto de hidrogênio (amostra 25), reação ácida e gás em profundidade (amostra 26), reação ácida com produção de gás e sulfeto de hidrogênio (amostra 28) e reação ácida na profundidade e alcalina na superfície (34) (B).

Com base na observação das características encontradas nas placas e nos testes bioquímicos, o resultado da análise das bactérias foi de 22 amostras positivas para *E. coli*, 18

amostras positivas para *Salmonella* spp. e 7 amostras positivas para *Clostridium* spp. considerando que em 35 amostras algumas cresceram mais de uma bactéria, conforme exemplificados na Tabela 1.

Bactéria pesquisada	Número de amostras positivas	%
<i>E. coli</i>	22	62,85%
<i>Salmonella</i> spp.	18	51,42%
<i>Clostridium</i> spp.	7	20%

Tabela 1 - Resultado microbiológico das amostras analisadas.

Na necropsia dos leitões foram analisadas presença de diarreia em 21 animais. Os achados da necropsia incluíam presença de gás em intestino, como na Figura 4, congestão e hiperemia, presença de sangue e muco em intestino, inflamação incluindo enterite fibrinonecrótica.



Figura 4 - Presença de gás em intestino de leitão.

As amostras de linfonodo mesentérico, intestino delgado e intestino grosso dos 35 leitões após fixadas em formol passaram pela técnica histológica de desidratação e inclusão de parafina e foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina.

Em linfonodo mesentérico, foram observadas hemossiderose, hiperplasia linfoide, congestão e/ou hemorragia de vasos, linfadenite aguda, presença de macrófagos e neutrófilos, e necrose, como apresentada na Figura 5. Em números, 15 amostras (68,1%) positivas para *E. coli* apresentaram alteração em linfonodo mesentérico, 5 amostras (71,4%) de *Clostridium* spp. e 16 amostras (88,8%) de *Salmonella* spp.

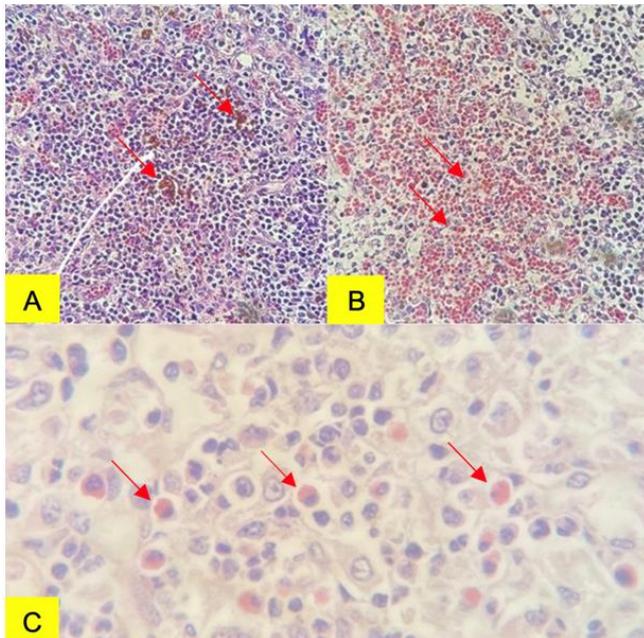


Figura 5 - Lâmina histopatológica de linfonodo mesentérico apresentando hemossiderose (setas). Coloração H&E. Obj. 10x. (A) Lâmina histopatológica de linfonodo mesentérico apresentando hemorragia (setas). Coloração H&E. Obj. 10x. (B). Lâmina histopatológica de linfonodo mesentérico apresentando linfadenite. Setas indicam eosinófilos. Coloração H&E. Obj 40x (C).

As alterações histológicas encontradas em intestino delgado foram hiperplasia de células caliciformes, fusão de vilosidades, infiltrado inflamatório em lâmina própria, presença de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, enterite aguda, áreas de congestão e hemorragia, hiperplasia de MALT, erosão de vilosidades e abscesso de cripta, como mostra na Figura 6. Em números, 19 amostras (86,3%) positivas para *E. coli* apresentaram alteração em intestino delgado, 7 amostras (100%) de *Clostridium spp.* e 15 (83,3%) amostras de *Salmonella spp.*

2144

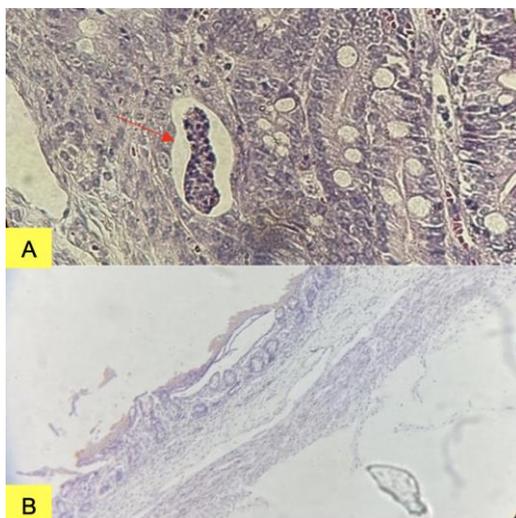


Figura 6 - Lâmina histopatológica de intestino delgado apresentando abscesso de cripta (seta). Coloração H&E. Obj. 40x. (A) Lâmina histopatológica de intestino apresentando erosão de vilosidade. Coloração H&E. Obj. 10x. (B).

Em intestino grosso, foram encontradas alterações histológicas como enterite aguda, hiperplasia de células caliciformes, hiperplasia de MALT, eosinófilos e neutrófilos em lâmina própria, congestão da lâmina própria, congestão e área de microhemorragia, abscessos de criptas, erosão de vilosidades, infiltrado inflamatório e áreas necróticas, e edema de submucosa como mostra na Figura 7. Em 18 amostras (81,8%) positivas para *E. coli* houve alteração em intestino delgado, 7 amostras (100%) de *Clostridium* spp. e 18 (100%) amostras de *Salmonella* spp.

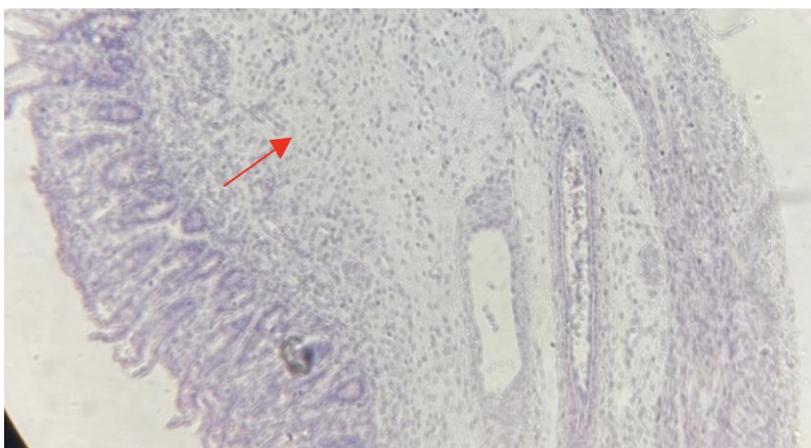


Figura 7 - Lâmina histopatológica de intestino grosso apresentando hiperplasia de MALT (seta) e edema de submucosa. Coloração H&E. Obj. 4x.

2145

Das 35 amostras realizadas, em 22 amostras (22,8%) foi isolado *E. coli*, em 18 amostras (51,4%) foi isolado *Salmonella* spp. e em 7 amostras (20%) foi isolado *Clostridium* spp. Das 22 amostras de *E. coli*, 15 (68,1%) apresentam lesão em linfonodo mesentérico, 19 amostras (86,3%) com lesão em intestino delgado e 18 amostras (81,8%) com lesão em intestino grosso. Já nas 18 amostras de *Salmonella* spp. 16 (88,8%) apresentaram lesão em linfonodo mesentérico, 15 (83,3%) com lesão em intestino delgado e 18 (100%) com lesão em intestino grosso. Por fim, das 7 amostras isoladas de *Clostridium* spp. 5 (71,4%) apresentaram lesão em linfonodo mesentérico, 7 (100%) com lesão em intestino delgado e 7 (100%) com lesão em intestino grosso, como demonstra a Tabela 2 abaixo.

Bactéria pesquisada	Lesão em linfonodo	Lesão em intestino delgado	Lesão em intestino grosso
	mesentérico		
<i>E. coli</i>	15	19	18
<i>Salmonella</i> spp.	16	15	18
<i>Clostridium</i> spp.	5	7	7

Tabela 2 - Lesões histológicas em linfonodo mesentérico, intestino delgado e intestino grosso encontradas em amostras de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp.

4. DISCUSSÃO

A colibacilose é uma enfermidade causada por cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, apontada por Morés e Barcellos (2012s) como uma das maiores causadoras de mortes de leitões em fase de maternidade. Os autores citam como sinal clínico principal a diarreia aquosa e amarelada. As cepas de ETEC na colibacilose neonatal apresentam as fímbrias F5, F6, F41 e F4, e as toxinas STa, STb, LT e EAST-1. Ainda pontuam que para o diagnóstico, baseia-se principalmente no exame bacteriológico de amostras de conteúdo intestinal, que devem ser inoculadas em Ágar Sangue e Ágar MacConkey, que permitem diferenciar bactérias entéricas que fermentam lactose, como a *E. coli*, das não fermentadoras. O autor cita que as colônias possuem um aspecto suave a áspero ou ainda mucóide, e que uma característica das cepas ETEC é a hemólise em ágar sangue.

Os resultados obtidos da microbiologia permitiram avaliar a presença de hemólise parcial em ágar sangue em 74,2% das amostras, hemólise completa em 20% e colônias não hemolíticas em apenas 5,7%. Outro dado importante referem-se as colônias em Ágar MacConkey, que apresentaram fermentação de lactose em 80% das amostras. Grande parte das colônias em Ágar sangue apresentaram características ásperas ou mucóides. Com isso, observa-se que mais de 80% das amostras apresentaram características sugestivas de ETEC.

2146

Foram realizadas inoculação das amostras no Ágar EMB, que segundo Drummond (2011), as colônias de *E. coli* nesse meio se apresentam com coloração preta com brilho verde metalizado em decorrência da precipitação característica dos corantes eosina e azul-de-metileno. O resultado apresentado na pesquisa foi de 42,8% de crescimento de apenas colônias verdes metalizadas, em 45,7% crescimento duas colônias, sendo uma verde metalizada, e apenas 11,4% sem crescimento de colônia com aspecto de *E. coli*. Dessa forma, quase 90% das amostras em EMB apresentaram um crescimento sugestivo de *E.coli*.

Drummond (2011) cita o meio de cultivo TSI como característico para *E. coli* aqueles que apresentam coloração amarelada (ácida) devido à fermentação de glicose e sacarose/lactose, e também a produção de gases na profundidade. No teste de Citrato de Simmons, Romanholi (2018) aponta que o resultado deve ser negativo quando se trata de *E. coli*. Com base nos resultados da pesquisa, 45,7% das amostras apresentaram reação ácida e/ou produção de gás na profundidade no TSI, e 48,5% expuseram resultado negativo no Citrato de Simmons, o que mostra que quase 50% das amostras analisadas sugerem ser *E. coli*.

Na histopatologia, Morés e Barcellos (2012) citam que os achados mais comuns em casos de *E. coli* é a presença da ETEC colonizando o intestino, aderido principalmente na mucosa intestinal em região de jejuno e íleo, causando uma leve atrofia de vilosidades, podendo apresentar congestão vascular, hemorragias e infiltrados inflamatórios. No entanto, como resultado não foram observadas presença da bactéria nas lâminas histológicas, já outros achados como congestão e infiltrado inflamatório estavam presentes em quase todas as amostras. A atrofia de vilosidades, por exemplo, foi encontrada em 6 das 22 amostras de *E. coli*, correspondendo a 27,2% das amostras. Quanto as lesões, as amostras isoladas como colibacilose apresentaram maior número de lesões em intestino delgado, com 86,3%, seguido de intestino grosso com 81,8% e linfonodo mesentérico com 68,1%, fato que comprova que a maioria das lesões ocorre em intestino delgado, em especial no jejuno.

De acordo com os resultados obtidos, a *E. coli* se destacou como a bactéria com maior prevalência entre as pesquisadas, diagnosticada em 62,85% do total de amostras. Segundo pesquisa realizada por Calderano *et al.* (2001), a ETEC está presente com maior frequência nos sistemas de produção quando comparada a outras bactérias, representando cerca de 85%.

Para identificação de *Clostridium* spp. a presente pesquisa realizou apenas o cultivo em AS^a em anaerobiose, onde foram observadas as características das colônias sugestivas de *Clostridium* spp., no entanto, pela falta de disponibilidade de outros testes se torna insuficiente para identificar efetivamente de qual espécie se trata. Portanto, foi observado as lesões histopatológicas para poder fazer um diagnóstico presuntivo de clostridiose.

2147

Um estudo realizado por Salvarani (2011) com o objetivo de isolar, identificar e realizar genotipificação de *C. difficile* em uma granja teve como resultado a ocorrência de 20% de casos positivos. Nesse mesmo estudo, o isolamento de *Clostridium perfringens* teve como resultado 83,3% das amostras. Aplicado na vigente pesquisa, com base na análise quanto as características das colônias, o resultado presuntivo foi de 20% de casos positivos para *Clostridium* spp.

Salvarani (2011) cita que macroscopicamente, o edema de mesocólon é uma condição característica de *C. difficile*. Não foram encontradas em nenhuma amostra desta pesquisa essa condição.

Segundo Hammer *et al.* (2008), é possível associar a presença de infiltrados inflamatórios na lâmina própria, com necrose leve a moderada de enterócitos a infecção por *Clostridium perfringens*. Na pesquisa foram evidenciadas enterite aguda em 100% as amostras positivas para *Clostridium* spp., erosão de vilosidade e abscesso de cripta em 42,8% das

amostras e linfadenite associado a material necrótico em 71,4%, sugerindo uma possível clostridiose. Do total de amostras, o *Clostridium* spp. foi o que teve menor incidência, com apenas 20%.

Diversas pesquisas apontam que a *Salmonella* spp. tem importância quanto a gastroenterites apenas na fase de terminação. No entanto, uma pesquisa realizada por Roche *et al.* (2021) demonstrou que havia colonização de *Salmonella* spp. em linfonodos mesentéricos em 36% dos leitões de até quatro semanas analisados. Ainda, dentro desses 36% foi realizado tipificação da bactéria onde encontrou 35,4% de *Salmonella typhimurium*, sendo essa uma bactéria de grande importância quanto a saúde pública. Os autores afirmam que embora esses animais não apresentem sinal clínico, servem como manutenção do patógeno e favorece a incidência de problemas nas seguintes fases de vida do animal. Ainda citam a importância de realizar mais testes em leitões em fase de maternidade, pois esse é um dado que pode estar sendo negligenciado.

Contradizendo a pesquisa de Roche *et al.* (2021), em trabalho publicado por Silva *et al.* (2006), evidenciaram que até a fase da creche não foi realizado o isolamento da *Salmonella* spp. em nenhum leitão. No entanto, Roche *et al.* (2021) apontam que o baixo isolamento de *Salmonella* spp. em leitões de até 4 semanas é decorrente de falhas do material utilizado, sendo que o ideal a se utilizar são amostras de tonsilas e linfonodos mesentéricos.

2148

Nesta pesquisa, embora tenha sido utilizado material de conteúdo intestinal, e apenas o histopatológico realizado em linfonodos mesentéricos, através da análise das características de crescimento e bioquímicos se chegou ao resultado de isolamento de *Salmonella* spp. em 51,4% das amostras. De acordo com Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011), a *Salmonella* spp. apresenta como característica o resultado positivo no citrato de Simmons, e no ágar TSI pode ser observado reação ácida com superfície alcalina, podendo ou não produzir gás em superfície, e produzindo ou não sulfeto de hidrogênio, sendo esses fatores variáveis conforme o sorotipo isolado. O resultado encontrado foi de 51,4% de reação positiva no citrato de Simmons, e a produção de sulfeto de hidrogênio esteve presente em 54,2% das amostras. Pela falta de materiais não se possibilitou determinar qual o sorotipo das amostras, entretanto, este resultado mostra que é necessária uma maior atenção quanto a salmonelose inclusive nas fases de maternidade.

Desta forma, todas as amostras apresentaram isolamento positivo para alguma bactéria, com lesão histopatológica em pelo menos um dos tecidos analisados.

Correspondendo a literatura, a bactéria mais isolada foi a *E. coli*, com 62,8% positivos. Em segundo, foi isolado 51,4% de *Salmonella* spp. o que demonstra que este patógeno pode ser um grande potencial causador de diarreia em leitões, necessitando de maiores estudos na área. Por fim, o *Clostridium* spp. apresentou a menor incidência, com 20%, no entanto, nas amostras isoladas foi possível analisar que as lesões histológicas corroboram com as encontradas na literatura.

CONSIDERAÇÕES

A suinocultura é um importante segmento na economia nacional, portanto, com os anos vem ampliando a sua tecnificação para aumentar a produtividade. Com isso, devido principalmente ao alto índice de adensamento, os problemas sanitários se mostram cada vez mais presentes nas granjas, com grande incidência de doenças como a colibacilose e a clostridiose, afetando diretamente a lucratividade e a qualidade final do produto.

Com isso, nesta pesquisa se evidenciou que em todas as amostras analisadas foi possível isolar algum agente bacteriano, onde a bactéria isolada com maior prevalência foi a *Escherichia coli*, sendo essa responsável por grandes prejuízos envolvendo gastroenterites. Ademais, as amostras em totalidade exibiram alguma lesão histopatológica, que se mantiveram com um padrão semelhante em todas as analisadas.

2149

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, L. M. F.; BROGGIO, B. Doenças entéricas na suinocultura – maternidade. Nutri time Vol. Viçosa, v.18, n.2, p.8918-8929, mar/abr. 2021. Disponível em: <https://nutritime.com.br/wp-content/uploads/2021/03/Artigo-537.pdf> Acesso em: 25 jul. 2022.

ASSOCIACÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. Relatório Anual 2021. Brasil, 2021. Disponível em: http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf Acesso em: 25 jul. 2022.

BORTOLOZZO, P. F.; *et al.* Avanços em sanidade, produção e reprodução de suínos IV. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 12., 2019, Porto Alegre. Anais [...] Porto Alegre, maio de 2019: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019. p.299. Disponível em: <https://www.conferencebr.com/conteudo/arquivo/anais-xii-sinsui-2019-1634570862.pdf> Acesso em: 25 jul. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. Brasília, 2011. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_laboratorial_salmonella_spp.pdf Acesso em: 25 jul. 2022.

CALDERANO, F. F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.68, n.1, p.29-34, jan./jun., 2001. Disponível em: http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V68_1/6.pdf Acesso em: 25 jul. 2022.

DRUMMOND, V. O. Detecção de genes de enterotoxinas, caracterização bioquímica e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos do Distrito Federal. Brasília, 2011. 75f. Tese (Mestrado em Saúde Animal), Faculdade de Agronomia e Veterinária - Universidade de Brasília. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/9018/1/2011_ViniciusOliveiraDrummond.pdf Acesso em: 25 jul. 2022.

GUIMARÃES, D.; *et al.* SUINOCULTURA: ESTRUTURA DA CADEIA PRODUTIVA, PANORAMA DO SETOR NO BRASIL E NO MUNDO E O APOIO DO BNDES. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.45, p.85-136, mar. 2017. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/11794/1/BS%2045%20Suinocultura%20-%20estrutura%20da%20cadeia%20produtiva%20c%20panorama%20do%20setor%20no%20Brasil%5b...%5d_P.pdf Acesso em: 25 jul. 2022.

HAMMER, J.M.; FUHRMAN, M.; WALZ, M. Serological evaluation of a *Clostridium perfringens* type A toxóide in a commercial swine herd. J. Swine Health Prod., v.16, n.1, p.37-40, 2008. Disponível em: <https://www.aasv.org/shap/issues/v16n1/v16n1p37.htm> Acesso em: 25 jul. 2022.

MORÉS, N.; BARCELLOS. D. E. Colibacilose neonatal. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (eds). Doenças dos Suínos. 2ª ed. Goiânia: Cãnone Editorial, 2012. p.116-121.

2150

ROCHE, M. B.; *et al.* *Salmonella* Infection in Nursery Piglets and Its Role in the Spread of Salmonellosis to Further Production Periods. Pathogens. v.16, n.2, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/2/123> Acesso em: 25 jul. 2022.

ROMANHOLI, N. L. Presença e perfil de resistência a antibióticos de *Escherichia coli* diarreio gênicas obtidas de fezes de suínos. Viçosa, 2018. 77f. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/24000/1/texto%20completo.pdf> Acesso em: 25 jul. 2022.

SALVARANI, F. M. Clostrídios entéricos de leitões neonatos, desenvolvimento e avaliação de uma vacina experimental. Belo Horizonte, 2011. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-8R2GQU/1/tese_felipe_masiero_salvarani.pdf Acesso em: 25 jul. 2022.

SILVA, L. E.; *et al.* Infecção por *Salmonella* entérica e suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. Arq. Bra. Med. Vet. Zootec., v.58, n.4, p.455-461, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/pB6FWQT36HDqd8DTXpqX3vL/?lang=pt> Acesso em: 25 jul. 2022.

SOUZA, G. R. PRINCIPAIS CAUSAS DE MORTALIDADE DE LEITÕES NA FASE DE MATERNIDADE SEM SISTEMA DE PRODUÇÃO DE SUÍNOS EM CICLO COMPLETO. Rio Verde, 2020. 90f. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano. Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/bitstream/prefix/1532/3/Disserta%20a7%20a30%20oficial%20Rob%20a9rio.pdf> Acesso em: 25 jul. 2022.

SOUZA, T. L. *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*: UMA REVISÃO. Belo Horizonte, 2017. 48f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/FAMM-BDFUYY/1/clostridium_perfringens_uma_revis_o__lucas_teixeira_souza.pdf Acesso em: 25 jul. 2022.

ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N.; BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras*, v.51, n.5, p.443-453, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/qFcChrb6XGRvb75FDfjgrDR/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 25 jul. 2022.