



Estudos com Enteropatógenos no Brasil

Roberto Guedes

guedesufmg@gmail.com



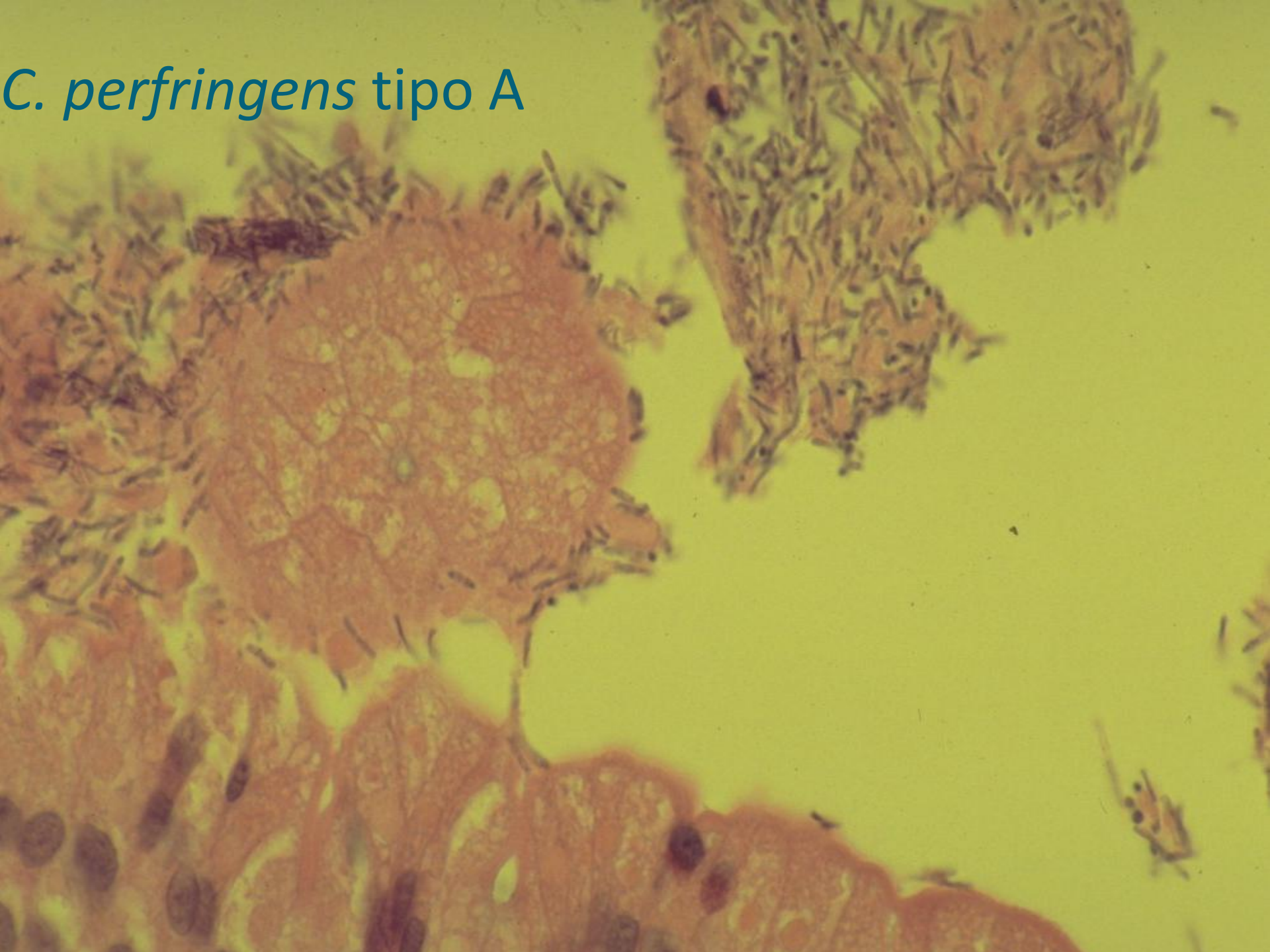
FPAS

Federação Portuguesa
de Associações de Suinicultores



Organización Iberoamericana de Porcicultura

C. perfringens tipo A



Frequência de diagnóstico de vários agentes etiológicos em fezes diarréicas de leitões – ISU/VDL

	Retrospectivo (n=273)	Prospectivos (n=77)
<i>C. perfringens</i> tipo A	48%	47%
<i>E. coli</i>	20%	3%
<i>C. difficile</i>	10%	48%
Rotavirus	9%	13%
Coccidiose	7%	0%

Fonte: Yaeger, 2007 (AASV)

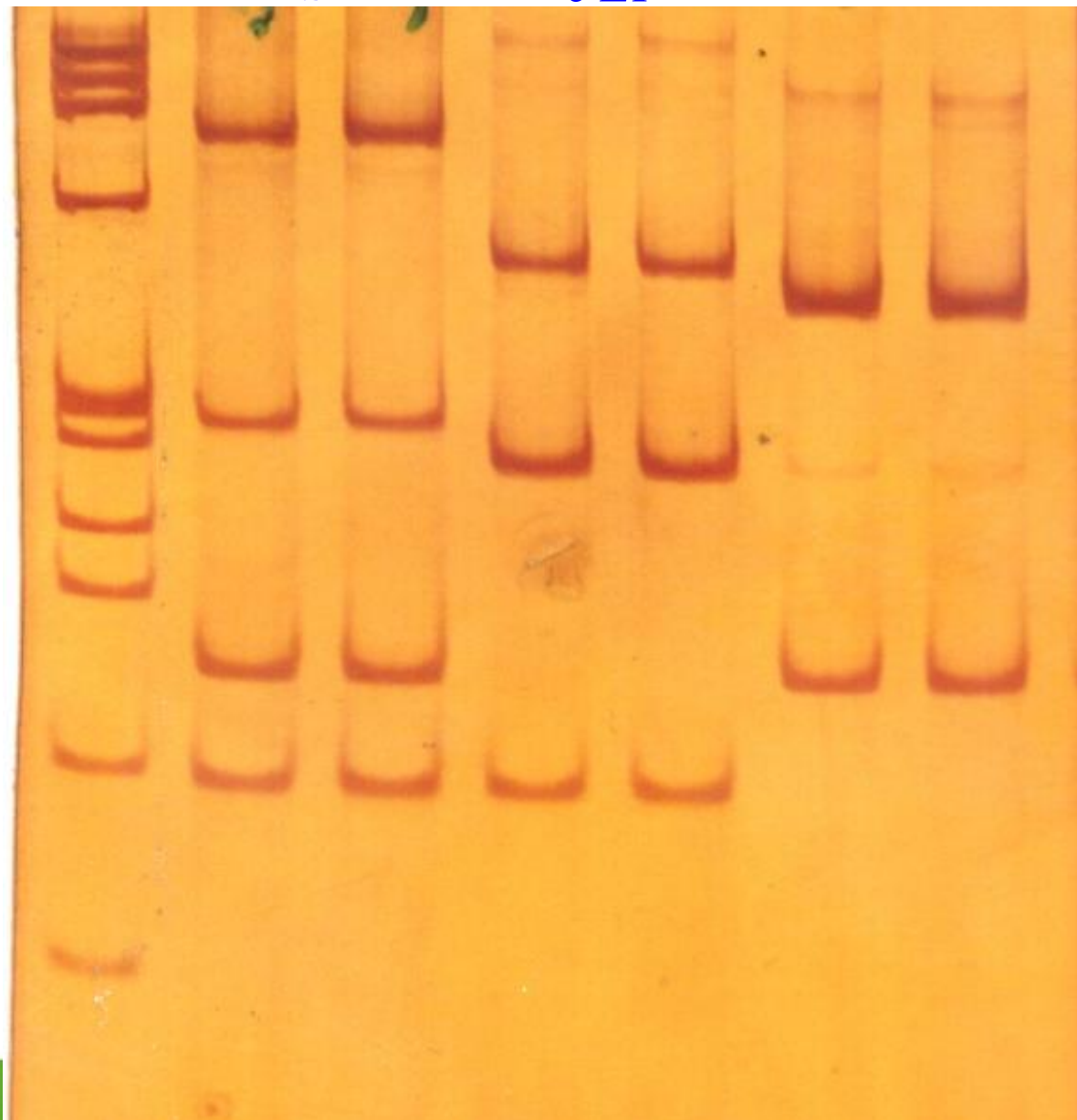
Deteccão de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos

[*Detection of pathogenic strains by multiplex PCR and antimicrobial sensitivity of Escherichia coli isolated from piglets*]

N.R. Macêdo^{1,5}, C.P.L. Menezes², A.P. Lage^{1,6}, L.E. Ristow³, A. Reis⁴, R.M.C. Guedes^{1*}

- Somente 42 (29,17%) das 144 amostras estudadas foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência testados
 - 23 amostras: genes de fímbria e toxinas
 - 7 amostras: somente genes de toxinas
 - 12 amostras: somente de fímbria.
- Florfenicol e Ceftiofur sódico foram as drogas de melhor eficácia sobre cepas virulentas de *E. coli* em testes *in vitro* (antibiograma)

	F18, Stb, StaP	K88, Stb	987P e
Marcador	e Stx2e	e LT	StaP



— Stx2e

— K88
— 987P

— F18
— LT

— StaP

— Stb

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

GENOTIPAGEM DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*
ISOLADOS DE LEITÕES DIARRÉICOS

A.A.S. Vieira¹, R.M.C. Guedes², F.M. Salvarani¹, R.O.S. Silva¹, R.A. Assis³, F.C.F. Lobato¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Bacteriose e Pesquisa, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brasil.
E-mail: flobato@vet.ufmg.br

Amostras de campo (Perdigão - Rio Verde)
(Total: 75 amostras)

- 59 amostras foi isolado bacilo gram positivo anaeróbios
- 27 identificadas como *C. perfringens* (36%)
- 21 tipo A (28%), 5 tipo C (6,67%) e 1 tipo D (1,3%)

4 amostras produtoras de Beta 2

nenhuma amostra produtora de enterotoxina

New neonatal diarrhoea syndrome in Denmark

B. Svensmark

- *Laboratory of Swine Diseases – Kjellerup. Recebe de 2 a 4 mil suínos por ano para diagnóstico. Nos últimos 3 anos aproximadamente 80% das submissões tem sido casos de diarreia neonatal.*

Achados bacteriológicos e virológicos em 220 submissões de leitões até 5 dias de idade com quadro clínico de enterite, no período de 2008 e 2009

Agente	Positivo	Total de análises	Percentual
<i>E. coli</i> não hemolítica	121	220	55
<i>E. coli</i> hemolítica	15	220	7
<i>E. coli</i> Enterotoxigênica	32	195	16
<i>Cl. perfringens</i> tipo A	177	220	80
<i>Cl. perfringens</i> tipo C	12	220	0
<i>Cl. difficile</i>	20	63	32
Rotavirus	16	134	12

Fonte: *Proceedings of the 1º ESPHM, Copenhagen, DK 2009*

Dissertação de mestrado – UFRGS

Prof. David Barcellos (Eduardo Lippke, 2008)



Freqüência 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



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. (Lippke, 2008)

Agentes	Leitegadas caso ($n=147$)		Leitegadas controle ($n=129$)		Razão de chance	IC (95%)		p
	n	%	n	%				
<i>E. coli</i> hemol.	0	0,0	0	0,0				
<i>Cl. perfringens</i> C	0	0,0	0	0,0				
<i>Cl. perfringens</i> A	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)



Frequência de enteropatógenos em leitões de até sete dias de vida, na região do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, MG

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

Quantificação de colônias de *Clostridium perfringens* tipo A



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



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

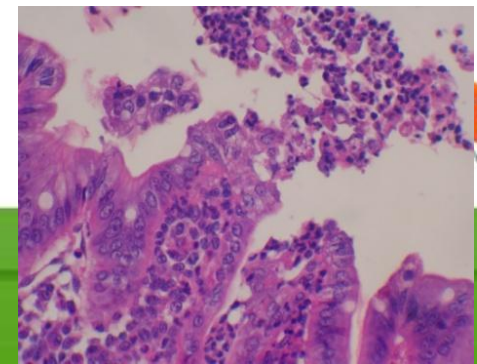
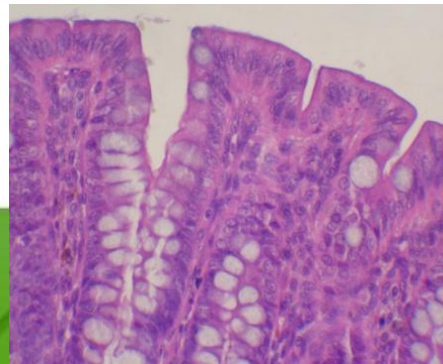


Clostridium difficile

(Costa Cruz Jr, 2010)



- Baixo valor preditivo do edema de mesocólon, quando consideradas todas as suas intensidades, mas elevado valor preditivo em lesões acentuadas
- Quando considerado somente o edema de mesocólon acentuado, há associação com a presença de toxinas de *C. difficile* ($p \leq 0,05$)
- As alterações inflamatórias histológicas encontradas confirmam o maior valor preditivo em relação à presença de toxinas de *C. difficile*



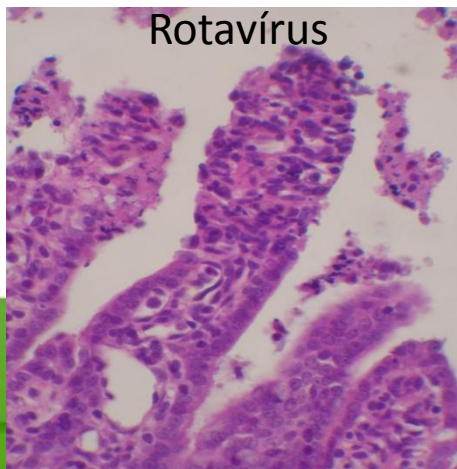
Principais desafios entéricos na maternidade

- Determinar a real importância do *C. perfringens* A, e seu possível papel na síndrome diarreica de leitões lactentes
- Diagnóstico rápido e intervenção em casos de *C. difficile* (kits !!!)
- Mudar a percepção de que *E. coli* seria a responsável por todos os problemas na maternidade
- Realizar testes para rotavírus
- Entender o importante papel da histopatologia no direcionamento do diagnóstico

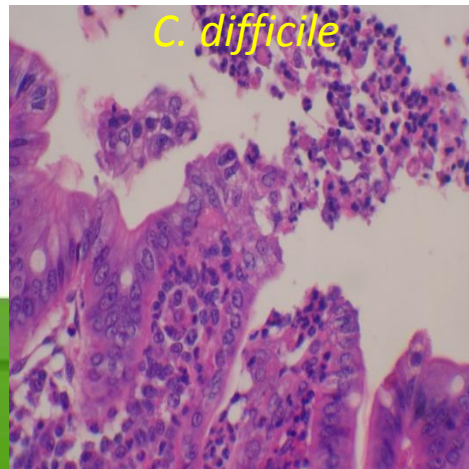
Normal



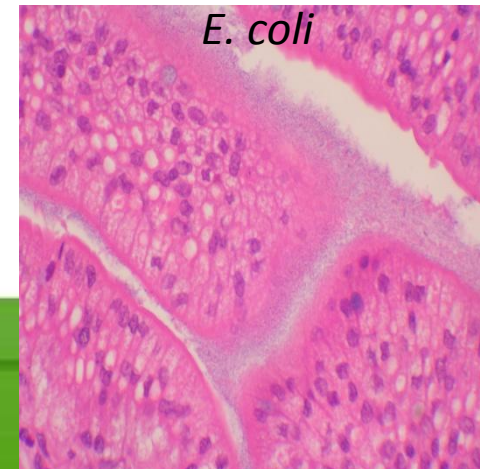
Rotavírus



C. difficile



E. coli



Animais de recria e terminação

Grupo da USP – profa. Andrea Micke Moreno



Baccaro et al (2003) Identification of bacterial agents of enteric disease by multiplex PCR in growing-finishing pigs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:225-229.

Agentes	Amostras	%
<i>Lawsonia intracellularis</i>	70	13,0 (17,4)
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	5	1,0 (4,4)
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	8	1,4 (1,8)
<i>Salmonella</i> sp	26	4,8 (6,6)
<i>L. intracellularis</i> + <i>B. pilosicoli</i>	16	3,0
<i>L. intracellularis</i> + <i>Salmonella</i>	4	1,0
<i>B. hyodysenteriae</i> + <i>Salmonella</i>	2	0,4
<i>L. intracellularis</i> + <i>B. pilosicoli</i> + <i>Salmonella</i>	2	0,4
Negativos	408	75
Total	541	100



Animais de recria e terminação

Prof. Roberto Guedes (UFMG – Aline Viott, 2010)

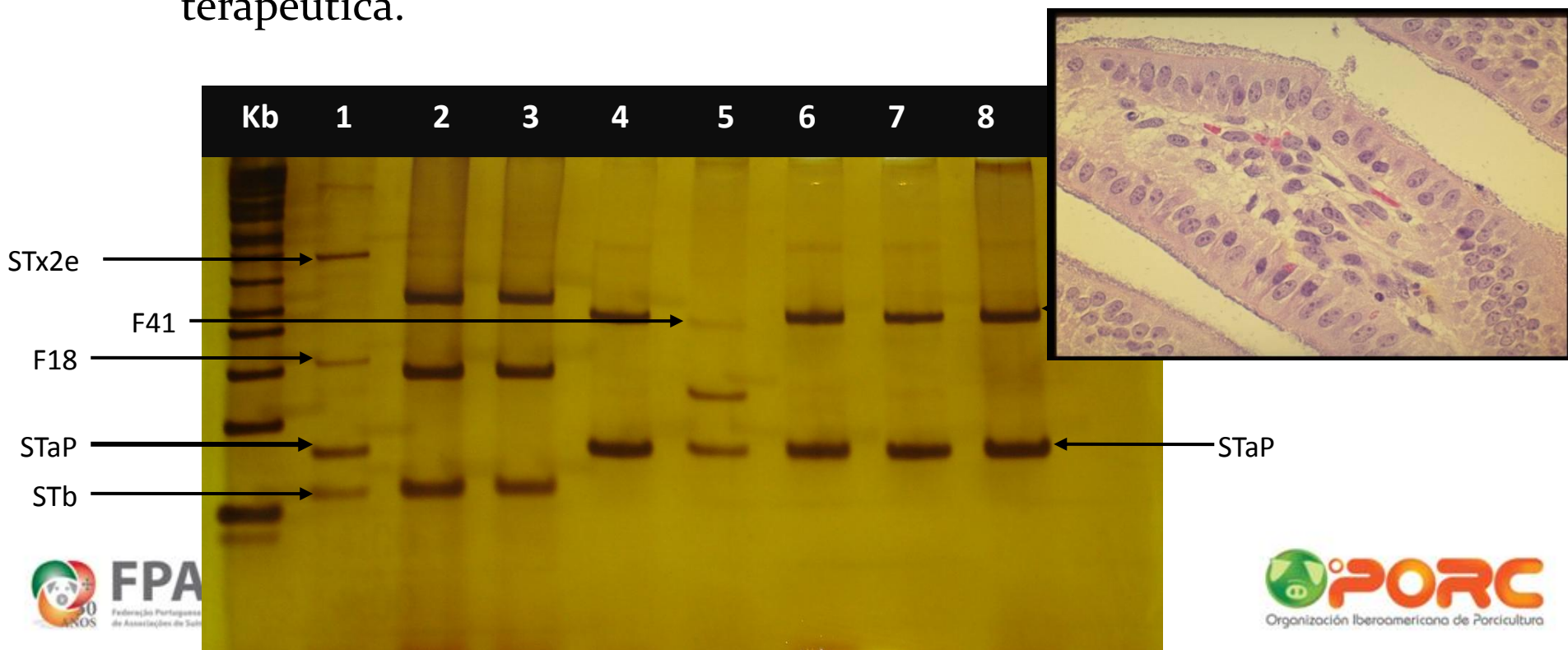


Distribuição da prevalência encontrada no estado de Minas Gerais de acordo com o tamanho do rebanho, região e enteropatógeno; *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira pilosicoli*, *E. coli* enterotoxigênica, *Salmonella typhimurium* e infecção mista considerando positividade da granja dentre as 46 avaliadas.

Agente	Granja				Total	
	100-500 matrizes		>500 matrizes			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Lawsonia intracellularis</i>	5	10,87	4	8,69	9	19,56 (47,8)
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicas (ET)	2	4,34	3	6,52	5	10,87 (26,1)
<i>Salmonella Typhimurium</i>	1	2,18	2	4,34	3	6,52 (28,2)
<i>E. coli</i> (ET) + <i>L. intracellularis</i>	1	2,18	2	4,34	3	6,52
<i>Salm typhim</i> + <i>L. intracellularis</i>	4	8,69	1	2,18	5	10,87
<i>Salm typhim</i> + <i>L. intracellularis</i> + <i>E. coli</i> (ET)	4	8,69	0	0	4	8,69
<i>B. pilosicoli</i> + <i>L. intracellularis</i>	1	2,18	0	0	1	2,18
<i>B. pilosicoli</i> + <i>L. Intracellularis</i> + <i>S. Typhimurium</i>	0	0	1	2,18	1	2,18

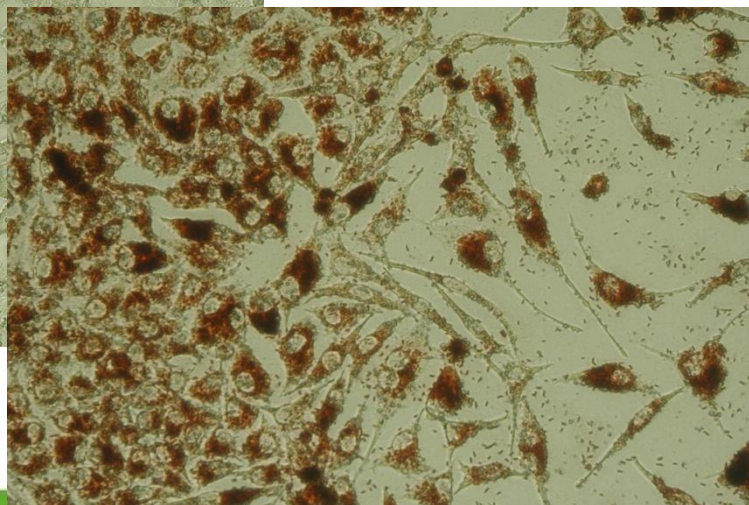
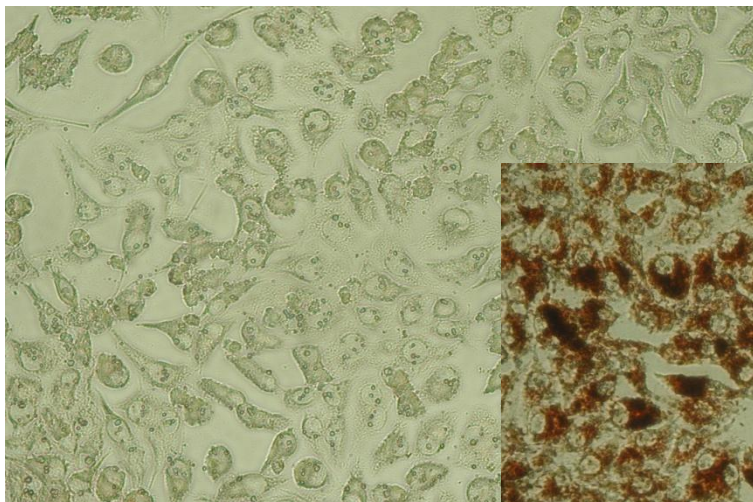
Principais desafios entéricos na recria

- Entender a real importância da *E. coli* enterotoxigênica como patógeno nesta fase. Necessidade de tipificação do agente e associação com alterações histológicas, além de resposta terapêutica.



Principais desafios entéricos na recria

- Testes rápidos a campo para o diagnóstico de *L. intracellularis*
- Maior disponibilidade de testes sorológicos para realização de perfis de rebanho
- MICs com cepas brasileiras e comparação de sensibilidade antimicrobiana





Use of tylvalosin-medicated feed to control porcine proliferative enteropathy

R. M. C. Guedes, S. A. França, G. S. Machado, M. A. Blumer, E. C. da Costa Cruz Jr

TABLE 1: Mean (sd) weight, average daily weight gain (ADG), average daily feed consumption (ADFC) and feed conversion rate (FCR) of 30 non-medicated pigs and 30 pigs fed a diet medicated with 50 ppm tylvalosin tartrate

Group of pigs	Weight (kg)		ADG (day -3 to 20) (kg/day)	ADFC (day -1 to 20) (g/day)	FCR (kg feed/kg gain)
	Day -3	Day 20			
Non-medicated	10.30 (1.17)	20.69 (1.73) ^a	0.451 (0.076) ^a	862 (96)	1.931 (0.199) ^a
Medicated	10.30 (1.17)	22.75 (2.24) ^b	0.541 (0.054) ^b	896 (90)	1.655 (0.017) ^b

^{a,b} Different letters in a column indicate a significant difference ($P < 0.05$) between the groups

TABLE 2: Numbers of pigs and length and severity of gross lesions characteristic of porcine proliferative enteropathy observed in 30 non-medicated pigs and the 30 pigs fed a diet medicated with 50 ppm tylvalosin tartrate

Group of pigs	Gross lesion score*				Number of animals with lesions	Range of length of intestinal lesions (cm)
	0	1	2	3		
Non-medicated	7	23	0	0	23	9-366
Medicated	21	9	0	0	9	7-43

* 0 Normal, 1 Thickened mucosa, 2 Thickened and necrotic mucosa, 3 Thickened mucosa associated with blood clots in the lumen

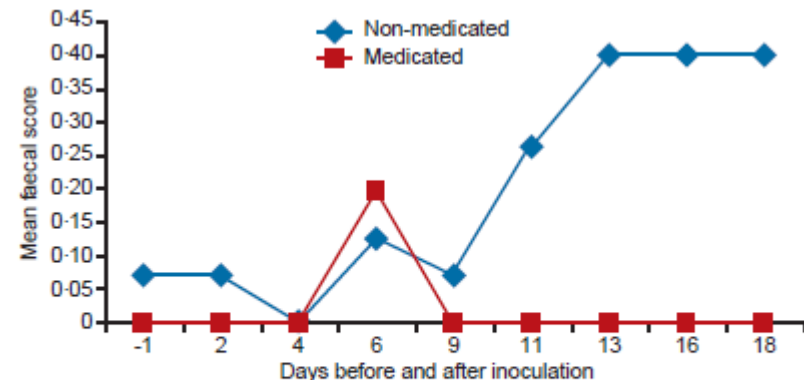


TABLE 3: Intensity of infection with *Lawsonia intracellularis* based on immunohistochemistry (IHC) labelling in fragments of ileum from groups of 30 pigs that were non-medicated or medicated with 50 ppm tylvalosin tartrate in feed, 20 days postinfection

Group of pigs	Score of <i>L. intracellularis</i> antigen labelling by IHC*					Number (%) of infected animals by IHC
	0	1	2	3	4	
Non-medicated	1	3	4	18	4	29 (96.7) ^a
Medicated	14	5	8	3	0	16 (53.3) ^b

* 0 No positive antigen labelled, 1 One isolated focal area of antigen labelled, 2 Multifocal areas of antigen labelled, 3 Majority of the mucosa has positive antigen labelling, 4 All of the mucosa has positive antigen labelling

^{a,b} Different letters in the same column indicate a significant difference ($P < 0.05$) between groups

In-feed macrolide Leucomycin (Leucomag 30% PR) for prevention of proliferative enteropathy in experimentally infected pigs



Ração medicada com Leucomicina (Leucomag 30% PR) para prevenção da enteropatia proliferativa em leitões experimentalmente infectados

**Silvia de Araújo França^I Glauber de Souza Machado^{II} Paulo Roberto Andreoli^{III}
Julio César Borges Santos^I Roberto Maurício Carvalho Guedes^{I*}**

Table 1 - Average weight, in kg, average daily gain (ADG), in kg per day, average daily feed consumption (ADFC), in grams per day, and feed conversion rate (FCR) of non-medicated (T1), medicated with 90ppm (T2) and with 180ppm (T3) of leucomycin groups, in different times during the study.

Groups	Wt day -2	Wt day 13	ADG -2 to 13	Wt day 23	ADG -2 to 23
T1	6.278 ± 0.812 ^{a*}	11.602 ± 1.390 ^a	0.355 ± 0.064 ^a	8.458 ± 3.021 ^a	0.339 ± 0.119 ^a
T2	6.068 ± 0.667 ^a	11.843 ± 1.596 ^{ab}	0.385 ± 0.080 ^{ab}	10.474 ± 2.14 ^b	0.419 ± 0.086 ^b
T3	6.227 ± 0.686 ^a	12.267 ± 1.924 ^b	0.403 ± 0.095 ^b	10.972 ± 2.625 ^b	0.438 ± 0.105 ^b
	ADFC from -2 to 13	ADFC from 14 to 23	ADFC from -2 to 23	FCR from -2 to 23	
T1	649.0 ± 59.9a [*]	547.7 ± 99.8 ^a	600.8 ± 61.8a	1.838 ± 0.328a	
T2	670.9 ± 53.5a	699.0 ± 69.6b	684.3 ± 42.5b	1.632 ± 0.109ab	
T3	661.2 ± 45.8a	635.0 ± 98.7ab	662.3 ± 62.3ab	1.448 ± 0.269b	

* Different letters in a column indicate statistical difference among groups (P<0.05).



Table 2 - Length and severity of gross lesions characteristic of porcine proliferative enteropathy and intensity of *L. intracellularis* infection based on the immunohistochemistry (IHC) labeling in ileum fragments of pigs from groups unmedicated (T1), medicated with 90ppm (T2) and with 180ppm of leucomycin (T3) on day 23pi.

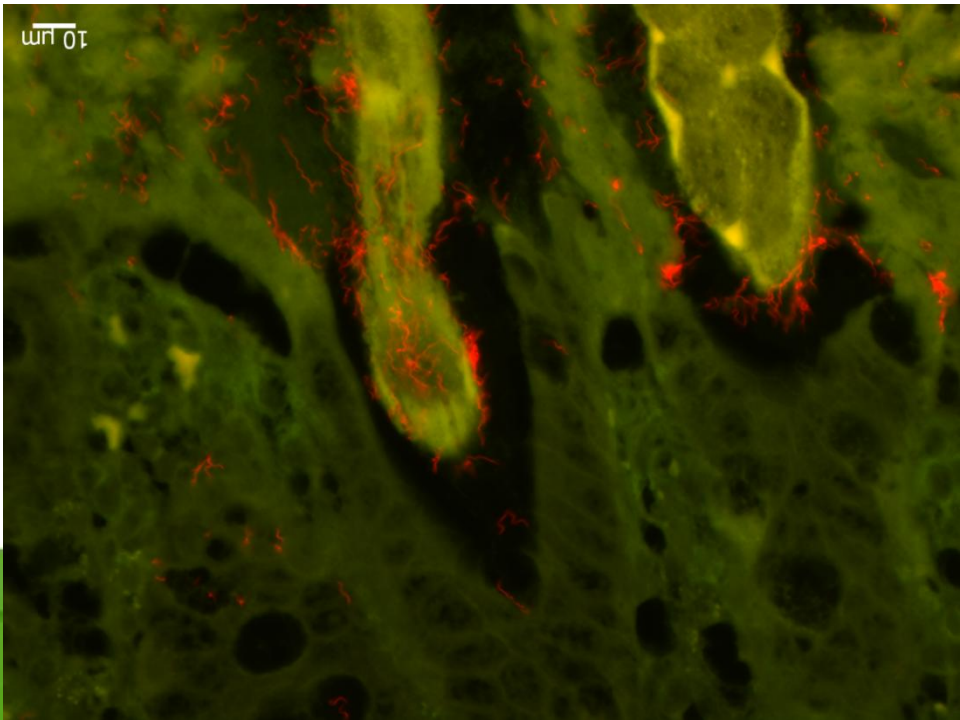
Groups	-----Gross lesion score-----				Number of animals with lesions	Total intestine lesion length (cm)	
	0 *	1	2	3			
T1 (n=29)	18	9	1	1	11	869	
T2 (n=23)	18	4	0	1	5	473	
T3 (n=27)	18	9	0	0	9	331	
	Score of <i>L. intracellularis</i> antigen labeling by immunohistochemistry				Number of infected animals by IHC	% of infected animals by IHC	
	0 *	1	2	3			4
T1 (n=28)	2	3	8	10	5	26	92.86
T2 (n=23)	9	9	3	1	1	14	60.87
T3 (n=26)	2	5	13	5	1	25	92.59

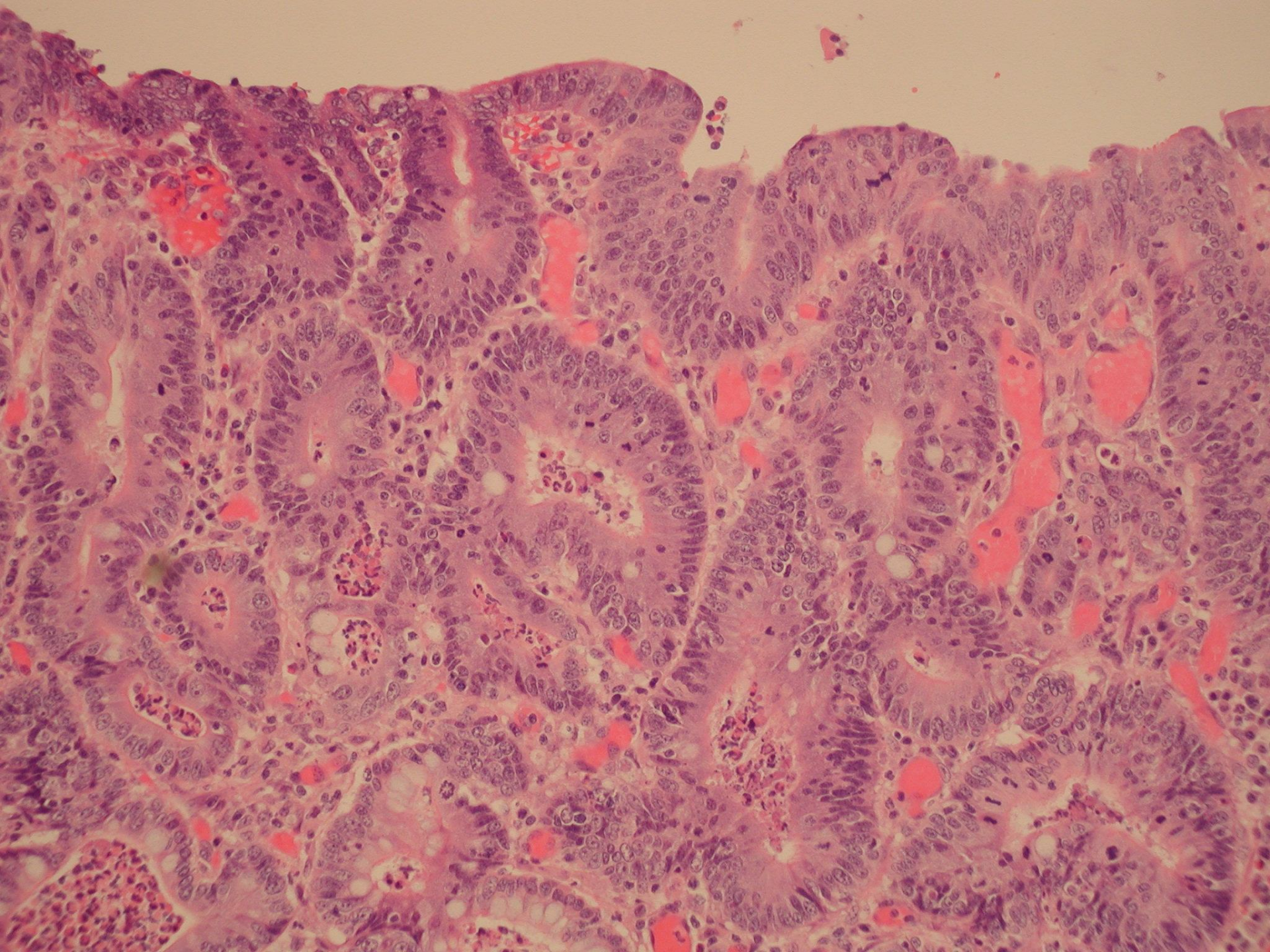
* Score 0=normal; 1=thickened mucosa; 2=thickened and necrotic mucosa; 3=thickened mucosa associated with blood clots in the lumen.

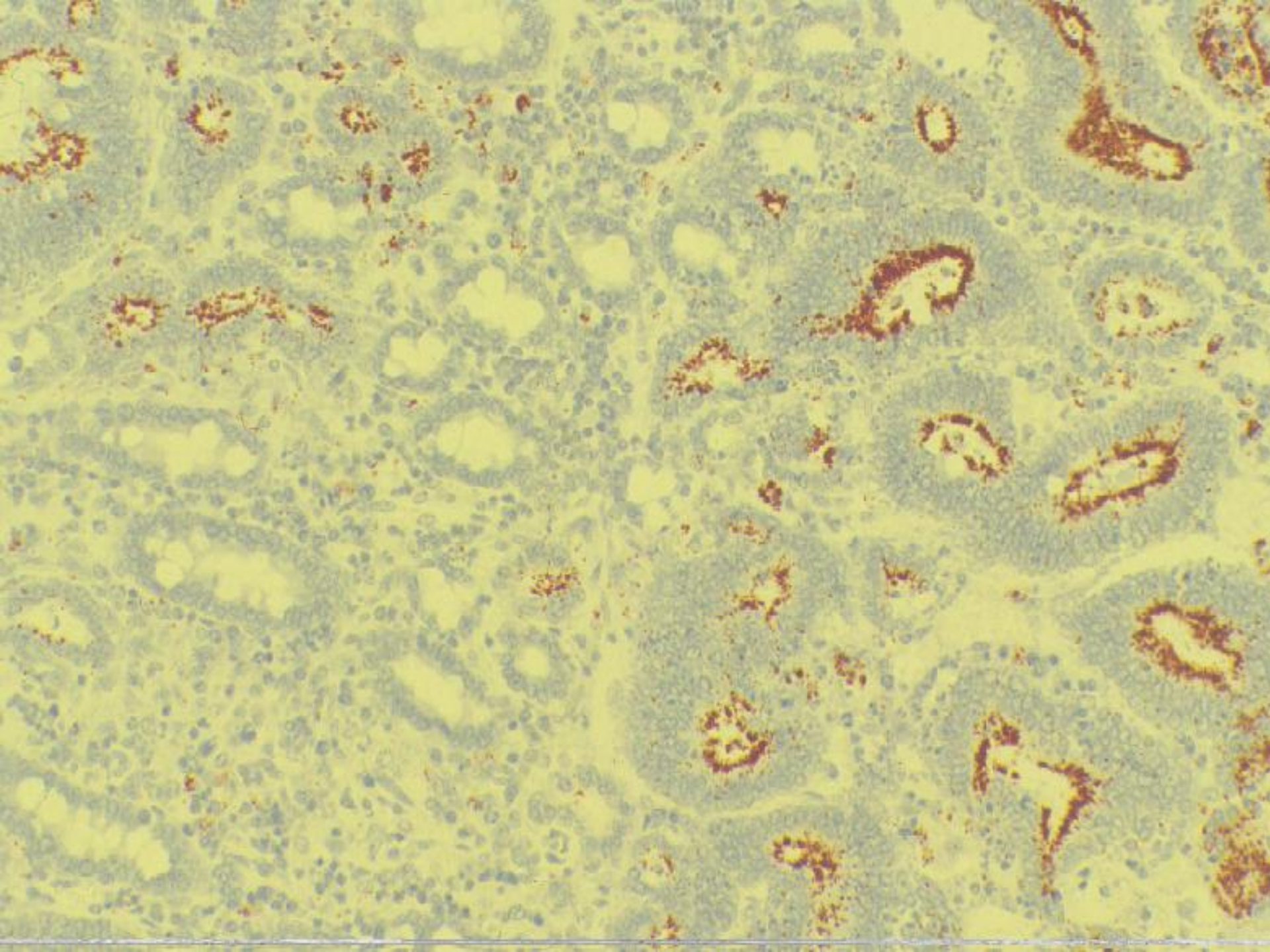
Grade 0=no positive antigen labeled; Grade 1=one isolated focal area of antigen labeled; Grade 2=multifocal areas of antigen labeled; Grade 3=majority of the mucosa has positive antigen labeled; and Grade 4=all of the mucosa has positive antigen labeled.

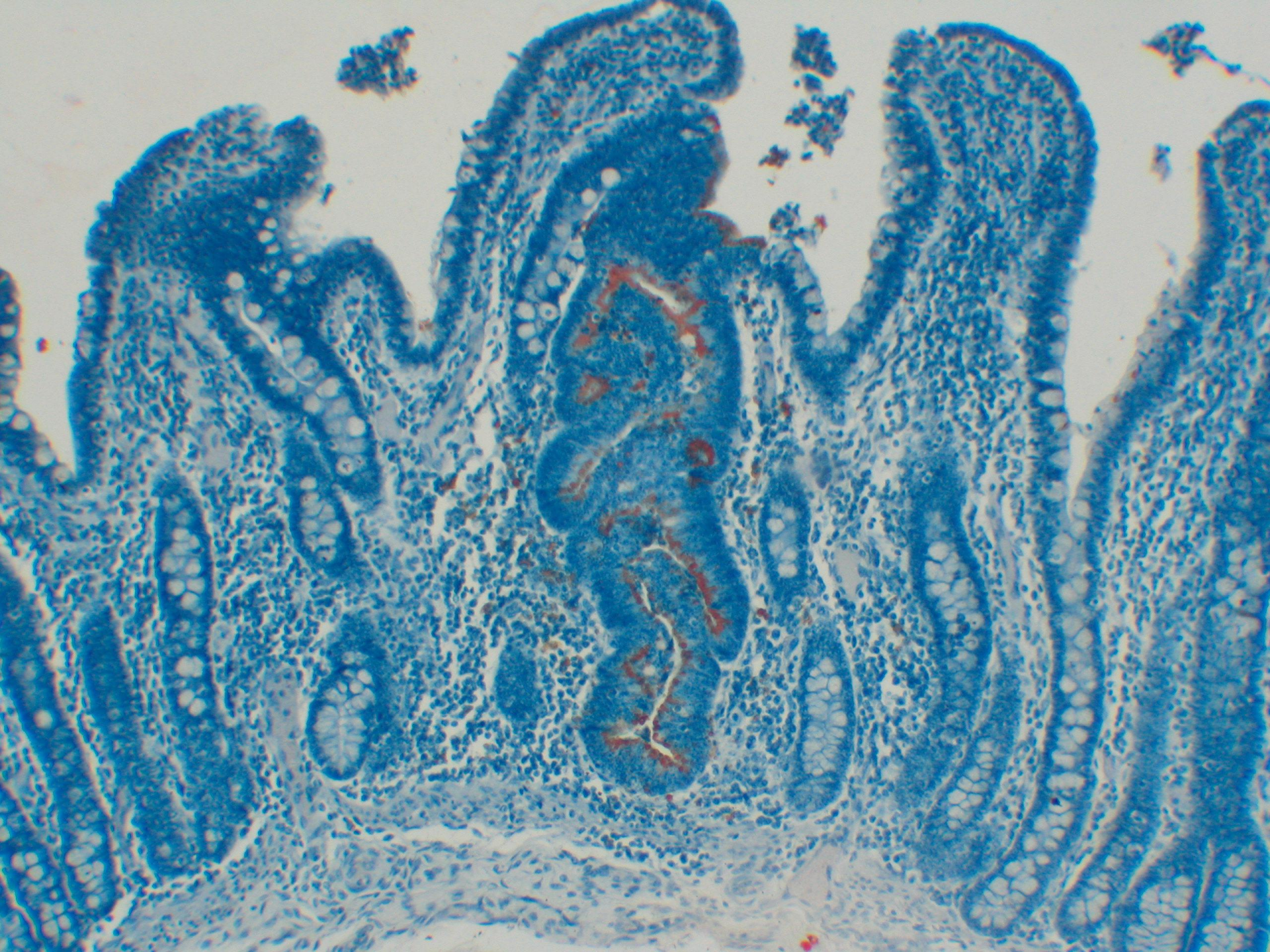
Principais desafios entéricos na recria

- Maior utilização da PCR para o diagnóstico de infecções por *Brachyspiras* patogênicas
- Pesquisa e potencialmente laboratórios realizando isolamento e MICs de *Brachyspiras*
- Desenvolvimento de FISH para diagnóstico de *Brachypiras* em cortes histológicos
- Diminuição da prevalência de *Salmonella* Typhimurium



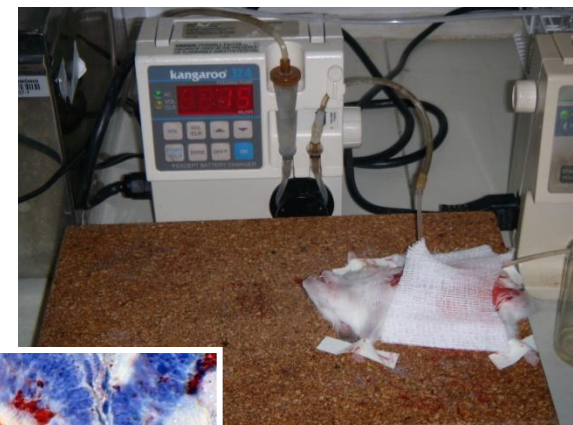
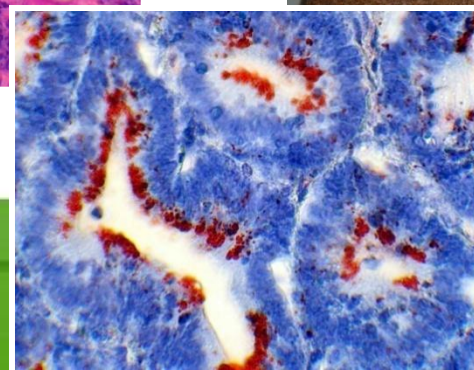
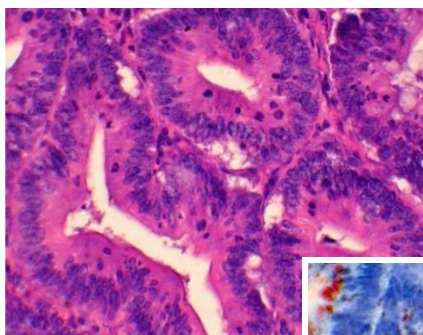
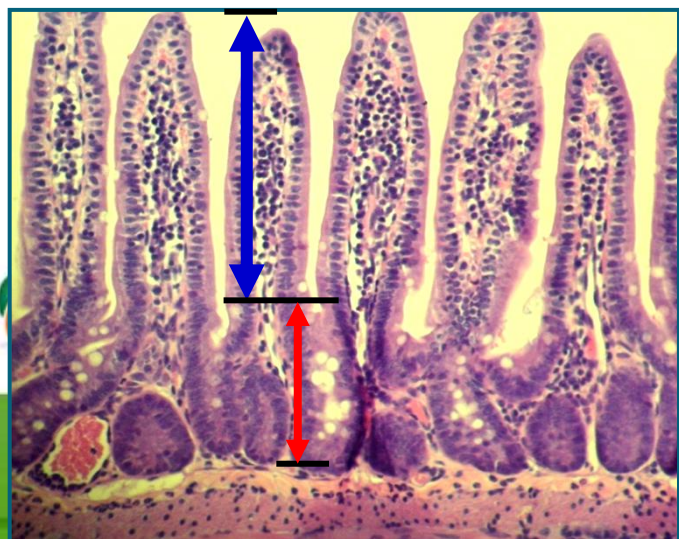


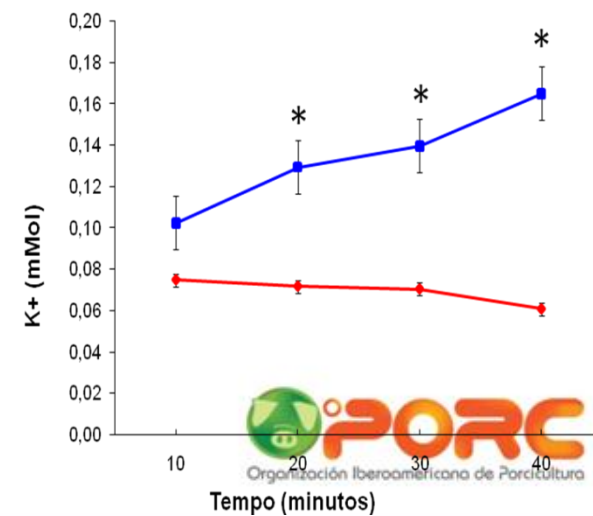
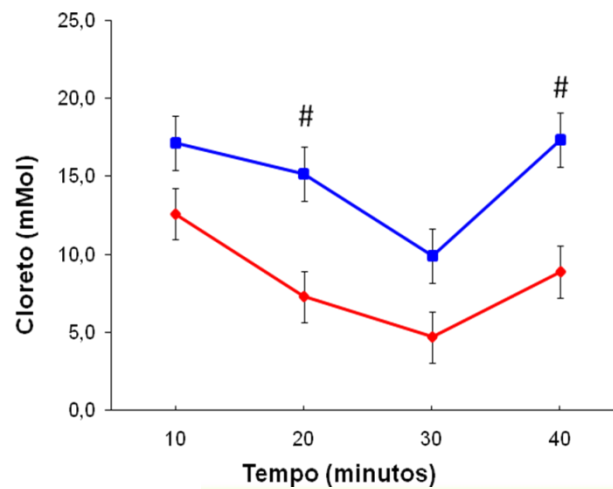
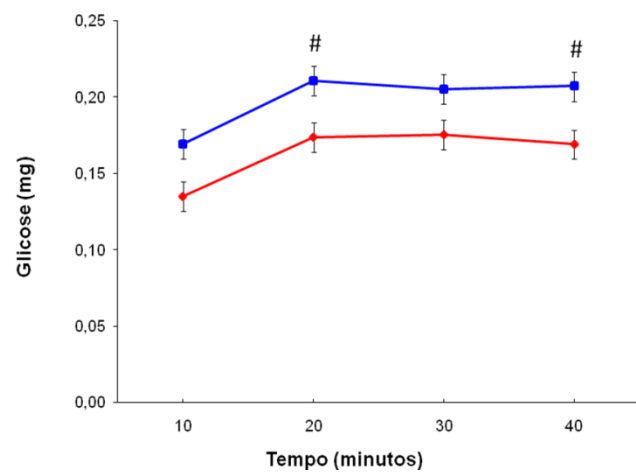
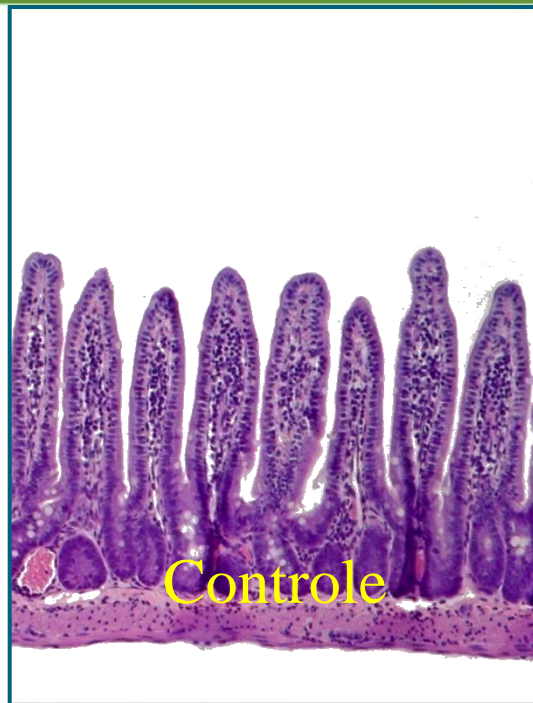




Intestinal absorption and histomorphometry in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*

(Fabio A. Vannucci, Elizabeth L. Borges, Juliana S. V. Oliveira, Roberto Guedes)





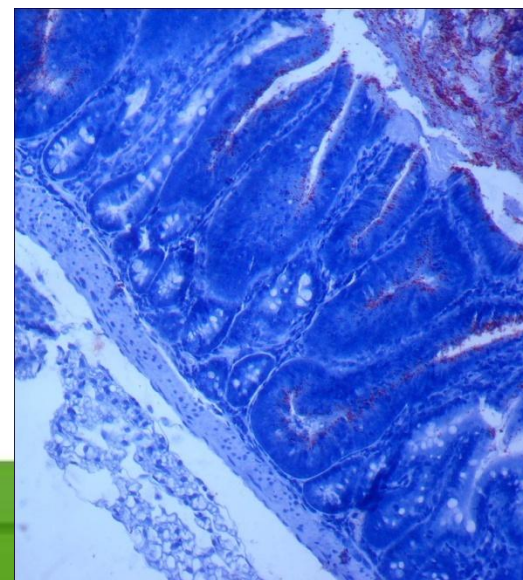
—●— Controle (n=25)
—●— Lawsonia+ (n=25)

* $p < 0.05$
$p < 0.01$

SUSCEPTIBILIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGO A INFEÇÃO POR *LAWSONIA INTRACELLULARIS*

Aline M. Viott; Fabio A. Vannucci; Mirella C. Costa; Juliana Saes; Roberto Guedes

- . 96 camundongos: Swiss
Balb/C
C57
DB/A₂
- . Três grupos: controle, cultura pura e homogenado de mucosa
- . Sacrificados nos dias 7, 14, 21 e 28 pi.
- . Avaliação macroscópica, microscópica, imunoistoquímica e molecular (*L. intracellularis*).



Considerações finais

- Necesitamos de parcerias para melhorar qualidade dos trabalhos desenvolvidos
- Precisamos de maior utilização interação veterinário laboratório
- Maior disponibilidade de técnicas diagnósticos
- Conscientização de produtores de que o investimento de exames complementares, no final do dia, reduz custos
- Mais estudos de prevalência e sensibilidade microbiana