

Silvia Maria Oliveira | Sayd n 99



ALGUNS ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA DE Isospora suis BIESTER & MURRAY, 1934 EM GRANJAS DE SUINOS DA REGIAO LESTE DO ESTADO DE SAO PAULO

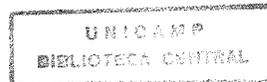
Tese apresentada à comissão de Pós-Graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, através da Sub-comissão de Pós-Graduação em Parasitologia, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Parasitologia.

Orientadora: Urara/Kawazoe n

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - CAMPINAS, SP.

ABRIL DE 1993

este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Silvia Maria Oliveira Sayd



10 Maio 93
Kawazoe

9255499

Dedico este trabalho

A minha mãe Deisi, minha irmã Regina e meu marido Ricardo, pelo incentivo e apoio incondicional e irrestrito em todos os momentos desta obra.

A minha filha Camila, pela luz da vida e eterna alegria.

Aos meus irmãos, Key e Paula, pelo estímulo e apoio presentes em todos os momentos .

Aos meus avós, Quinzote (in memoriam) e Genny, pelo exemplo de perseverança e altruísmo.

AGRADECIMENTOS

De modo especial à professora Urara Kawazoe, pela amizade, dedicação e indispensável orientação desta tese.

Ao Professor Dr Arício X. Linhares, pela confecção do gráfico e pela orientação da análise estatística utilizada, além das valiosas sugestões sobre o texto.

Aos Chefes de Departamento Profs. Marlene T. Ueta e Luiz C. de S. Lima e a secretária Célia C. Borelli pela atenção.

As técnicas de laboratório Cilene B. de Paula e Cirene A. de Lima pela compreensão, amizade e apoio.

As Médicas Veterinárias Maria Célia B. Monteiro, Erlete Vuaden e Maria Beatriz C. de Oliveira, pela amizade e carinho.

Ao J.F Laboratório, à Jose di Fábio e Tereza Kreft por acreditarem em meu trabalho, apoiarem e incentivarem.

Aos criadores de suínos Antonio Bacoquina, Alberto Butler, Antonio Simplicio, João Dalben, Sebastião Gianoti, Edvaldo Raymundo, Dora Cherkassky e Viviane Dalboni, aos veterinários Lourival Mendonça, Erlete Vuaden, Hélio Pessamilo, Estanislau Steck, Abraão A. Abrão, Cristina Atanasio, e ao Professor Anibal S. Moreti, pelo incentivo e fornecimento de amostras indispensáveis à realização deste trabalho.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa da Unicamp (FAEP Proc.265/91) e a CAPES (Proc. 02802) pelo auxílio financeiro e ao Departamento de Parasitologia da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade.

RESUMO

Atualmente Isospora suis vem sendo considerada como importante enteroparasita para leitões, causando severos danos à suinocultura industrial. O sinal clínico mais evidente é a diarréia pastosa amarelada, a qual não responde a tratamento com antibióticos. A doença representa 15 a 20% dos casos de diarréias de leitões lactentes enviados para diagnóstico nos laboratórios dos Estados Unidos e Canadá. No Brasil existem relatos de surtos da doença em Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os objetivos deste trabalho foram de verificar a prevalência de I. suis na Região Leste do Estado de São Paulo e observar a manifestação clínica da doença. Foram estudadas 33 granjas com e sem histórico de diarréia compatível com a isosporose, pertencentes a 20 Municípios. Foram colhidas 177 amostras de fezes em leitões entre 10 a 50 dias de idade, lactentes e desmamados. A presença de oocistos foi relacionada com o tipo de instalação e manejo da maternidade e creche. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do teste de Qui-quadrado. O presente trabalho mostrou que existe relação entre granja com histórico e presença de oocistos e a faixa etária mais acometida era de leitões entre 10 a 19 dias de idade. Em granjas sem histórico a frequência de oocistos era menor e ocorria igualmente entre leitões de 10 a 50 dias de idade. Não foi observado diferença entre a elimi-

nação de oocistos em leitões lactentes e desmamados. Em maternidades suspensas a presença de oocistos foi significativamente menor do que em maternidades "no chão e sujas", onde o acesso às fezes era maior. Em 7 amostras foram observados oocistos cuja parede apresentava-se delgada e retraída, semelhante a Sarcocystis spp. Quatro dessas amostras foram purificadas e inoculadas experimentalmente em 4 leitões para a confirmação da espécie. O ciclo biológico e os sinais clínicos confirmaram que os oocistos inoculados eram de I. suis. Entretanto novos estudos são necessários para esclarecer se os oocistos de parede delgada ocorrem em alguma fase particular do ciclo da Isospora suis ou se pertencem a cepas específicas.

ABSTRACT

Presently Isospora suis is considered as important enteropathogen of swine and cause a significant problem in the swine industry. The disease is associated with scours in piglets 5-10 days of age which are generally nonresponsive to most antibacterial drugs. Isosporosis accounts for about 15-20% of all cases of neonatal swine diarrhea submitted to United States and Canada diagnostic laboratories. They are in Brasil a report of isosporosis outbreak in Minas Gerais, Santa Catarina e Rio grande do Sul. The objective of this study was to verify the I.suis prevalence in East Sao Paulo Region and observe the clinical signs. It was performed 33 swine farms from 20 municipalites of Sao Paulo State, by collecting 177 fecal samples from nursing and weanling piglets. History of neonatal isosporosis as well type of farrowing and nursery houses of thouse farms were correlated to presence of I.suis oocysts. Six fecal samples were taken from each farm (2 from 10 to 19 day-old pigs, 2 from 20 to 29 days and another 2 from 30 to 50 day-old). Fecal consistency was also registered at the time of collection. Qui-square tests were used for statistical analysis. Oocists were more frequent in farms with history of neonatal isosporosis than in those without and

there were no relation to fecal consistency. In farms with history of isosporosis fecal samples from piglets between 10 to 19 day-old had higher frequency of oocysts than in other pigs. Their presence showed no difference between nursing and weanling pigs. Oocysts were more frequent in fecal samples collected from dirty solid floors than from self-cleaning floors in the farrowing houses. Type and management of nursery houses were not associated with the presence of oocysts in weaning pigs.

A thin wall type I. suis oocysts was detected in seven of 177 fecal samples. This type of oocysts had a retracted wall similar to that from genus Sarcocystis. Four of this type of oocysts was inoculated in 4 five-day-old pigs free of contamination for species confirmation. The clinical signs, the lesions and the life cycle confirmed that it was a I. suis oocysts. Additional studies are needed to determine that the type of oocysts could appear in specific strains of I. suis or could be a characteristic of certain strains which occurs in the later stages of their development.

INDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Importância e prevalência da isosporose dos leitões.....	5
2.2. Características morfológicas e ciclo biológico da <u>Isospora suis</u>	7
2.3. Patogenia e patologia da isosporose suína.....	8
2.4. Diagnóstico diferencial de isosporose suína com outras diarréias de suínos.....	10
3. MATERIAL E METODOS.....	12
3.1. Localização e colheita de amostras.....	12
3.2. Identificação dos oocistos.....	14
3.3. Estudo dos oocistos de parede delgada.....	15
3.3.1. Inoculação experimental.....	16
3.3.2. Preparação do inóculo.....	17
3.4. Análise estatística.....	18
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSOES.....	52
7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	54

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura vem sendo apontada como uma importante fonte de proteína animal para a população humana. No Brasil, 46,5% das propriedades rurais estão envolvidas com a criação de suínos. O País destaca-se por apresentar o 4. maior rebanho do mundo, após a China, a ex- União Soviética e os Estados Unidos. Esses países, juntamente com a Alemanha, são responsáveis por 60,0% da produção mundial de carne de porco (ROPPA, 1988). O Brasil participa com apenas 1,8% desse mercado. Fatores como o estado sanitário e a baixa tecnologia empregada na maioria das granjas de suínos são responsáveis por essa pequena produtividade. A Região Sudeste é responsável por 18,2% do rebanho nacional, mas vem importando carne de porco devido ao seu grande mercado consumidor (ROPPA, 1988). No Estado de São Paulo existe um grande esforço dos criadores para aprimorar seus plantéis, e os investimentos na área são altos. As regiões de Campinas e Sorocaba mantêm mais de 50,0% da população de suínos do Estado e destacam-se pelo bom nível tecnológico e sanitário de suas granjas (Documento CATI, 1986). No entanto, permanecem as dúvidas dos criadores e dos veterinários sobre as causas de algumas enfermidades que provocam diarreias, principalmente em animais jovens. Algumas dessas doenças, en-

tre elas a isosporose dos leitões, vêm sendo estudada em outros Estados do País e no exterior, porém são desconhecidas em nosso meio. As fases mais vulneráveis às doenças dentro de uma suinocultura industrial são o aleitamento e desmame. Os leitões lactentes representam apenas 15,0% do curto ciclo de vida do suíno, mas metade dos casos submetidos ao diagnóstico laboratorial envolvem animais nessa fase: aproximadamente 90,0% desses casos são para a identificação dos agentes que causam a diarreia. As doenças infecciosas que provocam diarreia continuam sendo a principal causa de morte dos leitões (HOEFLING, 1989).

Isospora suis foi descrita pela primeira vez em 1934 por BIESTER & MURRAY mas somente no final da década da 1970 passou a ser reconhecida como uma das maiores causas de diarreia em leitões lactentes (LINDSAY, 1989).

Atualmente Isospora suis vem sendo considerada como importante enteroparasita para leitões de 5 a 21 dias de idade, causando severos danos à suinocultura industrial (MUNDT & HABERKORN, 1990). O sinal clínico mais característico é a diarreia pastosa amarelo-acinzentada, a qual não responde a tratamento com antibióticos. As fezes, inicialmente pastosas, tornam-se líquidas em um a dois dias mas não há presença de sangue. A morbidade é alta e a mortalidade é baixa a moderada (LINDSAY, 1989). A diarreia é decorrente da má absorção cau-

sada pela atrofia das vilosidades. Em doses infectantes pequenas ocorre a recuperação total das vilosidades intestinais e o quadro diarréico fica limitado a 5-6 dias (ROBINSON et alii, 1983). Em infecções mais severas a diarréia pode levar à desidratação e perda de peso. Os leitões severamente acometidos, quando não morrem, tornam-se refugos, e é frequente a infecção simultânea com outros agentes.

O tratamento dos leitões com drogas coccidiostáticas como amprólio, sulfas, nitrofuranos e monensina não tem tido sucesso (GIRARD, & MORIN, 1987; DORE & MORIN, 1987). A administração de amprólio, na ração da porca, três semanas antes e após o parto era recomendado visando diminuir a eliminação de oocistos (RUZICKA & ANDREWS, 1983; LIMA et alii, 1983; BARCELLOS et alii, 1984). Porém a eliminação de oocistos pela porca é baixa, quase nula (LINDSAY et alii, 1984). Atualmente o controle da isosporose dos leitões tem sido feita através de medidas preventivas. A limpeza e a desinfecção são recomendadas para reduzir o contato dos leitões com os oocistos (ERNEST et alii, 1985; SANFORD, 1983; TUBBS, 1986; LINDSAY, 1989).

Nos Estados Unidos, BERGELAND (1980) (apud BOROWSKY, 1986) demonstrou que 23,0% das diarréias de suínos eram causadas por L. suis. No Canadá, MORIN et alii (1980) (apud BOROWSKY, 1986) registraram 12,0% dos casos de diarréias em leitões causados pela L. suis. No Brasil foram registrados casos de isosporose em Minas Gerais (LIMA et alii, 1983), Rio

Grande do Sul (BARCELLOS et alii, 1984) e Santa Catarina (LIGNON, 1984, apud BOROWSKY, 1986). No Estado de São Paulo, até o momento, não tem sido realizados trabalhos sobre isosporose em leitões.

Os objetivos desse trabalho foram de verificar a prevalência de Isospora suis e os aspectos epidemiológicos da isosporose suína no Estado de São Paulo, notadamente nas regiões de Campinas e Sorocaba, onde a suinocultura industrial é expressiva. Foram estudadas granjas com e sem histórico de diarreia, envolvendo leitões de 10 a 50 dias de idade, lactentes e desmamados. A presença de oocistos foi relacionada com o tipo de instalação e manejo da maternidade e da creche. A confirmação da espécie foi realizada através de inoculação experimental de oocistos em leitões livres de infecção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Importância e prevalência da isosporose dos leitões

Coccidiose suína é uma doença entérica causada por Isospora suis que a partir da década de 70 vem sendo considerada de importância clínica e econômica (STUART & LINDSAY, 1986).

BIESTER & MURRAY (1934) fizeram a primeira descrição de Isospora suis e associaram a infecção com um quadro diarréico e enterite em leitões jovens.

VETTERLING (1965) descreveu 8 espécies de Eimeria, as quais ocorrem em suínos adultos e uma única espécie de Isospora, que ocorre em leitões e causa diarréia.

BERGELAND (1980) (apud BOROWSKY, 1986) demonstrou que 23,0% das diarréias de suínos lactentes diagnosticadas nos Estados Unidos através de exames laboratoriais eram causadas por I. suis.

MORIN et alii (1980) (apud BOROWSKY, 1986) registraram no Canadá 12,0% de casos de diarréia em leitões causado por I. suis num período de 4 anos.

MARTINS (1984) relatou a ocorrência de coccídios em 89,7% das propriedades da Micro-região homogênea-Mata de Ponte Nova, Minas Gerais. Esse autor identificou I. suis em 1,0% das 98 amostras de fezes positivas para coccídios (16,1%) do total de 609 colheitas.

LIMA et alii (1983) descreveram a ocorrência de I. suis em leitões com diarreia em duas granjas de Minas Gerais, onde a morbidade variou de 60,0 a 80,0% e a mortalidade de 6,0 a 20,0%.

BARCELLOS et alii (1984) descreveram um surto de isosporose em leitões no Rio Grande do Sul. Os animais de 5 a 21 dias de idade apresentaram diarreia pastosa amarelada, desidratação, perda de peso e não respondiam ao tratamento com antibióticos. A mortalidade foi menor que 10,0% e a morbidade foi de 80,0%.

KIM & KONG (1986) reportaram a taxa de prevalência de 25,0% de coccídios em 2.340 amostras de fezes de suínos de idade variada, na Coreia. I. suis foi identificada em 4,0% das amostras.

LINDSAY (1990) relatou que a doença era frequente em animais confinados e responsável por 15,0 a 20,0% dos casos de diarreia em leitões diagnosticados nos laboratórios americanos e canadenses.

CHANDRA & GHOSH (1990) identificaram I. suis em 0,8% das 387 amostras de fezes de suínos colhidas na Índia, em leitões de todas as idades, inclusive adultos.

LIMA (1989) proferiu uma palestra no Brasil cujo tema "Isosporose: uma doença emergente" causou preocupação aos criadores e profissionais da área devido a importância da doença.

2.2 - Características morfológicas e ciclo biológico de I. suis

LINDSAY et alii (1982) observaram que oocistos de I. suis esporulavam em 12 horas a 37°C ou 16 horas a 30°C.

HARLEMAN & MEYER (1984/1985) demonstraram que I. suis possuía três fases assexuadas e uma sexuada, e dois períodos separados de patência. Encontraram períodos pré-patente de 5 dias e patente bifásico de 5 a 8 ou 9 dias e 11 a 14 dias após a inoculação. Relataram que podem ocorrer variações nos períodos pré-patente e patente devido a diferentes isolados de I. suis, dosagens, idade e susceptibilidades dos animais infectados.

ERNEST et alii (1986) observaram, em cultura, que a percentagem de oocistos de I. suis esporulados não aumentou após 48 horas, em cultura.

LINDSAY et alii (1983) e LINDSAY (1990) mostraram que os estágios endógenos de I. suis eram compostos por duas fases assexuadas e uma sexuada. Demonstraram também que os esporo-

zoítos, após penetrarem nos enterócitos, não se transformavam em trofozoítos, mantendo sua forma alongada. Os merontes binucleados (Tipo 1) e merontes multinucleados (Tipo 2) eram formados através de endodiogenia e associados à fase diarréica. Os microgamontes eram multinucleados e produziam microgametas biflagelados. Os macrogamontes possuíam menos "corpúsculos eosinofílicos formadores da parede" do que nas espécies de Eimeria e a parede do oocisto era, em geral, inconspícua.

BALL & PIRRILO (1990) relataram que é necessário para descrição de novas espécies o conhecimento a respeito do ciclo biológico, hospedeiro, sítio de ação, estágios endógenos e técnicas moleculares, além da morfologia do oocisto, para a descrição de novas espécies.

LINDSAY (1990) relatou que oocistos de I. suis caracterizavam-se por apresentarem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Oocistos não esporulados poderiam apresentar corpos de "hazy" entre o esporonte e a parede do oocisto.

2.3 - Patogenia e Patologia da isosporose suína

EUTIS & NELSON (1981) observaram, em leitões naturalmente infectados por I. suis, severa atrofia das vilosidades, com perda parcial da vilosidade intestinal, hiperplasia das criptas e, em casos mais avançados, acúmulo de fibrina no lúmen

intestinal e enterite necrótica. Relataram que o grau de lesões observado foi dependente do número de coccídias num determinado sítio, da extensão da região afetada e da capacidade de regeneração do epitélio intestinal. Relataram também que a regeneração do epitélio intestinal era mais lenta em leitões mais jovens .

JOYNER et alii (1981) relacionaram um surto de coccidiose com o hábito coprofágico dos leitões.

STUART et alii (1982) relataram que os sinais clínicos e as lesões que ocorrem em leitões infectados por *I. suis* dependem da dose e da idade dos animais.

ROBINSON et alii (1983) descreveram em leitões inoculados experimentalmente com *I. suis*, uma diarréia pastosa amarelada, que se tornava fluída em 1 ou 2 dias. Observaram lesões multifocais de atrofia de vilosidade e eventuais ulcerações , principalmente no jejuno e íleo.

ERNEST et alii (1985) relataram que a eliminação de oocistos de *I. suis* aumentava nos leitões quando a limpeza e a desinfecção das instalações eram descuidadas, apesar de usarem coccidiostático na ração das porcas.

HARLEMAN & MEYER (1985) relataram que o período mais patogênico da isosporose ocorreu entre 4 e 5 dias após a inoculação. Nesta fase os animais eram negativos ou eliminavam baixo número de oocistos nas fezes. Neste caso o diagnóstico de

veria ser feito através de impressão da mucosa ou exame histopatológico.

STUART & LINDSAY (1986) relataram que na isosporose dos leitões a morbidade foi alta e a mortalidade baixa, ocorrendo diarreia, desidratação e perda de peso. Os animais não respondiam ao tratamento com antibióticos.

TUBBS (1987) observou que a melhor maneira de prevenir e controlar a isosporose era através de medidas sanitárias e redução do contato dos leitões com as fezes. Mostrou que os oocistos eram resistentes à maioria dos desinfetantes comerciais, e que apenas a solução de amônia a 50,0% era eficaz.

LINDSAY (1989) relatou que a fonte de infecção de I. suis para leitões lactentes era ainda desconhecida, mas que a doença era facilmente diagnosticada e as perdas econômicas poderiam ser evitadas se as medidas sanitárias fossem adotadas corretamente.

2.4 - Diagnóstico diferencial de isosporose suína com outras diarreias de suínos

HOEFLING (1989) relatou que Escherichia coli era agente etiológico primário de 26,0% das diarreias de leitões submetidos a diagnóstico, gastroenterite hemorrágica causava diarreia em 26,0% dos casos, enterite clostridial em 18,0%, I. suis em 14,0% e rotavírus em 8,0%.

HILL (1989) descreveu o diagnóstico diferencial entre a isosporose e as outras causas de diarreia comuns entre leitões jovens. A colibacilose causava diarreia amarelada e fluída em animais de 1 dia até o desmame, alta mortalidade e os animais respondiam ao tratamento com antibióticos. A gastroenterite hemorrágica acometia animais de todas as idades, causava diarreia aquosa, vômito e alta mortalidade. A enterite clostridial acometia leitões de 4 a 21 dias de idade e causava diarreia pastosa escura com alguns episódios de sangue. A rotavirose acometia leitões de 1 dia de idade até a fase de desmame e causava diarreia aquosa, com baixa mortalidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e colheita de amostras

Foram colhidas amostras de fezes de leitões em 20 municípios da Região Leste do Estado de São Paulo. Em municípios com maior número de criações foram colhidas amostras de mais de uma propriedade. As 33 granjas de suínos escolhidas eram de bom nível técnico e sanitário. Os critérios utilizados para escolha dos municípios e granjas estudadas foram baseados na disponibilidade dos criadores para participar deste estudo e na possibilidade de acesso às propriedades utilizando-se os meios de transporte disponíveis. Todas as granjas eram de ciclo completo, isto é, possuíam reprodução e engorda de leitões. Os animais pertenciam às raças Landrace, Large White ou Duroc e a reposição dos reprodutores era periódica. Nessas propriedades haviam, em média, 200 matrizes e os animais eram totalmente confinados. O controle zootécnico e sanitário era feito através de assistência veterinária.

Os proprietários ou os veterinários foram questionados quanto ao histórico de diarreia compatível com isosporose dos leitões. Foi considerada granja com histórico quando a diarreia acometia leitões de 5 a 21 dias de idade, o tratamen-

to com antibióticos não tinha sucesso, e a morbidade era alta apesar da baixa mortalidade.

No dia da colheita das amostras, foram observados a consistência das fezes e o tipo de instalação e manejo. A consistência das fezes foi considerada normal ou diarréica. Foram colhidas fezes normais e diarréicas em granjas com e sem histórico.

O tipo de manejo foi considerado "limpo" ou "sujo", o tipo de instalação "suspensa" ou "no chão". As instalações de uma granja de suínos são compostas basicamente de galpão de maternidade (porcas em lactação e seus leitões até aproximadamente 35 dias de idade), galpão de creche (leitões desmamados até completarem 70 dias de idade), galpão de gestação e de engorda. A maternidade e a creche são formadas por baias que podem ser no chão ou suspensas. As baias suspensas tem o piso ripado que permite o escoamento de urina e fezes. Com a baia no chão os dejetos são retirados manualmente. O tipo de manejo é considerado "limpo" quando os animais tem pouco ou nenhum contato com as fezes e "sujo", quando esse contato é grande. Geralmente, baias suspensas são consideradas "limpas" e baias no chão podem ser "limpas" ou "sujas" de acordo com os cuidados do criador.

As amostras foram obtidas durante o período de janeiro à novembro de 1991. Foi realizada uma única colheita de 6 amos-

tras de fezes de cada propriedade, sendo duas de leitões entre 10 e 19 dias de idade, duas entre 20 e 29 dias e duas entre 30 e 50 dias de idade. O critério utilizado para determinação do tamanho da amostra foi baseado na quantidade de material fecal disponível por faixa etária em uma única visita à criação. Cada amostra foi colocada em frasco com cerca de 120 ml de solução de dicromato de potássio a 2,0% perfazendo um total de 135 ml de volume. As amostras foram mantidas nessa solução, em temperatura ambiente, até a esporulação dos oocistos.

3.2. Identificação dos oocistos

Foram utilizados dois métodos de concentração de exame de fezes: Método de Sedimentação Espontânea, também conhecido como Método de Hoffman, Pons & Janner ou de Lutz modificado, seguido de Método de Sheather (flutuação em solução saturada de sacarose ou açúcar comercial).

No primeiro método as amostras de fezes eram filtradas em telas de metal com 50 malhas/cm² e homogeneizadas com água destilada, em frascos de sedimentação. Após 60 minutos o sobrenadante era retirado com auxílio de pipeta Pasteur à vácuo e desprezado. Para execução do segundo método, alíquotas de

aproximadamente 1,0 ml de cada sedimento eram colocadas em 2 tubos de ensaio (100 mm de comprimento por 13 mm de diametro), homogeneizando o sedimento com solução saturada de açúcar e adicionando a solução até a formação do menisco na borda superior do tubo. Após 30 minutos, cada tubo era examinado para presença de oocistos, colocando-se uma laminula em contato com a superfície superior da solução e depositando-a numa lâmina para observação em microscópio óptico, com aumento de 100 e 400 vezes.

A identificação dos oocistos foi baseada na sua estrutura. Oocistos recém eliminados possuem uma estrutura chamada "hazy bodies" entre o esporonte e a parede do oocisto que é característico de I. suis. Oocistos nas fezes após várias horas da eliminação podem conter 2 esporoblastos que confirmam a infecção do animal por I. suis, e após a cultura os oocistos esporulados apresentam 2 esporocistos com 4 esporozoitos cada (LINDSAY, 1982).

3.3. Estudo dos oocistos de parede delgada

Em 7 amostras examinadas foram encontrados oocistos cuja parede mostrava-se mais delgada do que as formas características de I. suis. Esses oocistos encontrados possuíam 2 esporocistos com 4 esporozoitos e eram aproximadamente do mesmo ta-

manho que os de I. suis, embora essas características também pertencessem ao gênero Sarcocystis spp. Dessas 7 amostras, apenas 4 possuíam um número suficiente de oocistos para uso em inoculação experimental .

3.3.1. Inoculação experimental

Foram utilizados 4 leitões livres de infecção para inoculação experimental das quatro amostras de oocistos de parede delgada. A utilização de um animal controle foi dispensada pois o objetivo do experimento era apenas a confirmação da espécie, do ciclo evolutivo e dos sinais clínicos do parasita encontrado no presente trabalho.

Os animais foram divididos em 4 testes e mantidos em gaiolas individuais cujo piso ripado permitia a colheita diária de fezes. Os animais foram alimentados diariamente com leite tipo "longa vida" "ad libitum", água filtrada e ração pré-inicial sem coccidiotático. Aos 5 dias de idade foram inoculados por via oral, sendo que o leitão 1 recebeu $6,6 \times 10^4$ oocistos esporulados, o leitão 2 recebeu menos de 10^3 oocistos esporulados e os leitões 3 e 4 receberam $4,0 \times 10^4$ oocistos esporulados cada. Todas as amostras continham oocistos de parede delgada e espessa. O leitão 1 recebeu oocistos da amostra diarréica SL168, que era de leitões com 17 dias de idade.

O leitão 2 recebeu oocistos da amostra diarréica SL102 que era de leitões com 14 dias de idade . Os leitões 3 e 4 receberam oocistos das amostras SL49 e SL83, respectivamente, cujos animais tinham 10 dias de idade e apresentavam diarréia.

O experimento teve a duração de 21 dias e os animais foram observados quanto ao apetite, estado geral, nível de desidratação, cor e consistência das fezes. As fezes foram consideradas normais, semi-pastosas, pastosas ou líquidas. Foram feitas colheitas diárias de fezes para contagem de oocistos pelo método de flutuação em solução saturada de cloreto de sódio em câmara de MacMaster.

Aos 21 dias após a inoculação os leitões foram necropsiados. Uma porção do terço final do jejuno foi fixado em fixador Bouin, incluído em parafina, cortado a 5 μ m e corado pela Hematoxilina- Eosina para exame histopatológico.

3.3.2. Preparação do inóculo

As 7 amostras de campo analisadas que apresentavam oocistos de parede delgada foram cultivadas e isoladas segundo métodos descritos por LONG et alii, 1976. Seguindo esses métodos, as amostras de fezes foram mantidas em solução de dicromato de potássio a 2,0% na temperatura ambiente durante 7 dias para esporulação de eventuais oocistos não esporulados. Após esse período foi feito o isolamento dos oocistos da cultura

através de sucessivas lavagens com água destilada e centrifugação a 1600 g por 5 minutos até obtenção de um sobrenadante límpido. Ao sedimento foi adicionado a solução de hipoclorito de sódio a 10,0%. Após 5 minutos o material foi centrifugado à 1600 g durante 5 minutos. O sedimento foi homogeneizado com solução saturada de cloreto de sódio até a metade de um tubo para centrífuga, com adição cuidadosa de água destilada. Após centrifugação a 1600 g durante 5 minutos, uma banda formada de oocistos podia ser observada entre o NaCl saturado e a água. Os oocistos foram retirados através de pipeta Pasteur, lavados com água destilada e conservados a 4 ° C até o experimento. Os oocistos foram contados em câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal e apenas as amostras que continham no mínimo 10^4 oocistos de parede delgada foram utilizadas para a inoculação experimental.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através de testes de Qui-quadrado para um nível de significância $\alpha=0,05$ (BHATTACHARYYA & JOHNSON, 1977). Foram considerados os seguintes parâmetros : histórico de diarreia, consistência das fezes, faixa etária, tipo de instalação e manejo de maternidade e de creche.

4. RESULTADOS

Oocistos de I. suis foram identificados em 18 (90%) Municípios dos 20 pesquisados . Foram escolhidas 33 granjas desses municípios das quais 27 (81,8%) demonstraram resultados positivos para I. suis. A Figura 1 e a Tabela 1 apresentam os Municípios e as propriedades de suínos positivas e negativas para I. suis . A Tabela 1 também apresenta, por município, os números de amostras colhidas, as propriedades com e sem histórico de diarreia, as amostras de fezes normais e diarréicas bem como positivas e negativas para I. suis. Foram colhidas um total de 177 amostras de fezes das quais 43 (24,3%) apresentaram oocistos de I. suis.

A Tabela 2 mostra a frequência de oocistos de I. suis em granjas com e sem histórico de diarreia. Foram colhidas 88 amostras de fezes de leitões em granjas com histórico de diarreia , das quais 27 (30,7%) apresentaram oocistos. Das 89 amostras de granjas sem histórico, 16 (18,0%) foram positivas. A análise estatística confirmou que a presença de oocistos de I. suis é significativamente superior em granjas com histórico de diarreia ($X^2 = 3,88$; $p < 0,05$ s.).

A Tabela 3 mostra a frequência de oocistos de I. suis em fezes normais e diarréicas. Foram colhidas 97 amostras de fezes normais e 80 de fezes diarréicas. Oocistos de I. suis estavam presentes em 23 (23,7%) amostras de fezes normais e em 20 (25,0%) amostras de fezes diarréicas. A análise estatística mostrou não existir relação significativa ao nível de 5%, entre presença de diarréia e oocistos ($X^2 = 0,04$, n.s.).

A Tabela 4 mostra a frequência de oocistos de I. suis, em relação a faixa etária, nas granjas com histórico de diarréia. Foram colhidas 30 amostras de fezes de leitões entre 10 e 19 dias de idade, das quais 16 (53,3%) apresentaram oocistos. Das 29 amostras de leitões colhidas entre 20 e 29 dias de idade, 6 (20,7%) foram positivas enquanto 29 amostras colhidas entre 30 e 50 dias, 5 (17,2%) apresentavam oocistos. A análise estatística revelou existir uma relação significativa, a nível de 5% entre a presença de oocistos e a faixa etária, dentro de granjas com histórico de diarréia. Essa análise mostrou que oocistos de I. suis são significativamente mais frequentes em leitões de 10 a 19 dias de idade e menos frequentes em leitões de 30 a 50 dias ($X^2 = 11,05$; $p < 0,05$ s.).

A Tabela 5 mostra a frequência de oocistos de I. suis segundo a faixa etária dos leitões , em granjas sem histórico de diarreia. Foram colhidas 28 amostras de fezes de leitões entre 10 e 19 dias de idade , 34 amostras entre 20 e 29 dias e, 27 entre 30 e 50 dias. Apresentaram oocistos 4 (14,3%) amostras de leitões entre 10 e 19 dias de idade, 6 (17,6%) entre 20 e 29 dias , e 6 (22,2%) entre 30 e 50 dias. A análise estatística mostrou não haver relação significativa entre presença de oocistos e faixa etária em granjas sem histórico de diarreia ($X^2 = 0,58$; n.s.).

A Tabela 6 mostra a frequência dos oocistos de I. suis em fezes de leitões lactentes e desmamados. Foram colhidas 128 amostras de fezes em leitões lactentes, dos quais 31 (24,2%) apresentaram oocistos nas fezes. Das 49 amostras de fezes colhidas em leitões desmamados, 12 (24,5%) foram positivas para oocistos. A análise estatística revelou não existir relação significativa a nível de 5,0% entre a presença de oocistos nas fezes e leitões lactentes ou desmamados. A presença de oocistos de I. suis entre leitões lactentes e desmamados não diferiu estatisticamente ($X^2=0$; n.s.).

A Tabela 7 mostra a relação entre a presença de oocistos de I. suis, e o tipo de instalação e manejo de maternidade, em

33 granjas de suínos do Estado de São Paulo. Das 45 amostras colhidas em maternidades do tipo "chão e sujas", 17 (37,8%) apresentaram oocistos. Das 49 amostras obtidas em maternidades do tipo "chão, limpas", 10 (20,4%) foram positivas para oocistos, ao passo que 34 amostras colhidas em baias suspensas, 4 (11,8%) apresentaram oocistos. A análise estatística mostrou que houve uma relação significativa, a nível de 5,0%, entre a presença de oocistos e o tipo de instalação e manejo das maternidades. A frequência de oocistos é maior em maternidades "sujas e no chão" e menor em maternidades "suspensas" ($X^2=7,76$; $p<0,05$).

A Tabela 8 mostra a frequência de oocistos de I. suis, segundo tipo de instalação e manejo de creche, em 33 granjas de suínos do Estado de São Paulo. Das 24 amostras colhidas em creches "sujas e no chão", 7 (29,2%) estavam eliminando oocistos. Foram colhidas 16 amostras em creches "limpas" e no "chão", das quais 2 (12,5%) foram positivas. Das 9 amostras colhidas em leitões criados em creches "suspensas", 2 (22,2%) foram positivas. A análise estatística revelou não existir relação significativa entre presença de oocisto e tipo de instalação e manejo de creche ($X^2 =3,80$; n.s.).

No presente estudo foram colhidas 177 amostras de fezes, das quais 7 continham oocistos de I. suis apresentando parede

externa mais delgada que os oocistos normais da mesma espécie (Figuras 2 e 3). Esses oocistos estavam presentes em amostras onde haviam também oocistos de parede normal de I. suis. Os oocistos de parede fina eram semelhantes aos de Sarcocystis spp. e continham dois esporozoítos cada, medindo em média 23,9 μ m de largura por 20,7 μ m de comprimento.

A inoculação experimental de oocistos de parede delgada em quatro leitões, para a comprovação de I. suis, mostrou os períodos pré-patente e patente, bem como a produção diária de oocistos que estão registrados na Figura 4. A Figura 5 apresenta a consistência das fezes durante o período do experimento.

O leitão 1 apresentou o período pré-patente de 6 dias e o período patente de 5 dias, interrompendo a eliminação de oocistos entre os dias 10 e 12 após a inoculação. As fezes inicialmente normais tornaram-se pastosa-amareladas 7 dias após a inoculação. No 8º dia após a inoculação as fezes apresentaram-se líquidas, retomando a consistência pastosa do 9º ao 14º dia. Apartir do 15º dia até o 21º dia após a inoculação as fezes apresentaram consistência normal.

O leitão 2 apresentou o período pré-patente de 9 dias e o período patente de 3 dias. A consistência das fezes foi normal durante todo o experimento, exceto no 13. dia, quando se tornou pastosa.

O leitão 3 apresentou o período pré-patente de 7 dias e o período patente de 10 dias, interrompendo a eliminação de oocistos 10 a 11 dias após a inoculação. As fezes apresentaram-se pastosa-amareladas do 9 a 12 dias após a inoculação. Antes e após esse período as fezes permaneceram normais.

O leitão Teste 4 apresentou o período pré-patente de 7 dias e o período patente de 3 dias. As fezes normais tornaram-se pastosa-amareladas no 7.º dia, e assim permaneceram até o 14.º dia, passando por um período de fezes líquidas no 8.º dia após a inoculação.

Todos os animais apresentaram os sinais clínicos da isosporose (Figuras 6 e 7). Os leitões adaptaram-se bem às condições do experimento apesar da diarréia e leve grau de desidratação. No exame de fezes dos quatro testes foram observados oocistos esporulados de paredes normal e delgada, mesmo antes de ser feita a cultura, sendo que as colheitas foram realizadas uma vez ao dia, num intervalo de 24 horas .

Na necrópsia todos os órgãos apresentaram-se sem alterações patológicas. No exame histopatológico dos intestinos não foram observadas alterações patológicas nem fases evolutivas do protozoário.

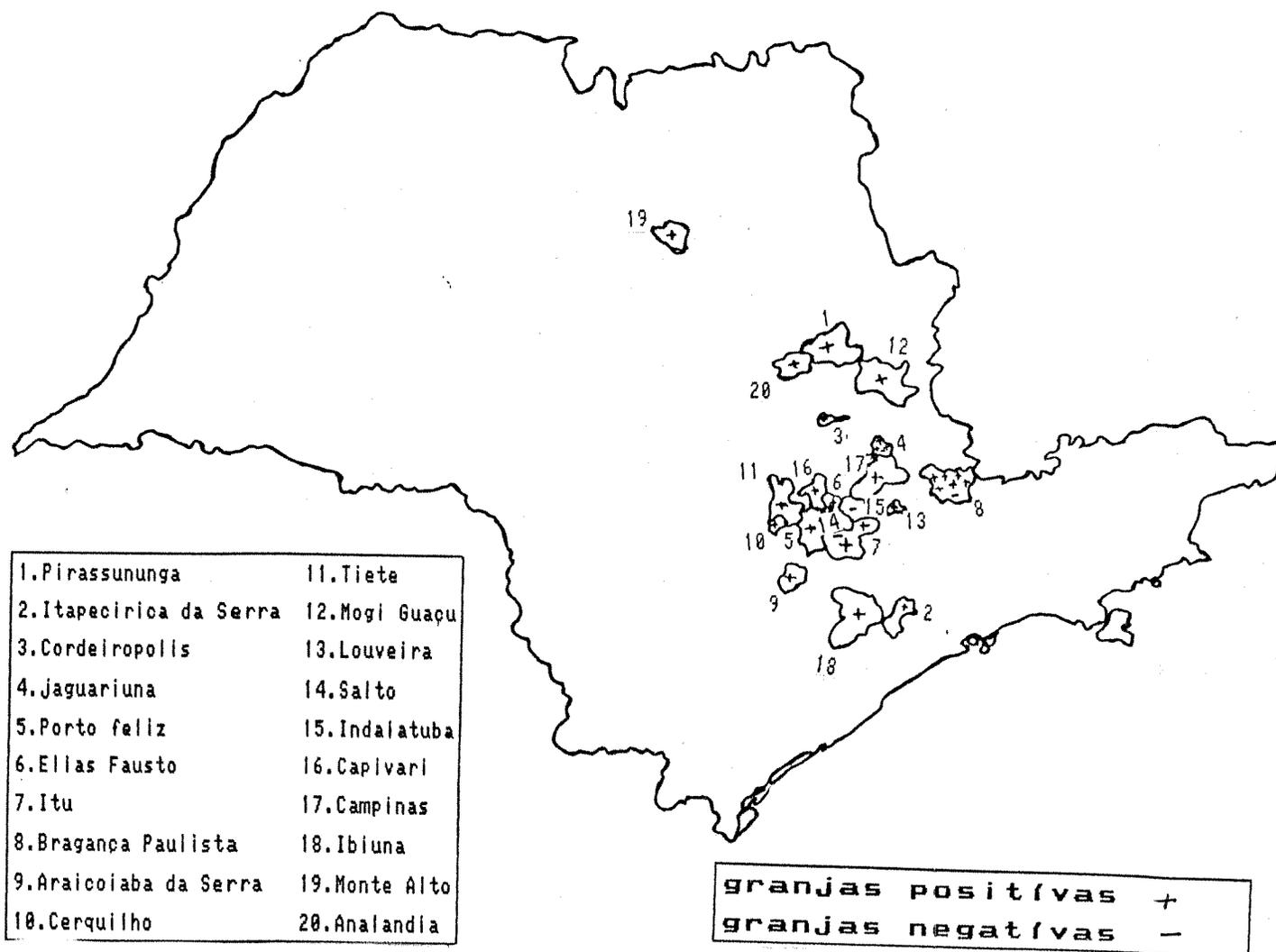


Figura 1 : Distribuição geográfica dos municípios com granjas positivas e negativas para Isospora suis, na Região Leste do Estado de São Paulo - 1991.

TABELA 1 : Presença de I. suis nas granjas de suínos da Região Leste do Estado de São Paulo - 1991.

LOCALIDADE (MUNICÍPIO)	Nº DE AMOSTRAS	HISTÓRICO DE DIARRÉIA		LEITÃO COM DIARRÉIA NO DIA DA COLHEITA		OOCISTO DE <u>I. suis</u>	
		Sim	Nao	Sim	Nao	Positivo	Negativo
Pirassununga	6	1	0	4	2	1	5
Itapeirica da Serra	6	0	1	3	3	1	5
Cordeirópolis	5	1	0	3	2	2	3
Jaguariuna	23	2	3	8	15	4	19
Porto Feliz	6	0	1	0	6	1	5
Elias Fausto	12	1	1	4	8	6	6
Itu	17	3	0	13	4	4	13
Bragança Paulista	34	3	4	25	9	8	26
Aracoiaba da Serra	6	1	0	2	4	4	2
Cerquillo	3	0	1	0	3	1	2
Tiete	6	0	1	2	4	0	6
Mogi Guapu	6	1	0	3	3	1	5
Louveira	6	0	1	2	4	2	4
Salto	6	0	1	1	5	1	5
Indaiatuba	6	1	0	3	3	0	6
Capivari	6	1	0	2	4	2	4
Campinas	6	0	1	1	5	1	5
Ibiuna	6	0	1	0	6	2	4
Monte Alto	5	1	0	1	4	1	4
Analândia	6	1	0	3	3	1	5
TOTAL	177	17	16	80	97	43	134
%	100	51,5	48,5	45,2	54,8	24,3	75,7

TABELA 2 : Frequência de oocistos de I. suis em amostras de fezes colhidas em 33 granjas de suínos com e sem histórico de diarréia, no Estado de São Paulo-1991.

HISTÓRICO DE DIARRÉIA	OOCISTOS DE <u>I. suis</u>				TOTAL
	Presente	%	Ausente	%	
Sim	27	30,7	61	69,3	88
Não	16	18,0	73	82,0	89
TOTAL	43		134		177

$(X^2_1 = 3,88; p < 0,05)$

TABELA 3 : Frequência de oocistos de I. suis em amostras de fezes normais e diarréicas colhidas em 33 granjas de suínos do Estado de São Paulo -1991.

FEZES	OOCISTOS DE <u>I. suis</u>				TOTAL
	Presente	%	Ausente	%	
Normais	23	23,7	74	76,3	97
Diarréicas	20	25,0	60	75,0	80
TOTAL	43		134		177

($\chi^2 = 0,04$; n.s.)

TABELA 4 : Frequência de oocistos de I. suis , segundo a faixa etária, em amostras de fezes de suínos de 17 granjas com histórico de diarréia , no Estado de São Paulo - 1991.

FAIXA ETÁRIA (dias)	OOCISTOS DE <u>I. suis</u>				TOTAL
	Presente	%	Ausente	%	
10 - 19	16	53,3	14	46,7	30
20 - 29	6	20,7	23	79,3	29
30 - 50	5	17,2	24	82,8	29
TOTAL	27		61		88

$$(X^2_2 = 11,0; P < 0,05)$$

TABELA 5 : Frequência de oocistos de I. suis , segundo a faixa etária, em amostras de fezes de suínos de 16 granjas, sem histórico de diarréia , no Estado de São Paulo - 1991.

FAIXA ETÁRIA (dias)	OOCISTOS DE <u>I. suis</u>				TOTAL
	Presente	%	Ausente	%	
10 - 19	4	14,3	24	85,7	28
20 - 29	6	17,6	28	82,3	34
30 - 50	6	22,2	21	77,7	27
TOTAL	16		73		89

($\chi^2 = 0,58$; n.s.)

ABELA 6 : Frequência de oocistos de I. suis , em amostras de fezes de leitões lactentes e desmamados, oriundos de 33 granjas do Estado de São Paulo - 1991.

FASE DA VIDA DO LEITÃO	OOCISTOS DE <u>I. suis</u>				TOTAL
	Presente	%	Ausente	%	
Lactentes	31	24,2	97	75,8	128
Desmamados	12	24,5	37	75,5	49
TOTAL	43		134		177

$(X^2_1 = 0,00; \text{ n. s.})$

TABELA 7 : Frequência de oocistos de I. suis , se-
gundo tipo de instalação e manejo de ma-
ternidade, em 33 granjas de suínos do
Estado de São Paulo - 1991.

TIPO DE INSTALAÇÃO E MANEJO DA MATERNIDADE	OOCISTOS DE <u>I. suis</u>				TOTAL
	Presente	%	Ausente	%	
Chão, Sujo	17	37,8	28	62,3	45
Chão, Limpo	10	20,4	39	79,6	49
Suspensa	4	11,8	30	88,2	34
TOTAL	31		97		128

$$(X^2_z = 7,76; P < 0,05)$$

TABELA 8 : Frequência de oocistos de I. suis , segundo tipo de instalação e manejo de creche em 33 granjas de suínos do Estado de São Paulo - 1991.

TIPO DE INSTALAÇÃO E MANEJO DE CRECHE	OOCISTOS DE <u>I. suis</u>				TOTAL
	Presente	%	Ausente	%	
Chão, Sujo	7	29,2	17	70,8	24
Chão, Limpo	2	12,5	14	87,5	16
Suspensa	2	22,2	7	77,8	9
TOTAL	11		38		49

($\chi^2 = 3,80$; n.s.)

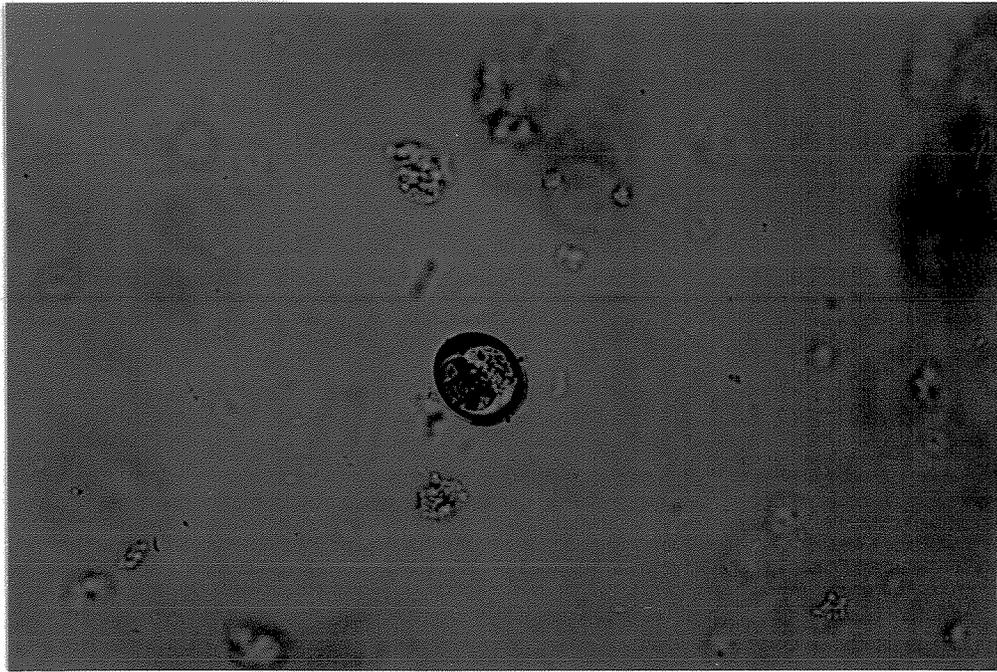


Figura 2 : Oocisto de Isospora suis
com a membrana externa de espessura
normal. (AUMENTO: 400X)



Figura 3 : Oocisto de Isospora suis
com a membrana externa mais delgada
que a normal. (AUMENTO : 400X)



Figuras 6 e 7 : Sinais clínicos da isosporose em leitão, 12 dias após a inoculação com oocistos de parede fina: perda de peso, desidratação e diarréia pastosa-amarelada.

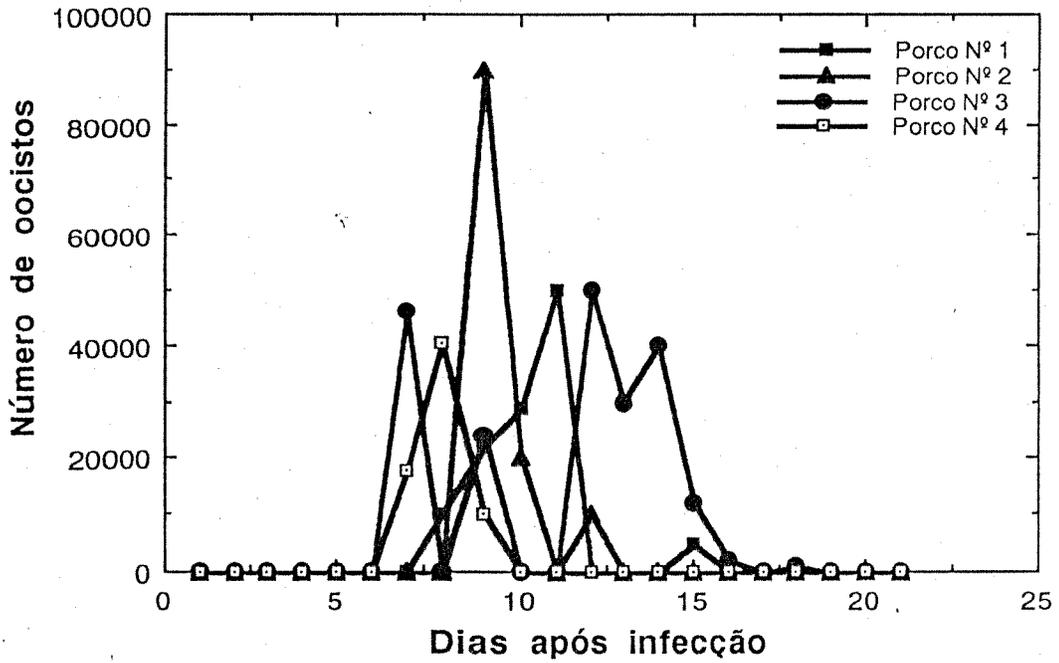


Figura 4 : Eliminação de oocistos de Isospora suis em 4 leitões inoculados experimentalmente, durante o período de 21 dias.

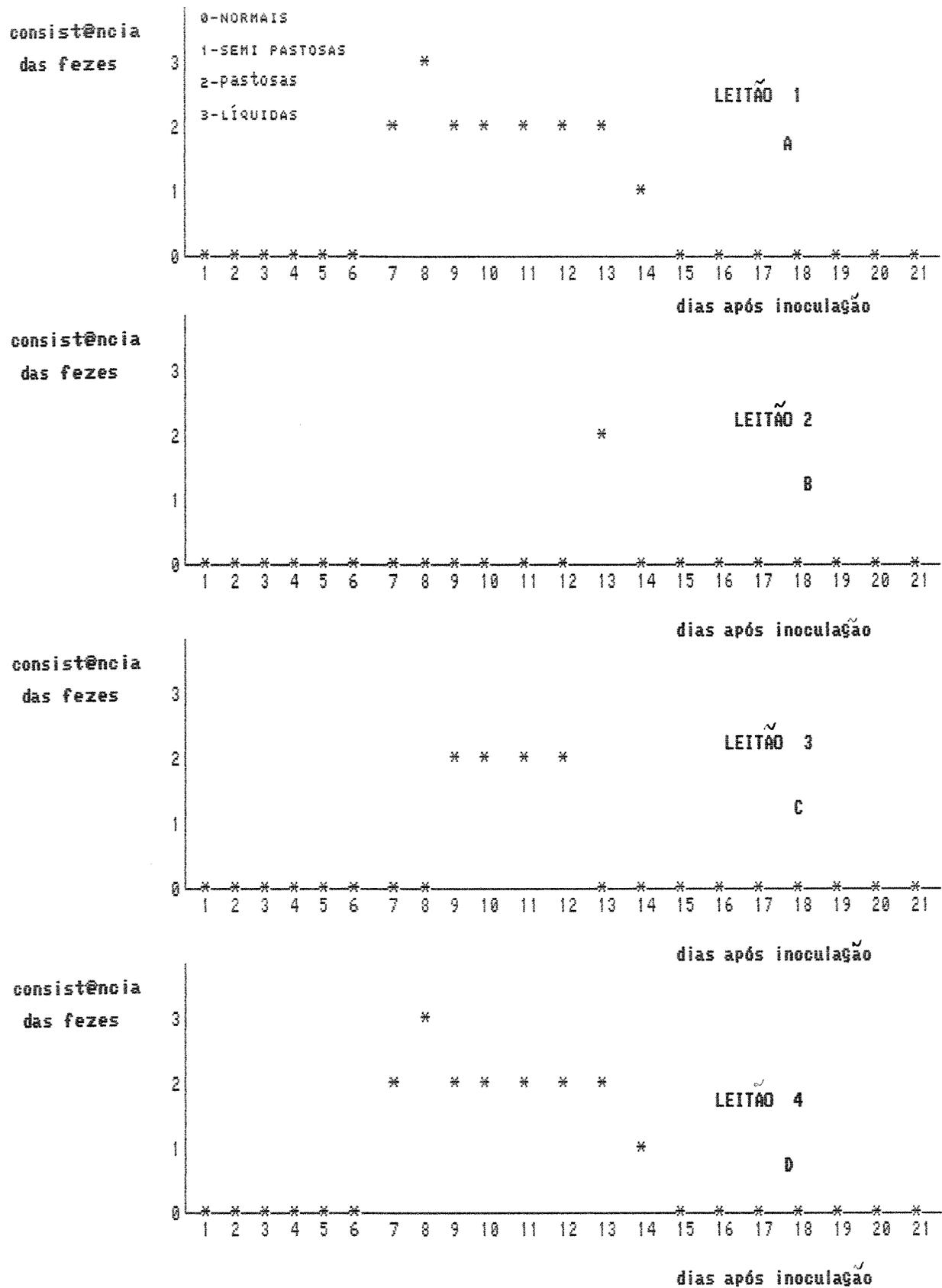


Figura 5 (A-D): Consistência das fezes dos 4 leitões inoculados experimentalmente com oocistos de I. suis de parede delgada.

5. DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que o encontro de Isospora suis é bastante frequente no Leste do Estado de São Paulo, pois 81,8% das propriedades e 90,0% dos Municípios pesquisados apresentaram resultados positivos para esse parasito (Figura 1). A literatura sobre a taxa de prevalência de I. suis abrangendo Municípios ou propriedades é escassa. MARTINS & LIMA (1982) relataram a ocorrência de coccídios (incluindo Eimeria spp.) em 89,7% das propriedades da Micro-região homogênea da Mata, Ponte Nova, Minas Gerais. Esses autores identificaram I. suis em apenas 1,0% das 98 amostras positivas para coccídios (16,1%), do total de 609 colheitas de fezes. KIM & KONG (1986) reportaram a prevalência de 25,0% de coccídios em 2.340 suínos na Coréia sendo 4,0% de I. suis . CHANDRA & GHOSH (1990) obtiveram coccídios em 31,0% das 387 amostras de fezes estudadas na Índia , sendo 0,8% de I. suis. CHHABRA & MAFUKIDZE não encontraram I. suis nas 41 amostras positivas (25,3%) para coccídios , num estudo com 162 leitões no Zimbábue. A presença de I. suis em 24,3% das amostras de fezes, obtidas no presente estudo, foi muito superior ao dos autores acima citados. Os fatores que provavelmente devem ter

contribuído para esse índice foram : idade dos leitões amostrados, quantidade de fezes colhidas por animal e por propriedade e métodos de concentração dos oocistos utilizados para a sua identificação (métodos de sedimentação espontânea e posteriormente o de Sheather). KIM & KONG (1986) utilizaram fezes de leitões de todas as idades , inclusive de porcas, sendo que nestas a presença de I. suis é sabidamente rara. CHANDRA & GHOSH (1990) colheram fezes através de "swab" retal e identificaram os oocistos utilizando apenas os métodos direto ou de sedimentação. CHHABRA & MAFUKIDZE (1992) não conseguiram identificar oocistos de I. suis em nenhuma amostra, porém colheram fezes de animais com até 6 meses de idade usando o método de MacMaster . MARTINS & LIMA (1982) utilizaram apenas o método de Sheather para a identificação dos oocistos sem prévia concentração. É possível que a prevalência de I. suis em São Paulo não seja superior a de outras regiões mas a metodologia usada neste trabalho, provavelmente tenha sido mais sensível e específica para a detecção de oocistos.

Além da taxa de prevalência de I. suis nas granjas ter sido alta, em 51,5 % destas havia histórico de diarreia. Neste trabalho foi observado que a presença de oocistos foi significativamente maior em granjas com histórico de diarreia (Tabela 2) . Esses dados mostram que essa doença afeta mais da metade das suinoculturas industriais do Estado de São Paulo.

Este quadro reflete e confirma o que LIMA (1989) proferiu em palestra sobre I. suis : "uma doença emergencial".

Embora a principal característica da isosporose seja a diarreia , a presença de oocistos não apresentou relação significativa com a consistência das fezes (Tabela 3) . Isso significa que tanto em animais com fezes diarreicas , quanto em animais com fezes normais , ocorreu a eliminação de oocistos. Uma possível explicação para esse fato talvez seja devido ao ciclo bifásio da I. suis , onde ocorre a interrupção da produção de oocistos durante um período, sem alteração do quadro diarreico. Neste caso, os animais poderiam apresentar diarreia mas não eliminar oocistos , sendo que somente através de raspados de mucosa ou exame histopatológico seria possível a identificação de I. suis (STEVENSON & ANDREWS, 1982) . Outra possibilidade seria a eliminação de oocistos , durante alguns dias, por animais que tenham se recuperado da fase diarreica. Uma terceira explicação poderia ser atribuída aos animais com baixa infecção, os quais sofreriam apenas leves lesões intestinais e eliminação de número reduzido de oocistos, sem a presença do quadro diarreico. Por outro lado, existem outros agentes infecciosos que poderiam causar diarreia em leitões , os quais não foram investigados no presente trabalho. Atualmente, são consideradas cinco as maiores causas de diarreia em leitões lactentes e desmamados : colibacilose, gastroenterite

transmissível, enterite clostridial, rotavirose e isosporose (HOEFLING, 1989; HILL, 1989). A colibacilose é causada pela bactéria Escherichia coli e ocorre em leitões de 1 dia de idade até o desmame. Caracteriza-se por apresentar diarréia pastosa-amarelada que torna-se aquosa e causa alta mortalidade se não for tratada com antibiótico. A gastroenterite transmissível é causada por coronavírus e ocorre não só em leitões como também em animais adultos e, caracteriza-se pelo quadro de diarréia aquosa e vômito, morbidade e mortalidade altas. A enterite clostridial é causada pela bactéria Clostridium perfringis e acomete leitões de 1 a 14 dias de idade que apresentam diarréia achocolatada e às vezes com sangue. O rotavírus causa uma diarréia aquosa em leitões de um dia de idade até o desmame, sendo mais comum no desmame. Apresenta alta morbidade e baixa mortalidade e, como na gastroenterite transmissível e na clostridiose, não há regressão dos sintomas quando tratada com antibiótico.

No presente estudo foram consideradas granjas com histórico de diarréia aquelas que possuíam quadro clínico compatível com isosporose. No entanto, a colheita de fezes diarreicas foi realizada em granjas com e sem histórico de diarréia e os resultados obtidos revelaram que o histórico de diarréia da granja foi necessário para o diagnóstico da isosporose suína.

Outro fator não esperado foi a diferença entre a faixa etária dos leitões acometidos em granjas com e sem histórico de diarreia (Tabela 4 e 5) . Em granjas com histórico de diarreia a presença de I. suis foi significativamente superior em leitões com idade entre 10 e 19 dias do que nas outras idades. Esse dado está de acordo com TUBBS (1986), STUART & LINDSAY (1986) e LINDSAY (1990) . Porém, em granjas sem histórico de diarreia, os oocistos de I. suis foram identificados igualmente em leitões entre 10 e 50 dias de idade. É possível que nestas granjas ocorram infecções leves, onde os animais não desenvolvam o quadro diarreico e eliminem menos oocistos, mas não adquirem imunidade adequada, tornando-se susceptíveis por mais tempo . Esses dados demonstraram que o maior número de amostras positivas para oocistos estava relacionada com o histórico de diarreia e com os leitões lactentes. Trata-se de um sério problema para a suinocultura paulista que possui 53,3% dos leitões lactentes em granjas com histórico de diarreia e positivos para I. suis. Uma vez que a fase de lactação é a mais crítica dentro de uma granja ((HOEFLING,1990), os criadores e veterinários devem ser informados o quanto antes sobre as medidas de controle da isosporose. Este trabalho mostrou que em granjas com menor presença de oocistos não ocorreu histórico de diarreia e os leitões lactentes não eram os mais afetados.

Um dos fatores que podem estar relacionados com a presença de oocistos é o tipo de instalação e manejo adotado numa granja. Foi observado que a presença de oocistos de I. suis foi significativamente maior em granjas cujas maternidades eram compostas por baias "no chão e sujas" (Tabela 6 e 7). Nestas granjas o acesso dos leitões às fezes da mãe e dos próprios irmãos foi facilitado, intensificando a infecção e a maior eliminação de oocistos. Por outro lado, em maternidades "suspensas" praticamente não houve contato dos leitões com as fezes, o que poderia justificar o menor encontro de oocistos. Maternidades no "chão", mas "limpas" apresentaram frequência de oocistos intermediária entre "chão e sujas" e "suspensas". Foi verificado que a melhor maneira de manter baixo o nível de oocistos dentro de uma maternidade é através da utilização de baias suspensas. Porém, em criações com poucos recursos, um bom manejo de limpeza e desinfecção poderão auxiliar no controle da isosporose. Nas maternidades "limpas" a retirada das fezes das porcas e dos leitões eram realizadas duas a três vezes ao dia, e as baias eram raspadas e varridas periodicamente, sendo mantidas sempre secas com uso de cal em pó.

A isosporose é reconhecida como uma doença que afeta leitões em lactação, porém o presente trabalho mostrou que a presença de oocistos não diferiu significativamente entre fezes de leitões lactentes e desmamados (Tabela 6). Por outro

lado, a presença de oocistos nas fezes dos leitões desmamados não apresentou relação significativa com o tipo de instalação e de manejo da creche (Tabela 8) . Essas observações são inteiramente originais e não constam da literatura, abrindo espaço para novos questionamentos. Os investigadores tem questionado sobre as possíveis fontes de infecção e dos mecanismos de imunidade da I. suis, principalmente em relação a sua infecção na fase de desmame dos leitões . RUZICKA & ANDREWS (1983) e TUBBS (1987) consideraram a porca como a principal fonte de infecção de oocistos, porém, LINDSAY et alii (1984) relataram que a prevalência de I. suis era baixa, quase rara em fezes de porcas oriundas de granjas com e sem isosporose neonatal . O autor considerou a possibilidade desse baixo número de oocistos ser suficiente para infectar os leitões e desta forma promover a sua multiplicação. Desta maneira, os próprios leitões consistiriam na principal fonte de infecção e o quadro clínico seria agravado dependendo das condições sanitárias. Em estudos imunológicos, STUART et alii (1982) demonstraram que leitões previamente infectados com I. suis eliminaram pequeno ou não detectável número de oocistos após uma reinoculação. Os autores sugeriram que I. suis seria altamente imunogênica. Ao estudar um surto de diarreia em leitões desmamados, NILSON (1988) obteve oocistos de I. suis em 48,0% das fezes diarreicas e em 12,0% das fezes normais. O autor postulou que o estresse do desmame poderia provocar uma queda da imunidade,

tornando possível a reativação do ciclo do parasita. SCAINI et alii (1991) relataram a presença de I.suis em 2,5% dos leitões com diarreia, desmamados recentemente . Os autores atribuíram a baixa percentagem ao fato dos animais serem provenientes de granjas limpas e de bom nível sanitário.

Os dados do presente trabalho mostraram que a eliminação de oocistos ocorreu igualmente em leitões lactentes e desmamados e não apresentou relação com o tipo de instalação e manejo da creche, ao contrário do que verificaram alguns autores acima citados. Isso significa que tanto em creches sujas , onde o contato com as fezes era intenso, quanto em creches suspensas, onde o contato com as fezes era mínimo, a eliminação de oocistos foi semelhante. É possível que alguns animais não se infectem na maternidade e por esse motivo continuariam susceptíveis à infecção na creche. Por outro lado, poderiam estar sendo transferidos para a creche alguns leitões infectados que ainda estivessem eliminando oocistos. Deste modo, haveriam alguns animais recém infectados e outros com infecção antiga na creche. Outra possibilidade seria o transporte de oocistos através do homem, água e das moscas , que poderiam atuar como veiculadores, contaminando as baias, uma vez que estas últimas estavam presentes em larga escala em praticamente todas as criações. Os mecanismos de imunidade da isosporose, os sintomas, as medidas de controle e as perdas econômicas causadas pela isosporose no desmame devem ser melhor esclarecidos.

No estudo dos oocistos de I. suis de parede delgada os leitões inoculados experimentalmente apresentaram o período pré-patente variando entre 6 e 9 dias e o período patente entre 3 e 10 dias após a inoculação. Os leitões eliminaram de 10^4 a 9×10^5 oocistos por dia, com interrupção na produção de oocistos 10 e 11 dias após a inoculação apresentando, portanto, ciclo bifásico. A grande variação no número de oocistos eliminados justifica-se pela diferença do número de oocistos inoculados por leitão. As variações nos períodos pré-patente e patente, bem como os sinais clínicos também foram observados por ROBINSON et alii (1983) ; HARLEMAN & MAYER (1985); MARQUES (1989); SOUZA et alii (1989) . Não houve mortalidade nos quatro leitões mas a morbidade foi de 100%. Entre 7 e 13 dias após a inoculação, todos os leitões apresentaram diarreia de consistência pastosa-amarelada e em alguns animais, líquida. Os leitões apresentaram de 1 (um) a 8 (oito) episódios de diarreia , acompanhado de leve desidratação. O apetite, o estado geral e o comportamento dos animais não foram alterados. Na necrópsia e no exame histopatológico realizados 21 dias após a inoculação , o intestino apresentou-se totalmente recuperado, e não foram encontradas fases evolutivas do protozoário. Esse experimento confirmou que o oocisto de parede delgada pertence a I. suis de acordo com LINDSAY et alii (1983), HARLEMAN & MEYER (1985), STUART & LINDSAY (1986), TUBBS (1986), LINDSAY (1989) .

O tamanho médio dos oocistos de parede fina ($23,9\mu\text{m}$ de largura por $20,7\mu\text{m}$ de comprimento) está de acordo com as medidas de oocistos de I. suis descritas por BIESTER & MURRAY (1934). Esses autores descreveram oocistos medindo $20-24\mu\text{m}$ x $18-21\mu\text{m}$, e a espessura da parede com média de $1,5\mu\text{m}$. Em algumas amostras eram observados oocistos cuja parede apresentava-se aderida ao esporocisto. Os autores acreditavam que o oocisto possuía parede dupla e que em algumas circunstâncias a parede externa era rompida ou mutilada e a parede interna aderida ao esporocisto. VETTERLING (1965) descreveu oocistos de I. suis menores do que os autores anteriores ($17-22\mu\text{m}$ x $17-19\mu\text{m}$), com parede simples, porém mais delgada, medindo apenas $0,5\mu\text{m}$ de espessura. Este autor atribuiu as disparidades de medidas de oocistos e da espessura entre os dois trabalhos a erros inerentes a diferentes equipamentos usados e ao pessoal. VETTERLING (1965) também observou a parede do oocisto retraída, e como BIESTER & MURRAY (1934) atribuiu o fato à longa exposição à solução saturada de açúcar, ou ao excesso de pressão exercida no momento de colocar a lâmina e a lamínula. Nestes casos, haveria injúria da parede do oocisto e este permaneceria aderido ao esporocisto. VETTERLING (1965) observou também que, em fezes recém colhidas da ampola retal, 2,0% dos oocistos já continham 2 esporoblastos no seu interior. Esses oocistos apresentavam paredes mais espessas do que os oocistos

totalmente esporulados e foram denominados Isospora sp., considerados pseudo-parasitas pelo autor.

A classificação das espécies de coccídias tem sido feita tradicionalmente baseada na morfologia dos oocistos (MARQUARDT, 1973) . Oocistos de parede fina , a qual toma o contorno dos esporocistos, e a eliminação de oocistos esporulados são características de protozoários do gênero Sarcocystis (DUBEY,1976) . Por ocasião dos trabalhos publicados por BIESTER & MURRAY (1934) e VETTERLING (1965) ainda não havia um conhecimento pormenorizado sobre as coccídias dos gêneros Isospora , Sarcocystis, Toxoplasma e outros. Essas espécies eram classificadas de acordo com a sua especificidade em relação ao hospedeiro . E possível que outros pesquisadores tenham observado os oocistos de parede fina e retraída em I. suis , mas tenham atribuído o fato a artefatos de técnica, de modo que esses oocistos não tenham sido mencionados. Somente à partir da década de 70, juntamente com as novas observações sobre o ciclo de vida do Toxoplasma gondii (FRENKEL et alii, 1970 ; DUBEY et alii, 1970) foi descrito o ciclo evolutivo completo do Sarcocystis spp (FAYER,1974; DUBEY,1976). Atualmente as descrições de espécies de coccídias exigem, além da morfologia dos oocistos, características de ciclo evolutivo, hospedeiro, sítio de ação e estádios endógenos e técnicas moleculares (BALL & PIRRILO, 1990) . No presente trabalho veri-

ficou-se que embora a morfologia do oocisto fosse semelhante a do Sarcocystis spp , o ciclo evolutivo, os sinais clínicos e as características patológicas eram de I. suis.

Atualmente, dentre as características morfológicas dos oocistos de Isospora sp incluem-se: parede simples, formada por 2 membranas, tratando-se de artefato a observação do espaço entre elas (SCHOLTYSECK, 1973). No entanto, quando os oocistos sofrem exposições prolongadas às soluções hipertônicas, podem ocorrer distorções bizarras na parede e no conteúdo dos mesmos (RYLEY, 1973). No presente trabalho as amostras não foram submetidas à exposições prolongadas na solução saturada de açúcar ou de sal, tendo sido expostos durante 30 e 3 minutos, respectivamente antes das observações ao microscópio óptico. Nas contagens de oocistos realizadas diariamente, eram observados oocistos de paredes fina e normal na mesma amostra. Algumas amostras recém colhidas já apresentavam oocistos com 2 (dois) esporoblastos, e em outras havia a ruptura total da parede, ocorrendo esporocistos livres. Não foram observados oocistos não esporulados de parede fina. Esses dados indicam que os oocistos de parede fina podem pertencer a uma cepa diferente de I. suis , ou ocorrer numa determinada fase da sua esporulação. Outra possibilidade , a exemplo do que ocorre na Eimeria auburnensis, seria a variabilidade da parede externa do oocisto. Neste caso , a inoculação de oocistos de parede

rugosa em bezerros, resultou na eliminação de oocistos de paredes rugosa e lisa (MARQUARDT, 1973).

Novos estudos necessitam ser realizados para esclarecer as características citoquímicas, fisiológicas e bioquímicas dos oocistos de parede fina de I. suis. Essas características poderão fornecer subsídios que auxiliem no controle ambiental de oocistos, uma vez que estes são responsáveis pelos quadros clínico e patológico em leitões.

6. CONCLUSOES

- 6.1. Oocistos de I. suis ocorreram em quase todos os municípios estudados no Leste do Estado de São Paulo.
- 6.2. A presença de oocistos foi estatisticamente significativa em granjas com histórico de diarreia compatível com a isosporose.
- 6.3. Devido ao fato de cerca de metade das granjas apresentarem histórico de diarreia , a isosporose dos leitões pode ser considerada um problema importante para a suinocultura industrial paulista.
- 6.4. A presença de oocistos não apresentou relação significativa com a consistência das fezes, indicando que é importante o histórico de diarreia na granja para o diagnóstico da isosporose.

- 6.5. A faixa etária acometida dependeu do histórico da granja: nas granjas com histórico de diarreia a presença de oocistos foi significativamente maior em leitões entre 10 e 19 dias de idade e nas granjas sem histórico de diarreia a presença de oocistos não diferiu em leitões entre 10 e 50 dias de idade.
- 6.6. A presença de oocistos não apresentou relação com a fase da vida do leitão: a observação de oocistos foi semelhante entre amostras de fezes de leitões lactentes e desmamados .
- 6.7. O tipo de instalação e manejo da maternidade apresentou relação significativa com a presença de oocistos: em maternidades "sujas" e no "chão" a presença de oocistos foi maior do que em maternidades "suspensas".
- 6.8. A presença de oocistos em leitões desmamados não diferiu nas diferentes instalações e manejo de creche.
- 6.9. A infecção experimental em leitões , utilizando oocistos de parede delgada, apresentou as características de ciclo de vida, sinais clínicos e patológicos compatíveis com as de I. suis.

7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

BALL, ST & PIRRILO, R.M. - Structure and ultrastructure. In: Coccidiosis of man and domestic animals. Long, P.L. Ed. CRC Press, Boca Raton, Flórida. Pp. 18-41, 1990.

BARCELLOS, D. E. S. N. ; RODRIGUES, N.C. ; OLIVEIRA, S.J. & BOROWSKI, S. M.- Ocorrência da coccidiose como causa da diarréia em leitões lactentes no Rio Grande do Sul. Arg. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12:15-20, 1984.

BHATTACHARYYA, G. K. & JOHNSON, R.D. - Comparing two treatments. In Statistical concepts and methods. Ed. John Wiley & Sons. New York, pp. 286-321, 1977.

BIESTER & MURRAY - Studies in infections enteritis of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 85: 207-219, 1934.

BOROWSKY, S. M.- Coccidiose em suínos. Boletim Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Guaíba, 1-122: 83-91, 1986.

- CHANDRA, D. & GHOST, S. S.- Coccidiosis of swine in North-Eastern Hills Region (Meghalaya). Indian Vet. J. 67: 498-500, 1990.
- CHHABRA, R. C. & MAFUKIDZE, R.T. - Prevalence of coccidia in pigs in Zimbabwe. Vet. Parasitol. 41: 1-5, 1992.
- DORE, M. & MORIN, M. - Porcine Neonatal Coccidiosis: Evaluation of monensin as preventive therapy. Can. Vet. J. 28: 663-666, 1987.
- DUBEY, J.P. - A review of Sarcocystis of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. J.A.V.M.A. 169: 1061-1078, 1976.
- DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. & FRENKEL, J.K. - Characterization of the new fecal form of Toxoplasma gondii. J. Parasitol. 56: 447-456, 1970.
- ERNEST, J. V., LINDSAY, D. S., CURRENT, W. L.- Control of Isospora suis - induced coccidiosis on a swine farm. Am. J. Vet. Res. 46 (3): 643-645, 1985.

- ERNEST, J. V., LINDSAY, D. S., JARVINEN, J. A., TODD, K.S. & BANE, D. P.- The sporulation time of Isospora suis oocysts from diferent sources. Vet. Parasitol. 22: 1-8, 1986.
- EUSTIS, S. L. & NELSON, D. T.- Lesions associated with coccidiosis in nursing piglets. Vet. Pathol. 18: 21-28, 1981.
- FAYER, R. - Development of Sarcocystis fusiformis in the small intestine of the dog. J. Parasitol. 60: 660-665, 1974.
- FRENKEL, J.K. - Advances in the biology of Sporozoa. Z. Parasitenk. 45: 125-162, 1974.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. & MILLER, N.L. - Toxoplasma gondii in cats: fecal stages identified as coccidian oocystis. Sci 893-896, 1970.
- GIRARD, C. & MORIN, M. - Amprolium and furazolidone as preventive treatment for intestinal coccidiosis of piglets. Can. Vet. J. 28; 667-669, 1987.
- HARLEMAN, H. J., & MEYER, R. C.- Pathogenicity of Isospora suis in gnotobiotic and conventiolized piglets. Vet. Rec. 25: 561-565, 1985.

- HARLEMAN, H. J., & MEYER, R. C.- Life cycle of Isospora suis in gnotobiotic and conventionalized piglets. Vet. Parasitol. 17:27-39, 1984/1985.
- HILL, H.T. - Preventing epizootic TGE from becoming enzootic TGE. Vet. Med. 4: 432 -436, 1989.
- HOEFLING, D. - Tracking the culprits behind diarrhea in neonatal pigs. Vet. Med. 4: 426-427, 1989.
- JOYNER, L.P. - Coccidiosis and coprofagy. Vet. Rec. 21: 264-265, 1981.
- KIM, S.H. & KONG, Y.B. - Prevalence of porcine coccidiosis in Korea. korean J. Vet. Public Health 10 : 35-36, 1986.
- LIMA, J. D. - Coccidiose suína : uma doença emergente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 4. Anais, Itapema, p.29-31, 1989.
- LIMA, J. D., OLIVEIRA, A. R. S., MARTINS, N. E. & BORETTI, L. P. - Coccidiose em leitões lactentes de Minas Gerais. Arg. Bras. Med. Vet. Zoot. 35 : 33-40, 1983.

- LINDSAY, D. S.- Diagnosing and controlling Isospora suis in nursing pigs. Vet. Med. : 443-448, 1989
- LINDSAY, D. S.- Isospora:infections of intestine: Biology. In: Coccidiosis of man and domestic animals. Long, P.I. Ed. CRC Pres, Boca Raton, Florida. pp. 78-89, 1990.
- LINDSAY, D. S.; CURRENT, W. L.; ERNEST J. V.- Sporogony of Isospora suis BIESTER, 1934 of swine. J. Parasitol. 68: 861-865, 1982.
- LINDSAY, D. S.; CURRENT, W. L.; ERNEST J. V.- Excystation of Isospora suis Biester, 1934 of swine. Z. Parasitenkd 69: 27-34, 1983.
- LINDSAY, D. S.; CURRENT, W. L.; ERNEST J. V.; STUART, B.P.- Diagnosis of neonatal porcine coccidiosis caused by Isospora suis. Vet. Med. / S. An. Clinic. 78 (1) : 89-95, 1983.
- LINDSAY, D. S.; CURRENT, W. L.; ERNEST J. V.; STUART, B.P.; STEWART, T. B.- Prevalence of oocysts of Isospora suis and Eimeria spp. from sows on farms with and without a history of neonatal coccidiosis. JAVMA 185 : 419-421, 1984.

LINDSAY, D. S.; CURRENT, W. L.; TAYLOR, J. R.- Effects of experimentally induced Isospora suis infection on morbidity, mortality, and weight gains in nursing pigs. Am. J. Vet. Res. 46 : 1511-1512, 1985.

LONG, P.L., JOYNER, P.L., MILLARD, B.J. & NORTON, C.C - A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. Fol. Vet. Lat. 6: 201-207, 1976.

MARQUARDT, W.C. - Classification. In: The coccidia. Hammond, D.M. & Long, P.L. Ed. University Park Press. London, pp.145 - 181, 1973.

MARQUES, J. L.- Aspectos clínicos, parasitológicos e anatomopatológicos da isosporose em leitões lactentes inoculados experimentalmente. Minas Gerais, 70 pp., 1990. (tese de mestrado, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, mimeografada).

MARQUES, J. L.; SOUZA, J. C. A.; LIMA, J. D.; MORES, N.; MARTINS N. E. - Obtenção e purificação de oocistos de Isospora suis em leitões experimentalmente infectados. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 4. Anais, Itapema, p.102, 1989.

MARTINS, N.E. - Determinação de alguns aspectos das condições zoo-sanitárias e infecção por coccídios em suínos na micro-região homogênea-mata de Ponte Nova, Minas Gerais. 57 pp., 1984. (tese de mestrado, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais).

MUNDT, H.C. & HABERKORN, A.- Porcine coccidiosis: A significant problem? In: 11th CONGRESS OF INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, Lausanne, Suíça, 1990.

NILSSON, O.- Isospora suis in pigs with post weaning diarrhoea. Vet. Rec. 26: 310-311, 1988.

ROBINSON, Y.; MORIN, M.; GIRARD, C. & HIGGINS, R.-Experimental transmission of intestinal coccidiosis to piglets : Clinical, parasitological and pathological findings. Can. J. Comp. Med. 47: 401-407, 1983.

ROPPA, L. - Swine production in Brasil. IN: 10th CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, Rio de Janeiro, Brasil, p. 3-6, 1988.

RUZICKA, W. C. & ANDREWS, J.J.-Porcine neonatal coccidiosis: A clinical Review. Iowa St. Vet. 45: 90-95, 1983.

RYLEY, J. F. - Cytochemistry, physiology, and biochemistry.
In: The coccidia. Hammond, D.M. & Long, P.L. Ed.
University Park Press. London, pp. 145-181, 1973.

SANFORD, S. E. - Porcine neonatal coccidiosis: clinical,
pathological, epidemiological, and diagnostic features.
California Vet. 8: 26-29, 1983.

SÃO PAULO. SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. CAMPI-
NAS. COORDENADORIA DE ASSISTENCIA TECNICA INTEGRAL.
Diagnóstico da situação da doença de Aujeszky . Documento
técnico n. 66, 76 pp., 1986.

SCAINI, C. J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; STEPAN, A. L.; CORREA,
B. L. - Presença de Isospora suis em leitões recentemente
desmamados apresentando diarreia. In CONGRESSO
BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS 5.
Anais, Aguas de Lindóia, p.77, 1991.

SCHOLTYSECK, E. - Ultrastructure. In: The coccidia. Hammond,
D.M. & Long, P.L. Ed. University Park Press. London,
pp. 81-144, 1973.

SOUZA, J. C. A.; MARQUES, J. L.; LIMA, J. D.; SOBESTIANSKY, J.; NOGUEIRA, R. H. G.-Aspectos clínicos e parasitológicos da isosporose em leitões lactentes inoculados experimentalmente. In CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS. 4. Anais, Itapema, p.103, 1989.

STEVENSON, G.W. & ANDREWS, J.J. - Mucosal impression smears for diagnosis of piglet coccidiosis. Vet. Med./ Sm. An. Clinic. 77: 11-113, 1982.

STUART, B. P.; GOSSER, H.S.; ALLEN, C.B. & BEDELL, D.M. - Coccidiosis in swine: dose and age response to Isospora suis. Can. J. Comp. Med. 46 : 317-320, 1982.

STUART, B.P.; & LINDSAY, D. S.- Coccidiosis in Swine. Vet. Clinic. North America / Food An. Prat. 2 : 455-467,1986.

STUART, B.P.; SISK, D.B.; BEDELL, D.M. & GOSSER, H.S.- Demonstration of immunity against Isospora suis in swine. Vet. Parasitol. 9: 185-191, 1982.

TUBBS, R.C. - A review of porcine neonatal coccidiosis. Mod. Vet. Prat.: 899-903, 1986.

TUBBS, R.C.- Controlling coccidiosis in neonatal pigs. Vet. Med. 82 : 646-647, 1987.

VETTERLING, J.M. - Coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of swine. J. Parasitol. 51 (6): 897-913, 1965a.