CIDÉLI DE PAULA COELHO

Avaliação de tratamento Homeopático em Suínos infectados por
Escherichia coli

São Paulo

2010

CIDÉLI DE PAULA COELHO

Avaliação de tratamento Homeopático em suínos infectados por
Escherichia coli

São Paulo

2010

CIDÉLI DE PAULA COELHO

Avaliação de tratamento Homeopático em suínos infectados por

Escherichia coli

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
6/7/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2308
FMVZ

Coelho, Cidéli de Paula

Avaliação de tratamento Homeopático em suínos infectados por *Escherichia coli* /
Cidéli de Paula Coelho. -- 2010.
111 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São
Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Bioterápicos. 2. *Escherichia coli*. 3. Homeopatia. 4. PCR. 5. Suínos. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1	1	em suínos	em suínos infectados por
Resumo	1	3	112 f	111 f
Abstract	1	1	em suínos	em suínos infectados por
Abstract	1	3	112 f.	111 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da *Escherichia coli* em criação de suínos e tratamento preventivo utilizado medicamento homeopático", protocolado sob o nº1166/2007, utilizando 140 (cento e quarenta) suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/09/07.

We certify that the Research "*E.coli* study in the swine breeding and preventive treatment using homeopathic medicine", protocol number 1166/2007, utilizing 140 (one hundred forty) swine, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/19/07.

São Paulo, 20 de setembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Coelho, Cidéli de Paula

Título: Avaliação de tratamento Homeopático em suínos infectados por
Escherichia coli

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

**"Aos que creem, nenhuma palavra é preciso;
aos que não creem, nenhuma palavra é possível"**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS por ter me conduzido todo o tempo na realização dos meus sonhos...

Agradeço a meu marido Eduardo por toda a sua imensa paciência e ajuda, por aceitar todos os momentos de ausência, por ser meu braço direito e esquerdo. Eu te AMO !

Agradeço ao professor Dr. Nilson Benites, meu orientador, por todo apoio no decorrer deste trabalho. Também a Dra. Priscilla Melville, por me direcionar na microbiologia.

Agradeço a professora Dra Andrea Moreno por toda a ajuda com o PCR e também a professora Dra Leoni Bonamim por todo incentivo e apoio, de tantos anos, para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao meu Mestre Antônio Polonio e sua esposa Maria José (Zé !) por tanto apoio, ensinamento, paciência e muito amor...

Agradeço as amigas e amigos de caminhada durante estes anos, Flavia Carolina, Erlete Vuaden, Francisco Soto, Leslie Almeida, Anna Von Sydow, Sonia Sakata, Maria Roberta Felizardo. E a todas as pessoas que colaboraram com este trabalho direta ou indiretamente...

Agradeço a todos os funcionários do departamento (VPS).

Agradeço a Andrea Tirloni por ceder a granja e também por toda ajuda.

Agradeço a Nilza Banhato Dimambro por nunca desistir de me guiar na língua Inglesa.

Agradeço a minha mãe pelo apoio de uma vida...

Agradeço ao meu PAI, Delfe de Paula Coelho (*in memorian*) que me mostrou, com a sua vida, a importância de lutar e estudar e conquistar. Sei do orgulho que ele estaria se estivesse hoje comigo. Obrigada PAI !!!

Agradeço ao Cnpq pelo apoio financeiro e a Márcia A. Gutierrez (Farmácia Sensitiva) por fornecer a medicação homeopática.

Dedico este trabalho à Delfe de Paula Coelho *in memoriam*, que tanto valor e apoio deu aos meus estudos.

Com sua ausência aprendi que: “Para estar perto, não precisa estar junto. Basta estar dentro” – Te Amo !!!

Dedico também aos meus AMORES... Edu e Ianzinho... E Lele...

Dedico todo meu Amor à Força Maior que é Deus e agradeço por seu zelo em minha vida...

RESUMO

COELHO, C. P. **Avaliação de tratamento Homeopático em suínos *Escherichia coli***. [Evaluation of homeopathic treatment in swine infected by *Escherichia coli*]. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Escherichia coli é o agente etiológico mais importante das diarreias neonatais em suínos, sendo a Enterotoxigênica (ETEC) a mais comumente isolada. Foram descritos cinco tipos principais de fímbrias: F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 e F41 e enterotoxinas termolábeis (LT), termoestáveis (ST), e a toxina shiga-like ou verotoxina (Stx2) em isolados de origem suína envolvidas no processo de diarreia. A exigência do consumidor em busca de carnes sem resíduos químicos e a proibição do uso de antibióticos e quimioterápicos na produção de suínos, bem como o custo de tratamentos alopáticos, tem levado a suinocultura a procurar alternativas. O presente estudo foi desenvolvido em granjas de suínos no Estado de São Paulo e Mato Grosso, Brasil. Foram avaliados 157 leitões, e realizados 243 coletas de fezes. Coletas de fezes de 3 e 8 leitões com diarreia foram realizadas em cada granja, visando a pesquisa da presença de *Escherichia coli* para a preparação do medicamento Bioterápico. Concomitantemente uma anamnese detalhada foi feita para a escolha do medicamento homeopático ideal para cada granja (*China off* 30 CH, *Phosphorus* 30 CH e *Pulsatilla* 30 CH respectivamente). Formados 4 grupos de 12 leitões e suas respectivas mães (primíparas), os tratamentos foram simultâneos: controle (antimicrobiano empregado na granja), medicamento homeopático, Bioterápico de *E.coli* e medicamento homeopático associado com o respectivo Bioterápico. Os medicamentos foram feitos segundo a farmacotécnica homeopática brasileira. Foi realizada a pesquisa de fatores de virulência e enterotoxinas em 154 colônias de *Escherichia coli* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No tratamento da diarreia os grupos tratados com medicamentos homeopáticos passaram de 58,3% de animais com diarreia para 5,5% ao final do tratamento, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), e os grupos de medicamento e Bioterápico 30 CH associados também apresentaram significativa redução de animais doentes ($p < 0,05$), pois passaram de 47,0% de animais com diarreia no início para 20,0% ao final. No ganho de peso os mesmos grupos obtiveram maiores ganhos, com resultados de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos outros grupos. Nos animais com *E.coli* foram encontrados apenas o fator de virulência F41 em 10,4% dos animais e a enterotoxina Stb em 1,9% dos animais. Concluí-se que os medicamentos homeopáticos são uma alternativa eficiente para o uso em distúrbios entéricos em suínos, assim como para aumentar o ganho de peso, além de ser mais econômico.

Palavras-chave: Bioterápicos. *Escherichia coli*. Homeopatia. PCR. Suínos.

ABSTRACT

COELHO, C. P. **Evaluation of homeopathic treatment in swine infected by *Escherichia coli*.** [Avaliação de tratamento Homeopático em suínos *Escherichia coli*]. 2010. 112 f - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Escherichia coli is the most important aetiological agent in neonatal diarrhoea in swine, and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the most commonly isolated. Five main types of fimbriae were described: F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 and F41 and thermolabile (LT) and thermostable enterotoxins (ST), and shiga-like toxin or verotoxin (Stx2) in isolates of swine origin, involved in the diarrhoea process. The consumer's demand for residues-free meat and the prohibition for the use of antibiotics and chemotherapy treatments in the swine production, as well as the cost of allopathic treatment have caused the pig farming to search for alternatives. This study been developed in swine farms in the states of São Paulo and Mato Grosso, Brazil. 157 piglets were studied and 243 feces collection were carried out. Feces collection from 3 to 8 piglets having diarrhoea were carried out in each swine farm, with the aim to research the presence of *Escherichia coli* and to prepare biotherapeutic medicines. Concurrently, a detailed anamnesis was made for choosing the ideal homeopathic medication for each swine farm (*China off* 30 CH, *Phosphorus* 30 CH and *Pulsatilla* 30 CH respectively). Four groups of 12 piglets and their respective primiparous mother pigs were formed, and the treatments happened simultaneously: control group (antimicrobial treatment, the same used in the swine farm), homeopathic medication, *E. coli* biotherapeutic and homeopathic medication associated to the respective biotherapeutic. The medications were made according to the Brazilian Homeopathic Pharmacopeia. The research of virulence factors and enterotoxins was carried out in 154 *Escherichia coli* colonies through Polymerase Chain Reaction - PCR. Regarding to the treatment of diarrhoea, the homeopathy treated groups passed from 58.3% of animals having diarrhoea to 5.5% at the end of the treatment ($p < 0.05$); the groups treated with medication + biotherapeutic 30 CH associated also presented significance reduction of sick animals ($p < 0.05$), as they passed from 47.0% of animals having diarrhea to 20.0% at the end. The same groups got better weight gaining rates, with results statistically significant ($p < 0.05$), in relation to other groups. Only the F41 virulence factor was found in 10.4% of the studied animals. The enterotoxin Stb was found in only 1.9% of the animals. It is concluded that the homeopathic medications are an efficient alternative as for the use in enteric disorders in swine, as to increase the gain of weight, besides being more economical. Key-words: Biotherapeutic. *Escherichia coli*. Homeopathy. PCR. Swine.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Repertorização Experimento 1	42
Quadro 2 -	Repertorização Experimento 2	42
Quadro 3 -	Repertorização Experimento 3	43
Quadro 4 -	Códigos dos grupos do Experimento 1	45
Quadro 5 -	Códigos dos grupos do Experimento 2	45
Quadro 6 -	Códigos dos grupos do Experimento 3	45
Quadro 7 -	“Primers” que serão utilizados na PCR para amplificar fragmentos de diferentes genes para enterotoxinas (LT, STa e STb), F4 (K88), F18, F41, F5 (987P), F6 (K99), F41, Stx2e	50
Quadro 8 -	Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> , para obtenção do bioterápico (Experimento 1)	56
Quadro 9 -	Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> na coleta (Experimento 1).	56
Quadro 10 -	Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> , para obtenção do bioterápico (Experimento 2).....	62
Quadro 11-	Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> , na primeira coleta (Experimento 2)	63
Quadro 12 -	Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> , na segunda coleta (Experimento 2).....	63
Quadro 13 -	Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> , para obtenção do bioterápico (Experimento 3).	69
Quadro 14 -	Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> , na primeira coleta (Experimento 3).....	69
Quadro 15 -	Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para <i>Escherichia coli</i> , na segunda coleta (Experimento 3).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados do isolamento, ao início do tratamento e ao final (experimento 1)	53
Tabela 2 -	Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e sua porcentagem (Teste de Fisher)	54
Tabela 3 -	Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame, o número de leitões de cada grupo e o ganho de peso do lote	55
Tabela 4 -	Resultados do isolamento, ao início do tratamento e ao final (experimento 2)	59
Tabela 5 -	Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e suas porcentagens e número total de animais do grupo (experimento 2)....	60
Tabela 6 -	Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame, o número de leitões de cada grupo e o ganho de peso do lote (granja 2)	60
Tabela 7 -	Resultados do isolamento, ao início do tratamento dos animais, e ao final (experimento 3).....	61
Tabela 8 -	Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e suas porcentagens e número total de animais (Experimento 3).....	66
Tabela 9 -	Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame, o número de leitões de cada grupo e o ganho de peso do lote (Experimento 3)	66
Tabela 10 -	Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e porcentagem de diarreia de cada lote das 3 granjas	67
Tabela 11 -	Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame	68
Tabela 12 -	Relação animais com diarreia e Fatores de Virulência e Enterotoxinas.....	72
Tabela 13 -	Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e porcentagem de diarreia de cada lote das 3 granjas	73
Tabela 14 -	Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame em gramas	74
Tabela 15 -	Custo por leitão de cada tratamento	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta para Bioterápico	39
Figura 2 - Coleta de fezes em swab.....	40
Figura 3 - Esquema de processamento das fezes coletadas de leitões	41
Figura 4 - Leitão tomando medicamento Homeopático	47
Figura 5 - Fluxograma Experimentos 1, 2 e 3	48
Figura 6 - Foto PCR de amostras com fator de virulência F41	76
Figura 7 - Foto PCR de amostras com enterotoxina Stb	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Média do ganho de peso dos grupos em gramas.....	55
Gráfico 2 -	Número de leitões positivos e negativos para Fatores de virulência e enterotoxinas	58
Gráfico 3 -	Média do ganho de peso dos grupos em gramas.....	62
Gráfico 4 -	Número de leitões positivos e negativos para Fatores de virulência e enterotoxinas (Coleta 1 e 2 – Experimento 2)	65
Gráfico 5 -	Média do ganho de peso dos grupos em gramas.....	68
Gráfico 6 -	Número de leitões positivos e negativos para Fatores de virulência e enterotoxinas (Coleta 1 e 2 – Experimento 3)	71
Gráfico 7 -	Ocorrência de animais com diarreia no início e ao final do tratamento	73
Gráfico 8 -	Média do ganho de peso das 3 granjas em gramas	74
Gráfico 9 -	Animais com Fatores de Virulência e Enterotoxinas em todos os Experimentos	75
Gráfico 10 -	Número de animais positivos por Fatores de Virulência e Enterotoxinas	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
APEC	<i>E.coli</i> patogênica aviária
CFs	fatores de colonização
CH	centesimal Hahnemaniana
d	potência homeopática decimal
DNA	ácido desoxirribonucléico
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EaggEC	<i>E.coli</i> enteroagregativa
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EHEC	<i>E.coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E.coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>E.coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E.coli</i> enterotoxigênica
g	grama
HCl	ácido clorídrico
ml	mililitro
Oligo	oligonucleotídeo
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
STEC	<i>E.coli</i> produtora de toxina tipo <i>Shiga</i>
TE	tampão Tris-EDTA
UPEC	<i>E.coli</i> uropatogênica
X	vezes
K	Korsakov (Método homeopático)

S U M Á R I O

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Homeopatia	22
2.2	<i>Escherichia coli</i>	29
3	OBJETIVO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Delineamento Experimental	39
4.1.1	Coleta de amostras de fezes de suínos para exame microbiológico.....	39
4.2	Escolha do medicamento homeopático	41
4.2.1	Repertorização.....	41
4.2.2	Matéria Médica.....	43
4.3	Animais e tratamento	46
4.3.1	Experimento 1.....	46
4.3.2	Experimento 2 e 3.....	46
4.3.3	Controle.....	47
4.4	Estudo da presença de fatores de virulência em estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)	48
4.4.1	Extração do DNA bacteriano.....	49
4.4.2	Reação em cadeia da polimerase.....	49
4.4.3	Deteção do produto amplificado.....	50
4.5	Análise Estatística	51
5	RESULTADOS	53
5.1	Experimento 1	53
5.1.1	Isolamento <i>Escherichia coli</i>	53
5.1.2	Número de animais com diarreia.....	54
5.1.3	Ganho de Peso.....	54
5.1.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	55

5.2	Experimento 2	59
5.2.1	Isolamento <i>Escherichia coli</i>	59
5.2.2	Número de animais com diarreia.....	60
5.2.3	Ganho de Peso.....	61
5.2.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	62
5.3	Experimento 3	66
5.3.1	Isolamento <i>Escherichia coli</i>	66
5.3.2	Número de animais com diarreia.....	67
5.3.3	Ganho de Peso.....	68
5.3.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	69
5.4	Cruzamento das 3 granjas	72
5.4.1	Número de animais com diarreia.....	72
5.4.2	Ganho de Peso.....	74
5.4.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	75
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	101

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A exigência do consumidor em busca de carnes sem resíduos químicos e a proibição do uso de antibióticos e quimioterápicos na produção de suínos, principalmente pelos países importadores de carne suína da Europa, bem como o custo dos medicamentos alopáticos, tem levado a suinocultura tecnificada a procurar uma medicina alternativa para os tratamentos terapêuticos e preventivos na criação destes animais (SOTO et al., 2007). A cadeia produtiva de suínos tem um papel relevante no desenvolvimento econômico e social de vários estados brasileiros, alguns de longa tradição e outros mais recentes na atividade (TALAMINI et al., 2006). Na suinocultura, onde mais de 70% da carne é processada, a atividade além de grande efeito na geração de trabalho e renda no meio rural, tem efeito multiplicador em outros setores da economia com reflexos no meio urbano (TALAMINI et al., 2005).

A homeopatia veterinária surge como uma alternativa importante, sendo reconhecida como Especialidade Médica Veterinária junto ao Conselho Federal de Medicina Veterinária no Brasil e também é aceita nas legislações agroecológicas nacionais e internacionais, como exemplo, a pecuária orgânica e a produção agroecológica de suínos. Quando a homeopatia é utilizada na população de suínos não tem somente o aspecto curativo, mas tem como objetivo também, a estimulação do organismo dos animais, conseguindo assim: a diminuição do nível de estresse do plantel; estímulo da imunidade e da capacidade reacional dos animais às infecções bacterianas, virais e aos endo e ectoparasitas (VUADEN, 2005; SOTO et al., 2007). Podendo assim conseguir um maior ganho de peso dos animais em comparação aos não medicados, para isto o profissional veterinário e também o produtor precisam ter um olhar atento objetivando restabelecer a saúde e o equilíbrio do organismo como um todo. Podemos citar o trabalho de Maass et al. (2005) que avaliaram o desempenho zootécnico e a resposta imune de suínos tratados com *Echinacea purpúrea*. Os resultados revelaram que os grupos suplementados com *Echinacea purpúrea* tiveram maior produção de anticorpos contra a Erisipela suína, sendo indicada a sua utilização para melhorar a imunidade dos animais frente à doença.

A diarreia tem se tornado uma doença economicamente importante na suinocultura devido ao sistema de manejo intensivo que se tem adotado (ZLOTOWSKI, 2008). As enterites podem ser observadas em três fases distintas da criação: diarreia neonatal, que ocorre

nos primeiros dias de vida dos leitões, diarreia dos leitões, quando ocorre da primeira semana até o desmame e diarreia pós-desmame. Segundo Abrahão et al. (2004), durante o aleitamento cerca de 50 % a 60 % das mortes de recém nascidos ocorre nos sete primeiros dias devido, principalmente, ao esmagamento pela porca ou ocorrência de diarreia neonatal. *Escherichia coli* é o agente etiológico mais importante das diarreias neonatais e pós desmame em suínos (VIEGAS, 1986; FAIRBROTHER, 1999; CALDERARO et al., 2001; BRITO et al., 2003), sendo a colibacilose uma das enfermidades de impacto na suinocultura (COSTA et al., 2006). Outros agentes infecciosos podem estar envolvidos na etiologia das diarreias neonatais, como Rotavírus, *Isospora suis*, *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* sp. (GREGORI et al., 2004), *Cryptosporidium parvum* (CALDERARO et al., 2001), *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. (VIEGAS, 1986).

Poucos microorganismos são tão versáteis como *Escherichia coli* (KAPER et al, 2004), amostras de *E. coli* podem causar grande variedade de doenças ao homem e aos animais, as mais comuns são diarreia e desintéria, ocasionalmente também pode ocorrer Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), colite hemorrágica (CH), pielonefrite, cistite, pneumonia, septicemia e meningite. Em geral diferentes amostras estão relacionadas com doenças diversas,

Nos animais, *E.coli* tem aparecido como uma das causas de diarreia, cistite, mastite, septicemia, nefrite, etc. (KRUTH, 1998; RADOSTITIS et al., 2000). Fatores predisponentes que tornam os animais susceptíveis ao desenvolvimento da doença clínica incluem idade, estado imunológico, natureza da dieta e grande exposição a linhagens patogênicas (QUINN et al., 2005).

A contaminação de alimentos, por entero-patógenos, é uma importante causa de diarreia em países em desenvolvimento, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade com perdas econômicas significativas (LEVINE; EDELMAN, 1984; LOPEZ-SAUCEDO et al., 2003). As doenças veiculadas por alimentos de origem animal exercem um grande impacto em saúde pública.

Estima-se que a *Escherichia coli* enteropatogênica (ETEC) seja responsável por 650 milhões de casos por ano em países desenvolvidos, que resulta em 800 mil mortes, principalmente de crianças. Ainda, seu alto nível de morbidade em humanos tem

implicações também na pecuária, uma vez que este é o maior patógeno para o gado e leitões (TURNER et al., 2006).

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Homeopatia

A homeopatia teve início com Samuel Hahnemann que nasceu em 1755, em Meissen. Foi um homem da ciência e dedicou sua vida organizando o conhecimento médico. Com 20 anos de idade, ingressou na Universidade de Leipzig. Para seu sustento lecionava Línguas estrangeiras e traduzia livros para o alemão. Tornou-se um clínico de renome e próspero, com excelente clientela, entretanto, a insatisfação com a medicina exercida na época o fez afastar-se da profissão e voltar às traduções (BRUNINI et al., 1993). Em 1790, traduzindo a *Matéria Médica* de Cullen, percebeu na descrição das ações farmacológicas da *Chinchona Officinalis* ou China, a extraordinária semelhança entre os sintomas por ela provocados e os da “febre intermitente”, para qual era indicada como remédio (PUSTIGLIONE, 2001; BENITES, 2006), fato este que o levou à auto-experimentação da China, marco inicial da história da Homeopatia.

Ao saber acumulado e organizado, dá-se o nome de Ciência. A organização racional do conhecimento é, portanto, a primeira real preocupação dos homens da ciência (PUSTIGLIONE, 2001), logo, é científico todo procedimento, seja de experimentação laboratorial, de simples observação, de análise ou de elocubração teórica, desde que embasado em pensamento lógico, coerente e metodológico (PRADA, 2002).

Os “artistas da cura”, cada qual em seu tempo e dentro de sua racionalidade, trataram de agregar conhecimento, prática e hipóteses na Ciência médica (PUSTIGLIONE, 2001). Assim, Samuel Hahnemann (1755-1843), não satisfeito com a medicina hegemônica, exercida na sua época, buscou novas respostas para a cura, construindo a Homeopatia, que se sustenta em duas leis básicas:

Lei dos semelhantes

Foi Hipócrates (460- 350 A.C.) quem primeiro descreveu a *Lei dos semelhantes* através do aforismo “*Simillia similibus curantur*”, ou seja, “o Semelhante cura o

semelhante” (BENITES, 1999), o quadro sintomatológico apresentado por um paciente é curado pela substância que, experimentada no homem sadio, produz quadro sintomatológico semelhante (COSTA, 1988).

Vitalismo

Condição que rege e harmoniza o ser vivo, fenômeno imaterial que inexiste na substância morta e que caracteriza a vida (BENITES, 2006). Mantém e harmoniza os fenômenos da vida e é de fácil observação, pois diferencia, em sua essência, as coisas vivas das não vivas. Desta forma, quando a força vital está equilibrada, o organismo apresenta suas funções fisiológicas equilibradas também, mas quando algum estímulo desequilibra a força vital, o indivíduo apresentará disfunções no organismo material e manifestará sinais clínicos oriundos deste desequilíbrio (BENITES, 2006).

A partir da Lei dos Semelhantes e do Vitalismo, surgiram outros princípios essenciais à prática homeopática:

Doses mínimas

Hahnemann começou a diluir as fortes substâncias usadas como remédios e verificou que doses muito pequenas eram capazes tanto de desencadear quanto de curar sintomas. Também introduziu a sucussão, que é um processo mecânico de preparação dos medicamentos homeopáticos, no qual o frasco, contendo a substância diluída em insumo inerte (em geral, solução hidro-alcoólica), é agitado em movimentos verticais e rítmicos sobre um anteparo duro-elástico (COSTA, 1988). Assim, com a diluição e sucussão estaremos falando do processo de dinamização. As diluições homeopáticas são obtidas através de escalas diferentes. As escalas Hahnemanianas são a centesimal (C ou CH) e a cinquenta milesimal (LM) (BENITES, 2006). Neste trabalho foi utilizada a escala centesimal. A potência do medicamento é o resultado final de cada etapa do processo de dinamização.

Medicamento único

Hahnemann preconizava o uso de um único medicamento de cada vez, um medicamento que cobrisse a totalidade dos sintomas do paciente. Ele via o ser humano como um todo (COSTA, 1988; BENITES, 2006).

Indivíduo Total

Um indivíduo não é uma soma de partes e sim um ser indivisível. Uma patologia é o reflexo de um todo e não o produto da alteração de uma parte isolada do organismo (BENITES, 2006).

Experiência no homem são

Classicamente, as experimentações homeopáticas eram feitas em seres humanos sadios. Administrava-se uma dada substância no indivíduo sadio e observava-se seus efeitos físicos e mentais (COSTA, 1988; BENITES, 2006).

Ao conjunto de sintomas, relatados após essas experiências, dava-se o nome de patogenesia.

Estudo Patogenético

O termo “Patogênese” está associado à capacidade que um agente de natureza variável tem de alterar o estado de saúde dos indivíduos. A Homeopatia, a partir da observação de intoxicações ou experimentações acidentais e experimentação protocolar, ou metódica, introduziu na Medicina o vocábulo “Patogenético” (PUSTIGLIONE, 2000). Desta forma é muito importante a “investigação do poder patogenético” dos agentes, para tê-los à disposição, como medicamentos homeopáticos. Este conceito é elucidado no parágrafo 111 do “Organon da arte de curar” (HAHNEMANN, 1996):

§ 111 – O Efeito patogenético das substâncias

“As substâncias medicinais produzem no corpo humano sadio modificações patológicas segundo ‘leis definidas e imutáveis da natureza’. Em virtude destas, são capazes de produzir ‘sintomas mórbidos seguros e dignos de confiança’, cada um de acordo com sua própria individualidade”.

Através do estudo do poder patogenético dos medicamentos, o médico escolhe dentre os medicamentos experimentados, aquele capaz de produzir doença artificial tão semelhante quanto possível à totalidade dos sintomas da doença natural que deve ser curada (PUSTIGLIONE, 2001).

O “Organon da arte de curar” (1810 e 1819 em segunda edição, já com este título definitivo) é considerado como a “Bíblia dos Homeopatas”, porque nele, Hahnemann deixou escrito seus conceitos de filosofia, tratamento, vocação médica, semiologia homeopática, energia vital, enfermidades, anamnese, ética e moral médica (ROCHA, 1992).

A prática Homeopática tem a necessidade de comparação dos sintomas que o doente apresenta com os sintomas observados nas experimentações medicamentosas, o que permite a escolha correta do medicamento a ser utilizado em cada caso.

Deve-se procurar estudar todos os estímulos que apresentam capacidade de produzir doenças, não somente no indivíduo, mas também em um grupo de animais. A esta abordagem homeopática de uma população sendo tratada como uma única entidade, com uma única imagem, com todos os sinais clínicos presentes, tratando todos os indivíduos acometidos como se fosse um único ser vivo, denomina-se “gênio epidêmico” e ao medicamento selecionado para este caso, de “gênio medicamentoso” (BENEZ, 2002).

O gênio epidêmico pode ser utilizado quando um homeopata está atendendo uma população ou quando está atendendo apenas indivíduo que apresente sinais e/ou sintomas da doença de um surto. O medicamento do gênio epidêmico pode ser prescrito para todos os indivíduos que se encontram nas áreas com risco de contaminação, e que ainda não apresentam o quadro clínico. Desta forma ele age preventivamente. Medicando todos os indivíduos suscetíveis, deve-se observar a redução do número de doentes, redução na gravidade dos sinais e/ou sintomas dos indivíduos contaminados e redução do número de mortes (BENEZ, 2002).

Para tratar os animais com medicamentos homeopáticos é necessário (DAY, 1992):

- Conhecer os medicamentos através do estudo das Matérias Médicas.
- Conhecer a afecção e examinar bem o paciente para poder escolher os sinais característicos e importantes que serão usados na escolha do medicamento mais adequado.
- Selecionar o medicamento estudado na experimentação que mais se assemelhe ao quadro de doença natural. Para essa tarefa além do cumprimento das etapas anteriores, utiliza-

se o auxílio do Repertório. Este se trata de um livro que cataloga os sintomas por capítulos e classifica os medicamentos que cobrem as rubricas selecionadas para cada caso.

- Remoção dos obstáculos à cura, tais como: o mau manejo, instalações e nutrição inadequadas, raças mal adaptadas ao meio, etc.

Johann Joseph Wilhelm Lux nasceu em 1777 em Oppeln (Alemanha) e morreu em 1848 ou 1949. Foi contemporâneo de Hahnemann e o primeiro médico veterinário a utilizar-se da nova terapêutica. Em 1823 introduziu o tratamento para animais com sucesso imediato, além da busca do *similium* para os animais doentes criou um novo sistema terapêutico, a *Isoterapia*, que consiste no método de tratamento através dos iguais, prática que obedece o Princípio da Identidade (*Aequalia aequalibus curantur*) (JULIAN, 1980). Neste caso, independente da natureza da substância empregada (orgânica ou não, desde que esteja seguramente vinculada como causa da patologia instalada no paciente) é utilizada como matéria prima para a preparação do medicamento, sendo este utilizado pelo método da isopatia. A Isopatia tem por base o princípio “Igual cura igual”, ao passo que na Homeopatia a base é “Semelhante cura semelhante”. A semelhança da Homeopatia se baseia em semelhança da totalidade de sintomas do paciente comparada a totalidade de sintomas obtidos através da experimentação de uma substância. A prática Homeopática prevê a utilização da Isopatia, quando necessária, desde que se utilizem substâncias dinamizadas e diluídas segundo o método prescrito por Hahnemann (FERNANDES; BENEZ, 2007).

No presente trabalho foram abordados também os nosódios ou bioterápicos, como são chamados recentemente os isoterápicos preparados através de diluições de derivados orgânicos bacterianos ou parasitários. Estes produtos são esterilizados e posteriormente diluídos; portanto não são capazes de infectar um sujeito, mas mantêm um potencial reacional (MÉRIADÉC, 2005). Existe ainda no meio homeopático um grande questionamento a respeito do papel dos microorganismos nas enfermidades, alguns acreditam que eles nada mais são do que aproveitadores do momento de doença do indivíduo e que, sendo dado um medicamento adequado, eles são eliminados pelo próprio organismo; outros acreditam que "*as toxinas bacterianas e a própria bactéria acrescentam sintomas à doença de fundo*" e que "*o nosódio mobiliza a enfermidade latente ou suprimida quando bem indicado*". Considerando as dúvidas existentes quanto aos resultados do uso dos bioterápicos, neste trabalho será utilizado bioterápico de *Escherichia coli* (*Colibacillinum*) com o objetivo de procurar evidências experimentais que possam indicar a sua utilização.

A patogênese clínica de *Colibacillinum* foi dada por Léon Vannier sob o título Isotherapy, p 132-134 de *I'Homoeopathie Française*, n 2, February, 1933. Léon Vannier observou nos trabalhos do Prof Baruk que foi o primeiro a comunicar em outubro de 1932, “Bulletin medicale”, a possibilidade de usar Isoterápico de *Colibacillinum* (JULIAN, 1980).

“Teoria dos Significados Corporais” e Biosemiótica

Uma outra “visão” para os fenômenos da homeopatia ou das ultra-diluições e uma importante referência teórica para a elaboração de modelos experimentais mais precisos tem sido a “Teoria dos Significados Corporais”, de Madeleine Bastide (imunologista) e Agnès Lagache (filósofa). A teoria foi desenhada pelas pesquisadoras ao longo de 20 anos, confrontando resultados de pesquisas experimentais a conceitos de semiótica. Nessa teoria, “postula-se a troca de informação ou comunicação entre os sistemas biológicos em diferentes níveis, do molecular ao cognitivo, passando pelo princípio de similitude. Sob esse aspecto, o sintoma seria a chave do processo da similitude por representar uma forma de ‘expressão’ corporal. O sintoma, então, estaria para os sistemas dinamizados, assim como os receptores farmacológicos estariam para os sistemas moleculares” (BONAMIN, 2009).

Talvez esse seja o aspecto mais polêmico do princípio de similitude e da teoria dos significados corporais: a admissão do conceito de “significado biológico”, construindo-se uma base teórica inovadora baseada em evidências experimentais. Embora os conceitos “significado” e “biológico” sejam isoladamente incompatíveis sob a ótica da ciência clássica, há plausibilidade sob a ótica dos modernos conceitos de biossemiótica (WITZANY, 2007; BONAMIN, 2009).

Entende-se por biossemiótica a ciência que estuda os fenômenos semióticos (ou, de comunicação) em sistemas vivos. O termo biossemiótica foi criado em 1971 por Júri Stepanov. Uma definição clara e atual sobre biossemiótica foi oferecida recentemente por Marcello Barbieri: “O significante é um aspecto da configuração molecular e o seu significado é um aspecto da atividade biológica [...] Mas a ciência moderna não sabe como lidar com o conceito de significado (*meaning*). O desafio da biossemiótica é assumir que códigos são uma realidade fundamental da vida e nós temos que, simplesmente, aprender como introduzir signos e significados na ciência” (WITZANY, 2007; BONAMIN, 2009). Marcello Barbieri (2008) sublinha o carácter científico da biossemiótica e afirma que chegou o momento de reconhecer que a semiose não é apenas um fato da vida, mas é o fato que

permitiu a vida surgir da matéria inanimada. Então, merece uma atenção maior as similaridades entre o fenômeno homeopático e os fenômenos biossemióticos, levando-se em conta as suas propriedades biológicas e conceituais.

Pesquisa básica com medicamentos homeopáticos

A pesquisa básica pode fornecer mais um instrumento para pesquisa dos medicamentos homeopáticos, porque ela utiliza modelos relativamente simples, que permitem um efeito mais direto, além de oferecer grandes amostras de dados, necessárias para análises estatísticas estruturadas. Em particular, bioensaios vegetais parecem adequados para este tipo de experimentação, eles superam as principais desvantagens dos ensaios clínicos (como efeito placebo, as dificuldades éticas, o consumo de tempo, baixo número de repetições, os custos elevados) (BETTI; BORGHINI; NANI, 2003).

Betti et al. (2003) realizaram um trabalho para avaliar os efeitos dos tratamentos homeopáticos de trióxido de arsênico (As_2O_3) em plantas de tabaco submetidas ao vírus do mosaico do tabaco (TMV), o experimento foi randomizado e em cego, utilizando-se discos de folhas de tabaco. As plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cultivar Samsun) carregando o gene de resistência TMV, foram submersos por três dias em: Água destilada (controle), água potências 5 e 45 decimal e centesimal, As_2O_3 potências 5 e 45 decimal e centesimal. O resultado principal foi medido pelo número de lesões de hipersensibilidade observados em um disco foliar. Todos os tratamentos (decimal e centesimal) induziram nas plantas um efeito significativo (Aumento ou diminuição da resistência), confirmando que as potências 5d e 5CH e as potências ultra diluídas (45d, 45CH) podem provocar uma ação biológica. Resultados obtidos com os tratamentos de água potencializada sugerem que a potenciação do solvente sozinho é capaz de induzir efeito semelhante (mas mais fraco) ao do medicamento homeopático arsênico. Sob outro aspecto, o trabalho considerou a ação do tratamento sobre a variabilidade da hipersensibilidade a resposta. Os tratamentos geralmente induzem uma diminuição da variabilidade do sistema, é interessante notar que esta diminuição é induzida também (e mais acentuadamente) por potências centesimais, que não atuam tão bem no primeiro aspecto do experimento (reação de hipersensibilidade em termos de número de lesão). Uma redução similar no sistema de variabilidade surgiu a partir de 3000 dados coletados e envolvendo os tratamentos com água, condicionada por fraca radiação microondas, este achado poderá apoiar a idéia de que o eletromagnetismo e a homeopatia

estão ligados através de um mediador natural comum representado pela água. Por fim os autores salientaram que estes resultados são baseados em um grande número de dados experimentais e tem em conta não apenas o efeito do tratamento em um parâmetro determinado, mas também o comportamento do sistema, por isso eles podem suportar uma teoria fenomenológica e não-reducionista de homeopatia.

Outro exemplo de pesquisa básica bem sucedido, foi realizado com ratos, com o objetivo de testar se os modelos experimentais propostos eram instrumentos adequados para estudar os possíveis efeitos terapêuticos do *Dolichos pruriens* 6 CH, 9 CH, 12 CH e 30 CH na coceira induzida. Quinze ratos machos e adultos, da linhagem Wistar foram expostos a um ambiente aquecido ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e tratados por 40 dias com escala ascendente de potência (6 CH, 9 CH, 12 CH e 30 CH), cada potência mantida por 10 dias consecutivos. As observações comportamentais foram feitas em série, também a cada 10 dias. O grupo tratado com veículo recebeu solução hidro-alcoólica (30 %) diluído na água de bebida pelo mesmo período (N=15). Outro grupo controle não recebeu nenhum tratamento nem foi exposto ao calor (N=15), sendo mantido a uma temperatura igual a $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Todas as análises foram feitas em cego. Os resultados mostraram a existência de efeitos terapêuticos, com inibição da coceira induzida pelo calor e o retardo no aparecimento de lesões. Tais efeitos foram mais evidentes nas últimas observações (Kruskal-Wallis / Dunn; $p=0,001$), após a administração das potências 9 CH, 12 CH e 30 CH. Concluiu-se que o modelo experimental proposto foi adequado para a demonstração do efeito terapêutico do *Dolichos pruriens* (COELHO et al., 2006).

Para que se possa atingir um grau de evidência desejável, com um incremento na pesquisa em homeopatia, novos estudos e propostas fazem-se necessários, exigindo uma postura imparcial e isenta de preconceitos, permitindo que pesquisadores homeopatas tenham oportunidades para discutir, aprimorar e desenvolver seus projetos (TEIXEIRA, 2008).

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) é uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae* sendo por muito tempo considerada como um habitante comensal da microbiota entérica de

diversas espécies animais, sem grande potencial patogênico. Essa visão mudou progressivamente ao se reconhecerem diversas afecções entéricas e extra-intestinais causadas por *E. coli* de sorotipos específicos e possuindo diversos fatores de virulência característicos (SUSSMANN, 1997).

Em 1944, Kauffman propôs um esquema de classificação sorológica para a *E. coli*, que é usada até hoje, com algumas modificações. De acordo com este modelo, a bactéria é sorotipada com base nos antígenos somático (O), flagelar (H), capsular (K), e pili (F) (NATARO; KAPER, 1998; QUINN et al., 2005).

No homem, o agente está associado a distúrbios intestinais (FRANCO; LANDGRAF, 1996), infecções urinárias, meningites, etc. Depois do advento da biologia molecular e a identificação dos fatores de virulência, entende-se que somente o isolamento de *E. coli* a partir de amostras de conteúdo intestinal, não é o suficiente para o diagnóstico da enfermidade (COSTA, 2006). Progressos realizados nas técnicas de biologia molecular permitiram um enorme avanço para também classificar em diferentes patótipos devido à detecção dos fatores de virulência (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Patótipos tais como EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), STEC (*E. coli* produtora de toxina tipo *Shiga*), EaggEC (*E. coli* enteroagregativa), UPEC (*E. coli* uropatogênica), APEC (*E. coli* patogênica aviária) (FERREIRA; KNÖBL, 2000) foram estudados surgindo novas classificações conforme os vários fatores de virulência descobertos em diferentes espécies animais.

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) ocorre com maior frequência nos meses úmidos, quando a multiplicação da bactéria é mais eficiente (NATARO; KAPER, 1998; TURNER et al., 2006). Foi primeiramente descrita por provocar diarreia em leitões, causando uma infecção letal. Já sua primeira descrição em humanos ocorreu em 1956 em Calcutá, quando pesquisadores injetaram isolados da bactéria oriundos de fezes de crianças com doença semelhante à cólera em alça ileal ligada de coelho. Como resultado, encontrou-se grande quantidade de fluido acumulado na alça, similar a vista com *Vibrio cholerae* (NATARO; KAPER, 1998; QUADRI et al., 2005).

No Brasil, um estudo foi feito entre 1975 e 1989, mostrando a incidência de enterite patogênica por ETEC em crianças com idade entre 1 mês e 5 anos. A proporção da diarreia

foi de 7 a 12%, acontecendo mais frequentemente entre Dezembro e Fevereiro (PACHECO et al., 1997).

O principal reservatório da infecção por ETEC no homem é o próprio homem. A infecção se transmite pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Há indícios da transmissão da bactéria por contato pessoal, em berçários e enfermarias de pediatria (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Os sintomas mais proeminentes da doença são diarreia com câibras abdominais acompanhada de náuseas e dor de cabeça, geralmente com poucos vômitos e febre. Embora a ETEC esteja associada com branda diarreia aquosa, recentes surtos têm-se mostrado mais prolongados (MURRAY et al., 1999). As bactérias aderem superficialmente, não penetrando no epitélio intestinal. Devido a isso, as fezes não apresentam leucócitos, sangue ou muco (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Estima-se que este patógeno seja responsável por 650 milhões de casos por ano em países desenvolvidos, que resulta em 800 mil mortes, principalmente de crianças. Ainda, seu alto nível de morbidade em humanos tem implicações também na pecuária, uma vez que este é o maior patógeno para o gado e leitões (TURNER et al., 2006).

Em um estudo realizado em Bangladesh, a ETEC foi isolada de pacientes com diarreia e em 32% das águas de rios e lagos. Comparando-se as estirpes através da eletroforese em gel de campo pulsátil, observou-se que se tratava exatamente da mesma bactéria. Conclui-se assim que a água é uma importante fonte de infecção da ETEC (QUADRI et al., 2005). Esta estirpe, assim como outras bactérias, possui uma estratégia básica para infecção, que consiste na aderência a célula hospedeira, multiplicação, evasão das defesas e danos ao hospedeiro. Esses danos são mediados por fatores de virulência como os fatores de colonização (CFs) ou uma ou mais enterotoxinas, ambos encontrados em plasmídios (TURNER et al., 2006).

Muitos autores têm relatado a importância da colibacilose no Brasil (BACCARO et al., 2002; KITAKA et al., 2003; SALVADORI et al., 2003; MACÊDO et al., 2007).

Em suínos, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é a mais comumente isolada (VIEGAS, 1986; CALDERARO et al., 2001; KIERS et al., 2002; MICHELON et al., 2003; COSTA et al., 2006), principalmente em animais recém nascidos (VIEGAS, 1986; QUINN et al., 2005). Clinicamente os leitões podem se recusar a mamar, apresentando uma diarreia

aquosa, que conduz rapidamente a desidratação, à fraqueza e até à morte (QUINN et al., 2005).

ETEC coloniza o intestino delgado por meio de adesinas fimbriais e afimbriais, geralmente chamadas fatores de colonização (CFs) ou antígenos coli de superfície. Fatores de colonização (CFs) são estruturas proteináceas de superfície que permitem à bactéria se fixar na mucosa intestinal do hospedeiro. Mais de 20 CFs identificados e caracterizados de forma distinta entre humanos e animais. Para diferenciá-los, os fatores de animais foram designados pela letra F, sendo os mais comuns F4, F5 e F6, também referidos como K88, K99 e 987P (TURNER et al., 2006). A adesão da ETEC ocorre então através das fimbrias (ou pili), que se arranjam ao seu redor e podem ter múltiplas morfologias no mesmo organismo. Elas conferem ainda espécie-especificidade ao patógeno, como as estirpes expressando F5 (K99), que são patogênicas para bezerros, cordeiros e leitões, enquanto outras como F4 (K88) só afetam suínos (NATARO; KAPER, 1998).

Wilson e Francis (1986) e Casey et al. (1992) descreveram cinco diferentes tipos principais de fimbrias: F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 e F41 em isolados de *E. coli* toxigênicas (ETEC) de origem suína. As fimbrias, também consideradas fatores de virulência, permitem a aderência dessas bactérias a receptores específicos localizados na superfície de enterócitos. A partir da aderência, essas bactérias colonizam a superfície celular e lá secretam as toxinas envolvidas no processo de diarreia (MACÊDO et al., 2007).

Há amostras que produzem toxinas termolábeis (LT) e outras termoestáveis (ST). Algumas produzem as duas toxinas (PACHECO et al., 1997). A termoestabilidade é definida pela retenção da atividade tóxica após incubação a 100° C, durante 30 minutos, enquanto a termolabilidade significa que a atividade da toxina é perdida nestas condições (CAMPOS; TRABULSI, 1999; SUSSMAN, 1997).

Ambas toxinas são causas importantes de diarreia em países em desenvolvimento, constituindo portanto, zoonoses, principalmente entre crianças e diarreia dos viajantes (MURRAY et al., 1999).

LT-I é produzida por amostras associadas ao homem, enquanto a LT-II tem sido encontrada em amostras isoladas de alimentos e de certos animais, como os suínos (CAMPOS; TRABULSI, 1999; NAGY; FEKETE, 1999).

A enterotoxina LT-I é uma proteína imunogênica de, aproximadamente 80 KDa cuja sequência de aminoácidos compartilha um grau de homologia com a toxina colérica (CT) (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Tais toxinas apresentam cinco subunidades B e uma subunidade A. A subunidade B da LT - I interage com o receptor celular como a toxina colérica (G M1). Durante a infecção intestinal a toxina sai da célula bacteriana para a mucosa intestinal, devido à presença de sais biliares e tripsina presentes no suco entérico e baixa concentração de ferro (SAYLERS; WHITT, 1994; CAMPOS; TRABULSI, 1999). A toxina se fixa ao receptor (G M1) através de sua subunidade B, ocorrendo a entrada da subunidade A, na célula. Esta é clivada em A1 e A2. A subunidade A1 reage com o NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), ativando a adenilciclase que transforma ATP em AMP cíclico. Com o aumento do AMP cíclico e sua constante produção, acontece uma menor absorção de sódio pelas microvilosidades e maior excreção de cloro e bicarbonato pelas criptas intestinais, com acúmulo de líquido na luz intestinal e diarreia. A subunidade A2 tem seu mecanismo, ainda desconhecido. A toxina LT-II possui os mesmos mecanismos de ação e estrutura molecular que a LT-I (CAMPOS; TRABULSI, 1999). A LT-I foi isolada de *E. coli* que acometia humanos e suínos, já a LT-II foi isolada de bovinos, búfalos, humanos e alimentos (HIRSH, 2003). A produção de LT-I não ocorre em estirpes bovinas (BLANCO et al., 1993). LT também afeta a síntese de prostaglandinas e leucotrienos que estimulam o transporte de eletrólitos e podem contribuir para o desequilíbrio de íons. Além disso, LT também tem efeitos sobre o sistema nervoso entérico, que controla a motilidade intestinal e a secreção de íons, e estimula a produção de citocinas pelas células intestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Hirsh (2003) relata que estirpes que produzem somente ST são as mais comuns, seguidas por aquelas que secretam tanto ST como LT e depois por aquelas que secretam somente LT. Uma pesquisa mostrou que mais de 50% das cepas ETEC isoladas de suínos com diarreia nos Estados Unidos entre 1999 e 2001 possuía genes para a expressão de F4 (K88), LT, e STB (FRANCIS, 2002).

STa e STb são toxinas que apresentam tamanho menor (2 KDa), o que explica sua termoestabilidade (CAMPOS; TRABULSI, 1999), e mantém assim sua ação tóxica mesmo depois de submetida a temperatura de 100⁰C por 30 minutos (NATARO; KAPER, 1998). Tais toxinas pertencem a dois subgrupos: metanol solúveis (STa) e metanol insolúveis (STb) (SAYLERS; WHITT, 1994). STa causa, com a fixação da bactéria na membrana celular, um

aumento do GMP cíclico (através da ativação da guanilato ciclase) no citoplasma da célula do hospedeiro. Tal aumento determina alterações no metabolismo celular, inclusive com relação à atividade das bombas iônicas. O aumento do GMP cíclico leva às mesmas perdas de fluidos causadas pelo descontrole do AMP cíclico (SAYLERS; WHITT, 1994; CAMPOS; TRABULSI, 1999). STb parece atuar por um mecanismo diferente de STa devido a uma sequência diferente de aminoácidos. STb causa danos teciduais no epitélio do intestino, como perda das vilosidades intestinais (NATARO; KAPER, 1998), estimula a secreção de bicarbonato pelas células do intestino, e não de cloreto como a STa (SEARS; KAPER, 1996), e aumenta os níveis de cálcio intracelular (DREYFUS et al., 1993). A STb está associada com estirpes de ETEC isoladas de suínos, raramente é encontrada em isolados de humanos (LORTIE; DUBREUIL; HAREL, 1991). Não obstante, o papel da STa é bem estabelecida em doença humana (SAYLERS; WHITT, 1994).

Os genes para LT-I e STa são codificados em plasmídios, sendo denominados *ent*, que, geralmente carregam os genes para CFA (fatores de colonização) juntamente com os genes das toxinas (SAYLERS; WHITT, 1994). As enterotoxinas humanas produzidas por estirpes de ETEC, são similares às amostras de animais, que também são determinadas por plasmídios. Os fatores de colonização ou de adesão, no entanto, são diferentes antigenicamente daquelas linhagens encontradas em suíno e bezerro (ORSKOV; ORSKOV, 1992). A maioria dos surtos ocorridos nos EUA têm sido causados por amostras que produzem ST ou ST combinada com LT (MURRAY et al., 1999).

LT-I pode ser demonstrada em cultura de tecidos, aglutinação de hemácias, precipitação em gel, ELISA. STa pode ser pesquisada por inoculação em camundongos recém nascidos com sobrenadantes das culturas (Teste de Dean). Atualmente pode-se pesquisar os genes que codificam para as toxinas LT-I, STa e STb por meio de sondas genéticas ou de Reação em cadeia da polimerase (PCR) (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Geralmente as ETEC são identificadas durante investigações de surtos (MURRAY et al., 1999).

Nos últimos anos a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga-like (STEC) e um subgrupo a *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) tem se destacado como causa de colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) no homem (STELLA, 2009). A morbidade e mortalidade associadas aos vários surtos de doenças gastrointestinais causados

por STEC têm alertado sobre a importância desses microrganismos à saúde pública (PATON; PATON, 1998).

As STEC isoladas de animais saudáveis constituem um grupo muito heterogêneo de *E. coli*, e um grande número dessas linhagens parecem ser específicas de seus hospedeiros (BEUTIN, 1995). Os hospedeiros naturais das STEC são animais silvestres e domésticos principalmente os bovinos (GRIFFIN; TAUXE, 1991). As *E. coli* produtoras de toxina shiga-like podem estar presente na flora fecal de uma grande variedade de animais incluindo além dos bovinos, os ovinos, caprinos, suínos, felinos, cães e galinhas (BEUTIN, 1993). *E. coli* shigatoxigênica pode também se disseminar do ambiente da fazenda leiteira e infectar o homem pelo contato com os animais (CRUMP et al., 2002). As STEC tiveram altas taxas de prevalência em fazendas leiteiras americanas, e também ampla distribuição no ambiente das propriedades (ZHAO et al., 1995). Além disso, o ambiente contaminado de fazendas leiteiras pode persistir como fonte de infecção por STEC por vários meses (HUSSEIN; SAKUMA, 2005). *E. coli* é amplamente carregada por mamíferos e aves, pode ser detectada na água de consumo e de recreação contaminadas por material fecal, eliminado por humanos, animais domésticos ou silvestres (LEUNG et al., 2004).

As STEC são definidas pela produção de um ou mais tipos de toxina shiga-like (Stx1, Stx2 ou variantes de Stx2), estas toxinas são antigenicamente relacionadas com a citotoxina (toxina shiga) produzida pela *Shigella dysenteriae* do tipo 1 e são também chamadas de Verocitotoxinas (Vtx) (AGBODAZE et al., 1999; DOUGHARI et al., 2009). Stx pertence a uma subfamília definida de proteínas, o RNA-N glicosidases que podem ser classificados em dois grupos antigênicos: um de toxina Shiga (Stx1) ou verocitotoxina 1 (Vtx1) e toxina Shiga 2 (Stx2) ou verocitotoxina 2 (Vtx2). Stx1 é um grupo bastante homólogo, com três variantes (stx1, stx1c e stx1d). O grupo mais heterogêneo é o Stx2 e compreende vários subtipos (Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g e Stx2d) (CAPRIOLI et al., 2005; DOUGHARI, 2009).

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Avaliar a eficácia de tratamento profilático para diarreia suína utilizando medicamento homeopático, bioterápico de *Escherichia coli* e ambos associados comparados ao controle e verificar a presença de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli*.

Procurar evidências experimentais que possam indicar a utilização do bioterápico de *Escherichia coli* (*Colibacillum*).

Avaliar a diferença no ganho de peso dos leitões nos grupos e se este ganho é maior com produtos menos tóxicos.

Avaliar o custo dos diferentes tratamentos dos grupos estudados.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi desenvolvido em granjas comerciais de suínos no Estado de São Paulo e Mato Grosso, avaliou 157 leitões, e realizou 243 coletas de fezes, sendo 47 coletas de fezes na primeira granja (Experimento um), 94 coletas de fezes na segunda granja (Experimento 2) e 102 coletas na terceira granja (Experimento 3). Todos os animais são da linhagem Agrocere-Pic (AGROCERES-PIC, 2010). Os experimentos foram realizados na mesma época do ano para minimizar diferenças ambientais numa mesma granja. Foram isolados 156 colônias de *Escherichia coli* e realizado a pesquisa de Fatores de virulência e enterotoxinas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4.1 Delineamento Experimental

Inicialmente foram feitas coletas de fezes de 4 a 8 leitões com diarreia, de cada granja, visando a pesquisa da presença de *Escherichia coli*. As colônias isoladas foram colocadas em 2 ml de solução salina (Escala 3,0 de Mcfarland) e enviadas a Farmácia para a realização do Bioterápico específico para cada granja (Figura 1).

Figura 1 – Coleta para Bioterápico

4.1.1 Coleta de amostras de fezes de suínos para exame microbiológico

A coleta das fezes foi realizada com o auxílio de “swab” estéril introduzido via retal, depois de 12 dias (fim do tratamento) na primeira granja e ao nascimento dos leitões e depois de 12 dias (fim do tratamento) na segunda e terceira granja. Os “swabs” foram acondicionados em meio de transporte de Stuart (Figura 2) e conduzidos sob refrigeração ao

laboratório onde foram submetidos a exames microbiológicos para pesquisa de *Escherichia coli*.

Figura 2 - Coleta de fezes em swab

Os *swabs* foram inicialmente inoculados em caldo BHI (Brain and heart infusion broth) com incubação a 37°C por 24 horas. As amostras também foram semeadas em ágar MacConkey, com incubação em aerobiose a 37°C com leituras em 24-48 horas. As amostras cultivadas em caldo BHI foram posteriormente semeadas em ágar MacConkey, com incubação destas realizada de forma similar à descrita anteriormente para o cultivo inicial (Figura 3).

As bactérias isoladas foram identificados de acordo com Lennette (1985) e classificados segundo Krieg e Holt (1994) e Murray et al. (1999).

Figura 3 - Esquema de processamento das fezes coletadas de leitões.

4.2 Escolha do medicamento homeopático

A seleção do medicamento homeopático necessita de um critério estabelecido para ser efetuada, há duas etapas a serem realizadas: a repertorização e o estudo da Matéria Médica.

Os animais com diarreia foram submetidos a uma anamnese com levantamento de todas as informações clínicas para melhor escolha do medicamento, a qual foi realizada utilizando-se a seleção dos sintomas que caracterizam a doença segundo o Repertório (RIBEIRO FILHO, 2000; KENT, 2006) e, posteriormente consultando as Matérias Médicas de Hering (1994) e as Matérias Médicas Puras de Hahnemann (1998).

4.2.1 Repertorização

Para a seleção dos medicamentos empregados em cada granja, os sintomas foram modalizados e analisados segundo os repertórios de Ribeiro Filho (2000) e Kent (2006) (Quadros 1, 2 e 3).

Sintomas	Chin	Ars	Phos	Apis	Sec	Crot-t	Olnd	Podo	Verat
Reto, diarreia, em crianças de peito	01	-	-	-	-	-	-	-	02
Reto, involuntária, evacuação	02	02	03	01	03	01	03	-	03
Fezes, aquosas, amarelas	02	01	01	02	01	02	03	03	-
Fezes, finas, líquidas e verdes	02	-	-	02	-	01	-	02	-
Generalidades, fraqueza, por diarreia	03	03	03	02	02	01	03	03	03
Generalidades, emagrecimento, caquexia	02	03	01	-	01	-	-	-	-
Total	11/6	09/4	08/4	07/4	07/4	05/4	09/3	08/3	08/3

Legenda: *Chin*: China Off; *Ars*: Arsenicum album; *Phos*: Phosphorus; *Apis*: Apis mellifica; *Sec*: Secale cornutum; *Crot-t*: Croton tiglium; *Olnd*: Oleander; *Podo*: Podophyllum; *Verat*: Veratrum album. 01: Frequência baixa do sintoma; 02: Frequência média do sintoma; 03: Frequência elevada do sintoma. Total: somatório do total dos pontos que o medicamento apresenta/ número de sinais.

Quadro 1 - Repertorização Experimento 1

Sintomas	Phos	Ars	Olnd	Nat-s	Dulc	Ip	Apis	Bor	Mag-c
Reto, diarreia, em crianças	02	02	01	-	02	03	01	02	02
Fezes, aquosas, amarelas	01	01	03	02	03	01	02	01	-
Fezes, finas, líquida, marrom	02	02	-	02	-	-	-	-	01
Fezes, moles	03	02	02	02	01	01	02	01	01
Generalidades, fraqueza, por diarreia	03	03	03	03	02	02	02	02	01
Total	11/5	10/5	09/4	09/4	08/4	07/4	07/4	06/4	05/4

Legenda: *Phos*: Phosphorus; *Ars*: Arsenicum album; *Olnd*: Oleander; *Nat-s*: Natrum sulphuricum; *Dulc*: Dulcamara; *Ip*: Ipeca; *Apis*: Apis mellifica; *Bor*: Borax; *Mag-c*: Magnesia carbonica. 01: Frequência baixa do sintoma; 02: Frequência média do sintoma; 03: Frequência elevada do sintoma. Total: somatório do total dos pontos que o medicamento apresenta/ número de sinais.

Quadro 2 - Repertorização Experimento 2

Sintomas	<i>Puls</i>	<i>Sulph</i>	<i>Apis</i>	<i>Grat</i>	<i>Calc</i>	<i>Dulc</i>	<i>Phos</i>	<i>Ars</i>	<i>Cham</i>
Reto, diarreia, sem fraqueza	01	02	01	-	01	-	-	-	-
Reto, prurido	03	03	01	01	03	02	03	02	01
Fezes, amarelas, esverdeadas	01	03	01	03	-	02	-	-	-
Fezes, aquosa, amarelas	01	-	02	03	02	03	01	01	01
Fezes, aquosas, verdes	02	01	-	03	-	01	02	01	03
Generalidades, emagrecimento, em crianças	02	02	02	-	03	-	02	03	01
Total	10/6	11/5	07/5	10/4	10/4	08/4	08/4	07/4	06/4

Legenda: *Puls*: *Pulsatilla nigricans*; *Sulph*: *Sulphur*; *Apis*: *Apis mellifica*; *Grat*: *Gratiola officinalis*; *Calc*: *Calcarea carbonica*; *Dulc*: *Dulcamara*; *Phos*: *Phosphorus*; *Ars*: *Arsenicum album*; *Cham*: *Chamomilla*. 01: Frequência baixa do sintoma; 02: Frequência média do sintoma; 03: Frequência elevada do sintoma. Total: somatório do total dos pontos que o medicamento apresenta/ número de sinais.

Quadro 3 - Repertorização Experimento 3

4.2.2 Matéria Médica

A seleção de cada medicamento baseou-se na repertorização e no estudo das matérias médicas (HAHNEMANN, 1998; HERING, 1994)

China officinallis (*Chin*) foi o medicamento escolhido para o Experimento um. É um medicamento de grande importância aos homeopatas por ter sido a primeira substância que Hahnemann testou em si mesmo. A Quina é uma árvore perene que nasce em lugares quentes, da família Rubiaceae. A casca é arrancada e seca para fazer o medicamento (LOCKIE; GEDDES, 2001; SOARES, 2005).

Sintomas importantes para este estudo, descritos nas matérias médicas:

- Sofrimentos causados pela perda de fluídos, tais como, hemorragia, diarreia e etc.
- Fezes amarela, aquosa, involuntária.
- Diarreia vem gradualmente, mais e mais aquoso, pálida, rosada, com emagrecimento rápido.
- Diarréias muito debilitantes.
- Fluxos intestinais, como diarreia.

- Fezes enegrecidas, diarreicas, frequentes.
- Purgação severa.

O medicamento escolhido para o Experimento dois foi o *Phosphorus (Phos)*, sólido incolor ou amarelado, de consistência gordurosa à temperatura ambiente e cristalina a baixas temperaturas, de odor característico, que emite vapores brancos-esverdeados luminosos quando expostos ao ar, melhor observável em ambiente escuro, muito inflamável quando em contato com o ar (SOARES, 2005). Deve ser estocado submerso em água (LOCKIE; GEDDES, 2001; SOARES, 2005).

Sintomas importantes para este estudo, descritos nas matérias médicas:

- Fezes: profusa, aquosa, esguichando como um hidrante, melhor depois de dormir, copiosos, de cor clara, esverdeada, sanguinolenta, com pequenas partículas brancas, com sangue.
- Diarréia crônica indolor de alimento não digerido, com sede de água durante a noite.
- Diarréia frequente, durante o tempo de cólera.
- Diarréia debilitante.
- Grande fadiga, fraqueza, prostrado. Exaustão excessiva.

O medicamento escolhido para o Experimento três foi a *Pulsatilla nigricans (Puls)*, esta planta perene tem uma longa história de uso medicinal (LOCKIE; GEDDES, 2001), seu habitat natural é a Europa, a parte utilizada segundo a literatura homeopática para fazer a medicação são as folhas secas colhidas na floração, planta toda fresca colhida no início da floração, planta inteira recém-florida (SOARES, 2005).

Sintomas importantes para este estudo, descritos nas matérias médicas:

- Fezes: aquosa, às vezes evacuações involuntárias; amarelo-esverdeadas, viscosa, muito variável, como a bile; ofensivas, corrosivas; de muco branco e sangrenta.
- Disenteria em tempos de cólera.
- Descarga de sangue e muco nas fezes; disúria; fezes frequentes de muco.
- Evacuações frequentes de fezes moles misturadas com muco.

Os medicamentos homeopáticos foram manipulados segundo a farmacotécnica homeopática (Farmacopéia Brasileira) pela farmácia, que é certificada pela ANVISA (Agência Nacional de vigilância Sanitária). A Farmacêutica responsável é especialista em

homeopatia e procedeu a manipulação dos medicamentos com etiquetagem dos vidros com códigos conforme os quadros 1, 2 e 3, sendo que os referidos quadros só foram revelados no final do experimento.

Código Farmácia	Medicamentos
Rosa	<i>China officinalis</i> 30 CH
Margarida	Bioterápico 30 CH(<i>Escherichia coli</i>)
Camélia	<i>China officinalis</i> 30 CH + Bioterápico
Controle	Antibiótico (Minoxfel® - Cefotiofur)

Quadro 4 - Códigos dos grupos do Experimento 1

Código Farmácia	Medicamentos
Verde	Bioterápico 30 CH(<i>Escherichia coli</i>)
Azul	<i>Phosphorus</i> 30 CH + Bioterápico
Vermelho	<i>Phosphorus</i> 30 CH
Controle	Antibiótico (Shotapen® L.A. - Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina benzatina, Dihidroestreptomicina)

Quadro 5 - Códigos dos grupos do Experimento 2

Código Farmácia	Medicamentos
Uva	Bioterápico 30 CH(<i>Escherichia coli</i>)
Abacaxi	<i>Pulsatilla</i> 30 CH + Bioterápico
Morango	<i>Pulsatilla</i> 30 CH
Controle	Antibiótico (Fosbac® - Fosfomicina + Frutose 1,6 difosfato)

Quadro 6 - Códigos dos grupos do Experimento 3

4.3 Animais e tratamento

4.3.1 Experimento 1

Foram utilizados 47 leitões recém nascidos divididos em 4 grupos (Figura 5), cada grupo com sua respectiva mãe (primípara), os nascimentos e tratamentos foram simultâneos, e os grupos formados da seguinte forma:

Grupo 1: Controle (utilizado o antimicrobiano usualmente empregado na rotina da granja);

Grupo 2: Medicamento homeopático na potência 30 CH;

Grupo 3: Bioterápico de *E.coli* na potência 30 CH (medicamento feito segundo a farmacotécnica homeopática, a partir de linhagens de *E.coli* coletadas e isoladas de animais com diarreia na granja);

Grupo 4: Medicamento homeopático na potência 30 CH + Bioterápico de *E.coli* na potência 30 CH.

Os medicamentos homeopáticos foram administrados 2 gotas a cada leitão recém nascidos, por 12 dias alternadamente (Figura 4), quando coleta de fezes e pesquisa da ocorrência de *E. coli*.

4.3.2 Experimento dois e três

Os trabalhos foram desenvolvidos em granja comercial de suínos no Estado do Mato Grosso.

Foram utilizados 46 leitões recém nascidos no experimento 2 e 47 leitões no experimento 3 divididos em 4 grupos, como descrito anteriormente (Figura 5).

Figura 4 - Leitão tomando medicamento Homeopático

Os animais foram observados diariamente pela manhã e a tarde para avaliação do número de leitões com diarreias no início e no fim do tratamento. Assim como foram pesados no início do tratamento e ao desmame para avaliação do ganho de peso entre os grupos (Figura 5).

4.3.3 Controle

Por serem granjas comerciais de suínos, não foi permitido pelos proprietários que os animais do grupo controle ficassem sem medicamento, então em cada experimento o grupo tomou o antibiótico usual de cada granja.

- Experimento um: Minoxfel® - Cefotiofur (1ml/leitão, durante 3 dias)
- Experimento dois: Shotapen® L.A. - Benzilopenicilina procaína, Benzilpenicilina benzatina, Dihidroestreptomicina (1ml/leitão, durante 3 dias).
- Experimento três: Fosbac® - Fosfomicina + Frutose 1,6 difosfato (2ml/leitão, durante 5 dias).

Figura 5 – Fluxograma Experimentos 1, 2 e 3

4.4 Estudo da presença de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas do conteúdo intestinal de suínos utilizando a reação em cadeia pela polimerase

A pesquisa de fatores de virulência das estirpes de *E.coli* isoladas das fezes de suínos foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR), no Laboratório de Sanidade suína e Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Foram pesquisados os genes codificadores das enterotoxinas termo-lábil (LT), termo-estáveis (STa e STb), verotoxina VTe2 (Stx2e), além dos genes codificadores das fímbrias F4 (K88), F5 (987P), F6 (K99), F18, F41. Os oligonucleotídeos utilizados e tamanho dos fragmentos amplificados são apresentadas no quadro 3.

4.4.1 Extração do DNA bacteriano

O protocolo para extração de DNA utilizado foi o método de Fervura (NAKAZATO et al., 2001; COSTA et al., 2006), onde as amostras bacterianas foram colhidas e suspensas em 200µl de solução tampão (TE). Todas as amostras de suspensão bacteriana foram fervidas por 10 minutos (ZHANG et al., 2007; FIALHO, 2008; STELLA, 2009), seguido de incubação em gelo por 15 min, centrifugação de 1 minuto e o sobrenadante utilizado (FERREIRA, 2007).

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase

A amplificação dos genes codificadores dos fatores de virulência de *E. coli* foi realizada em três reações multiplex distintas. A primeira reação visa a pesquisa dos genes codificadores de toxina STb, LT e fímbria F4 (K88), a segunda visa a para pesquisa dos genes codificadores das toxinas STa, Stx2e e fímbria F18, e a terceira visa a para pesquisa dos genes codificadores das fímbrias F6 (K99), F5 (987P) e F41.

Para a reação em cadeia pela polimerase foi adicionado à um microtubo 40 pmoles de cada oligo (ZHANG et al., 2007), 2 unidades da enzima Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia), 5µL do tampão da enzima [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 5 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. Para amplificação dos genes pesquisados o termociclador foi programado para 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72° por 5 minutos.

A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo para os fatores mencionados no quadro 7 e um controle negativo.

Primer	Forward primer (5'– 3') / Reverse primer	Tamanho do produto amplificado (pb)
F4 (K88)	tga atg acc tga cca atg gtg gaa cc gcg ttt act ctt tga atc tgt ccg ag	500
F18	tgg cac tgt agg aga tac cat tca gc ggt ttg acc acc ttt cag ttg agc ag	380
F41	tta gca gcg aag atg agt gat ggg gta cta cct gca gaa aca cca gat cc	600
F5 (987P)	gcc agt cta tgc caa gtg gat act tc gtt tgt atc agg att ccc tgt ggt gg	400
F6 (K99)	gcg act acc aat gct tct gcg aat ac gaa cca gac cag tca ata cga gca	250
LT	acg gcg tta cta tcc tgt cta tgt gc ttg gtc tcg gtc aga tat gtg att ct	290
STa	gtc agt caa ctg aat cac ttg act ct cat gga gca cag gca gga tta caa ca	190
STb	gct aca aat gcc tat gca tct aca ca cat gct cca gca gta cca tct cta ac	150
Stx2e	cgg tat cct att ccc agg agt tta cg gtc ttc cgg cgt cat cgt ata aac ag	700

Quadro 7 - “Primers” que serão utilizados na PCR para amplificar fragmentos de diferentes genes para enterotoxinas (LT, STa e STb), F4 (K88), F18, F41, F5 (987P), F6 (K99), F41, Stx2e (ZHANG et al., 2007)

4.4.3 Detecção do produto amplificado

Os produtos de PCR (10µL) misturados a 0,7µL de BlueGreen. ® (LGC Biotecnologia) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, Os fragmentos amplificados foram visualizadas no sistema de fotodocumentação ImageMaster® (Amershan Biosciences) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

Avaliação dos custos de cada leitão por tratamento realizado:

Cálculo de cada tratamento por leitão, segundo fórmula a seguir:

$$(A \times B) \times C = V$$

Onde: A - dose em ml que cada leitão toma por dia

B - duração do tratamento em dias

C - custo por ml do medicamento

V - custo por leitão R\$

4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste exato de Fisher, com nível de significância de 5% (ZAR, 1999), empregando-se o “software” GRAPHPAD INSTAT 1992-98.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

5.1.1 Isolamento *Escherichia coli*:

No experimento um foi realizado coleta de swab retal de 4 animais com diarreia para isolamento de *E. coli* e posteriormente realização do bioterápico, segundo descrito no material e métodos, onde 3 animais apresentaram *E.coli* (com 6 colônias).

Na coleta dos “swabs” ao final do tratamento foram isolados do grupo que tomou *China officinalis* 30 CH, *Escherichia coli* nos 12 animais (13 colônias), no grupo que tomou Bioterápico 30 CH foram isolados em 11 animais dos 12 totais (15 colônias), no grupo que tomou *China officinalis* + *Escherichia coli* 30 CH ao final do tratamento foram coletados apenas 8 animais (4 foram retirados do lote, não foram a óbito, mas pelo contrário, estavam mais desenvolvidos, pelo manejo da granja foram remanejados para outra fêmea) isolado *Escherichia coli* em todos, e finalmente no grupo controle foram isolados 10 *Escherichia coli* dos 11 animais (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da pesquisa de 43 animais, sendo que 41 apresentaram *Escherichia coli*, em um total de 45 colônias isoladas

Grupos	Isolamentos E. coli (E.coli – colônias – Total)
Bioterápico (<i>E. coli</i>) 30 CH	11 – 15 – 12
<i>China officinalis</i> + Bioterápico 30 CH	8 – 8 – 8 (4 retirados)
<i>China officinalis</i> 30 CH	12 - 13 – 12
Controle	10 – 10 – 11

5.1.2 Número de animais com diarreia

Não houve diferença estatística no número de animais com diarreias no início e ao final do tratamento entre os grupos tratados com homeopatia e o controle, mas houve uma diminuição dos animais com diarreia nos grupos que tomaram o medicamento homeopático e o medicamento+Bioterápico (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e sua porcentagem (Teste de Fisher)

<i>Lotes</i>	<i>Dia 1 (%)</i>	<i>Dia 12 (%)</i>
Bioterápico (<i>E. coli</i>) 30 CH	2 (16,6)	5 (41,6)
<i>China officinalis</i> 30 CH + Bioterápico 30 CH	1 (8,3)	0 (0)
<i>China officinalis</i> 30 CH	3 (25,0)	0 (0)
Controle	1 (9,0)	2 (18,1)
Total de leitões	47 (100)	43(100)

5.1.3 Ganho de Peso

No ganho de peso no início do tratamento e ao desmame houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 3). O grupo que tomou *China off* 30 CH apresentou um ganho de peso maior que os outros 3 grupos, resultado este, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), o ganho de peso do grupo que tomou *China off* 30 CH + Bioterápico 30 CH foi maior em relação ao controle (Tabela 3 e Gráfico 1). E finalmente houve menor ganho de peso estatisticamente significativo do grupo que tomou Bioterápico ($p < 0,05$) em comparação ao controle. No grupo *China off* 30 CH + Bioterápico 30 CH foram retirados 4 animais que se encontravam com um desenvolvimento acima dos outros animais do lote, ação esta praticada na rotina da granja pelos funcionários.

Tabela 3 - Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame em gramas, o número de leitões de cada grupo e o ganho de peso do lote

Lotes	Dia1	Dia 24	Ganho de peso
Bioterápico (<i>E. coli</i>) 30 CH	1116 (12)	3627 (12)	2511**
<i>China officinalis</i> 30 CH + Bioterápico 30 CH	1950 (12)	6416 (8)	4466
<i>China officinalis</i> 30 CH	1107 (12)	6100 (12)	4993*
Controle	1600 (11)	6000 (11)	4400
Total de leitões	47	43	

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação aos demais grupos.

** Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação ao Controle.

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação aos demais grupos;

** Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação ao Bioterápico;

Gráfico 1 – Média do ganho de peso dos grupos em gramas

5.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Das amostras que foram utilizadas para fazer o bioterápico apenas uma apresentou um dos fatores de virulência testados, o F41. Não foi encontrada nenhuma enterotoxina das estudadas (Quadro 8).

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
3004 SA	-	-	-	-	-	-	X	-	-
2530 SA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3018 SA	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 8 – Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, para obtenção do bioterápico (Experimento 1).

De acordo com o quadro 9, obteve-se na Análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), no grupo que tomou a *China off* 30 CH, três amostras positivas para Stb, no grupo de *China off* 30 CH + *E.coli* 30 CH obteve-se uma amostra positiva para o F41, também uma no grupo do Bioterápico e duas amostras positiva para o F41 no controle. Então conseguiu-se sete (17 %) amostras positivas para fatores de virulência e enterotoxinas (Gráfico 2).

(Continua)

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
<i>China off</i> 30 CH									
R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2	-	-	X	-	-	-	-	-	-
R3	-	-	X	-	-	-	-	-	-
R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R8	-	-	X	-	-	-	-	-	-
R9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>China off</i> 30 CH + <i>E.coli</i> 30 CH									
CA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 9 – Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli* na coleta (Experimento 1)

(Conclusão)

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
CA5	-	-	-	-	-	-	X	-	-
CA6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 30 CH									
M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M9	-	-	-	-	-	-	X	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle									
CO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO6	-	-	-	-	-	-	X	-	-
CO7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO9	-	-	-	-	--	-	X	-	-
CO10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO11	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 9 – Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli* na coleta (Experimento 1)

Gráfico 2 – Número de leitões positivos e negativos para Fatores de virulência e enterotoxinas

Relação animais com diarreia X Fatores de Virulência e Enterotoxinas:

No experimento um, isolamos *E.coli* em três animais diarreicos para fazer o Bioterápico e apenas um possuía o fator de virulência F41.

Não foi realizada a coleta de fezes no dia 1, portanto não temos como saber se havia algum fator de virulência, mas temos o número de animais com diarreia, o grupo que tomou Bioterápico 30 CH estava com dois animais com diarreia e na segunda coleta (final do tratamento) havia cinco animais com diarreia, e havia um animal com o F41, o grupo que tomou *China off* +Bioterápico 30 CH apresentou um animal com diarreia e ao final nenhum animal com diarreia, e um apresentou fator de virulência F41, o grupo *China off* 30 CH, apresentou três animais com diarreia no início e nenhum ao final, mas apresentou três animais com a enterotoxina Stb, estes animais foram os únicos a apresentar em todo o experimento e por fim o grupo Controle que apresentou um animal com diarreia, ao final dois animais com diarreia, os dois animais possuíam o F41 (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação animais com diarreia e Fatores de Virulência e Enterotoxinas:

Grupos	Diarréia		Coleta com 12 dias	
	dia 1	dia 12	F41	Stb
Bioterápico 30 CH	2	5	1	-
<i>China officinalis</i> + Bioterápico 30 CH	1	0	1	-
<i>China officinalis</i> 30 CH	3	0	-	3
Controle	1	2	2	-

5.2 Experimento 2

5.2.1 Isolamento de *Escherichia coli*:

No experimento dois foi realizada coleta de swab retal de 5 animais com diarreia para isolamento de *Escherichia coli* e posteriormente realização do bioterápico, segundo descrito no material e métodos, onde 3 animais apresentaram *Escherichia coli*.

No isolamento das fezes ao nascimento dos leitões, observou-se no grupo que tomou bioterápico de *Escherichia coli* 30 CH a ausência de *Escherichia coli*, o lote que tomou Phosphorus + *Escherichia coli* 30 CH uma *Escherichia coli* ao nascimento, o lote que tomou Phosphorus 30 CH, observou-se três *Escherichia coli* e o controle cinco *Escherichia coli* (Tabela 5).

Após 12 dias do nascimento e com a medicação, no lote que tomou bioterápico de *Escherichia coli* 30 CH foram isolados *Escherichia coli* em todos os animais, o lote que tomou Phosphorus + *Escherichia coli* 30 CH apresentou *Escherichia coli* em oito amostras, no lote que tomou Phosphorus 30 CH, observou-se *Escherichia coli* em nove das amostras e o controle apresentou *Escherichia coli* em oito das amostras (Tabela 4).

Tabela 5 - Resultados do isolamento, ao início do tratamento e ao final (experimento dois).

Grupos	Dia 1 tratamento (E.coli – colônias – Total)	Dia 12 tratamento (E.coli – colônias – Total)
Bioterápico (<i>E. coli</i>) 30 CH	0 – 0 – 12	12 – 12 – 12
Phosphorus + Bioterápico 30 CH	1 – 1 – 11	8 – 8 – 11
Phosphorus 30 CH	5 – 5 – 12	9 – 9 – 12
Controle	5 – 5 – 11	8 – 8 – 9

5.2.2 Número de animais com diarreia

Ao primeiro dia do experimento dois no grupo que tomou Bioterápico 30 CH havia cinco (41,6%) animais com diarreia e ao final do tratamento nenhum (0%), no grupo que tomou *Phosphorus* 30 CH + Bioterápico 30 CH havia nove (81,8%) animais com diarreia e ao final nenhum (0%), no grupo *Phosphorus* 30 CH havia nove (91,6%) de animais com diarreia e ao final nenhum (0%) e no grupo Controle havia seis (54,5%) animais com diarreia e ao final quatro (44,4%). Entre os grupos que tomaram os medicamentos homeopáticos não houve diferença estatística ao final do tratamento e o grupo controle apresentou um número maior de diarreias estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 6). O grupo controle perdeu dois animais que vieram a óbito.

Tabela 6 - Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e suas porcentagens e número total de animais do grupo (experimento dois)

Lotes	Dia 1 (%)	Dia 12 (%)
Bioterápico (<i>E. coli</i>) 30 CH	5 (41,6)	0 (0)
Phosphorus + Bioterápico 30 CH	9 (81,8)	0 (0)
Phosphorus 30 CH	11 (91,6)	0 (0)
Controle	6 (54,5)	4 (44,4)*
Total de animais	46 (100)	44(100)

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação aos demais grupos

5.2.3 Ganho de Peso

Quanto ao ganho de peso, o grupo que tomou *Phosphorus* 30 CH + Bioterápico 30 CH foi o que ganhou mais peso, resultado este estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparado a todos os grupos, seguido do grupo que tomou apenas Bioterápico 30 CH que foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em comparação ao grupo que tomou *Phosphorus* 30 CH e para o controle), e o grupo que tomou o medicamento e o controle foram os que obtiveram menor ganho de peso, sendo o medicamento ainda superior ao controle, não havendo diferença estatística entre eles (Tabela 7 e Gráfico 3). Antes do desmame um animal do grupo Bioterápico 30 CH veio a óbito.

Tabela 7 - Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame (em gramas), o número de leitões de cada grupo e o ganho de peso do lote (granja 2)

<i>Lotes</i>	<i>Dia 1 (n. leitões)</i>	<i>Dia 24(n. leitões)</i>	Ganho de peso
Bioterápico (<i>E.coli</i>) 30 CH	1717 (12)	6455 (11)	4738**
<i>Phosphorus</i> + Bioterápico 30 CH	1200 (11)	6090 (11)	4890*
<i>Phosphorus</i> 30 CH	1917(12)	6090(12)	4173
Controle	1618 (11)	5444(09)	3826
Total de animais	46	43	

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação aos demais grupos;

** Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação ao *Phosphorus* 30 CH e ao Controle.

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação aos demais grupos;

** Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação ao *Phosphorus* 30 CH e ao Controle.

Gráfico 3 – Média do ganho de peso dos grupos em gramas

5.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Das amostras que foram utilizadas para fazer o bioterápico nenhuma apresentou fatores de virulência e enterotoxinas das que foram estudadas (Quadro 10).

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 10 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, para obtenção do bioterápico (Experimento 2)

Na primeira coleta do experimento dois, obteve-se na Análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), apenas um (11,1%) fator de virulência, o F41, no grupo controle (Quadro 11).

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
<i>Phosphorus</i> 30 CH									
TVA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVA10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> 30 CH									
<i>Phosphorus</i> + <i>E.coli</i> 30 CH									
TAA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle									
TCA3	-	-	-	-	-	-	X	-	-
TCA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCA6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCA8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCA10	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 11 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, na primeira coleta (Experimento 2)

Na segunda coleta do experimento dois, obteve-se na Análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), no grupo que tomou o *Phosphorus* 30 CH, nenhuma amostra positiva para fatores de virulência e enterotoxinas, no grupo de *E.coli* 30 CH, obteve-se três amostras positivas para o F41, *Phosphorus* 30 CH + *E.coli* 30 CH obteve-se uma amostra positiva para o F41 (Quadro 12). Então conseguiu-se quatro (10,5 %) amostras positivas para fatores de virulência (Gráfico 4).

(Continua)

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
<i>Phosphorus</i> 30 CH									
TVB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVB3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVB5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVB6-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVB6-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 12 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, na segunda coleta (Experimento 2)

(Conclusão)

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
TVB9	-	-		-	-	-	-	-	-
TVB10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> 30 CH									
TVDB1	-	-	-	-	-	-	X	-	-
TVDB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVDB3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVDB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVDB5	-	-	-	-	-	-	X	-	-
TVDB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVDB7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVDB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVDB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVDB10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVDB11	-	-	-	-	-	-	X	-	-
TVDB12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphorus 30 CH + <i>E.coli</i> 30 ch									
TAB1	-	-	-	-	-	-	X	-	-
TAB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAB3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAB5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAB11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle									
TCB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCB3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCB7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 12 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, na segunda coleta (Experimento 2)

Gráfico 4 - Número de leitões positivos e negativos para Fatores de virulência e enterotoxinas (Coleta 1 e 2 – Experimento 2)

Relação animais com diarreia X Fatores de Virulência e Enterotoxinas:

No experimento dois, isolou-se E.coli em três animais diarreicos para fazer o Bioterápico e nenhum possuía o fator de virulência F41.

Na primeira coleta apenas um animal do grupo controle apresentou fator de virulência F41, havia seis animais com diarreia e na segunda coleta havia quatro animais com diarreia e nenhum fator de virulência, o grupo que tomou Bioterápico 30 CH estava com cinco animais com diarreia e na segunda coleta (final do tratamento) não havia nenhum animal com diarreia, mas havia três animais com o F41, o grupo que tomou *Phosphorus*+Bioterápico 30 CH apresentou nove animais com diarreia e ao final nenhum animal com diarreia, mas apresentou um animal com fator de virulência F41, o grupo *Phosphorus* 30 CH, apresentou onze animais com diarreia no início e nenhum ao final, sem fatores de virulência (Tabela 8).

Tabela 8 - Relação animais com diarreia e Fatores de Virulência e Enterotoxinas:

<i>Grupos</i>	<i>Coleta 1</i>			<i>Coleta 2</i>		
	Diarréia	F41	Stb	Diarréia	F41	Stb
Bioterápico 30 CH	5	-	-	0	3	-
<i>Phosphorus</i> + Bioterápico 30 CH	9	-	-	0	1	-
<i>Phosphorus</i> 30 CH	11	-	-	0	-	-
Controle	6	1	-	4	-	-

5.3 Experimento 3

5.3.1 Isolamento de *Escherichia coli*

No experimento três foi realizada coleta de “swab” retal de 8 animais com diarreia para isolamento de *Escherichia coli* e posteriormente realização do bioterápico, segundo descrito no material e métodos, onde 7 animais apresentaram *Escherichia coli*.

No isolamento das fezes ao nascimento dos leitões no Experimento três, observou-se no grupo que tomou bioterápico de *Escherichia coli* 30 CH dois animais com *Escherichia coli*, o grupo que tomou *Pulsatilla* + *Escherichia coli* 30 CH quatro animais com *Escherichia coli* ao nascimento, o grupo que tomou *Pulsatilla* 30 CH, observou-se seis animais com *Escherichia coli* e finalmente o grupo controle com quatro animais (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados do isolamento, ao nascimento (início do tratamento) dos animais, e ao final (experimento 3)

<i>Grupos</i>	<i>Dia 1 tratamento</i>	<i>Dia 12 tratamento</i>
	(<i>E.coli</i> – colônias – Total)	(<i>E.coli</i> – colônias – Total)
Bioterápico (<i>E.coli</i>) 30 CH	2 – 2 - 12	10 – 10 - 12
<i>Pulsatilla</i> + Bioterápico 30 CH	4 – 4 - 11	7 – 7 - 11
<i>Pulsatilla</i> 30 CH	6 – 6 - 12	9 – 9 - 12
Controle	4 – 4 - 12	9 – 9 - 12

Após 12 dias do nascimento e com a medicação, no grupo que tomou bioterápico de *Escherichia coli* 30 CH foram isolados *Escherichia coli* em dez dos animais, o grupo que tomou *Pulsatilla* + *Escherichia coli* 30 CH apresentou *Escherichia coli* em sete amostras, no grupo que tomou *Pulsatilla* 30 CH, observou-se *Escherichia coli* em nove das amostras e o controle apresentou *Escherichia coli* também em nove das amostras (Tabela 7).

5.3.2 Número de animais com diarreia

Referente ao número de animais com diarreia, no grupo que tomou Bioterápico 30 CH (*Escherichia coli*) haviam quatro (33,3%) animais com diarreia e ao final do tratamento nenhum animal, no grupo que tomou *Pulsatilla* 30 CH + Bioterápico 30 CH havia seis animais (54,5%) com diarreia e permaneceu o mesmo número ao término do experimento, houve mais diarreia ao final do tratamento de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao Bioterápico e em relação ao controle, já que o controle iniciou o tratamento com quatro (33,3) animais e terminou o experimento com nenhum e finalmente o grupo que tomou *Pulsatilla* 30 CH iniciou com sete e terminou o experimento com dois (16,6%) (Tabela 10).

Tabela 10 - Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e suas porcentagens e número total de animais (Experimento 3)

<i>Lotes</i>	<i>Dia 1 (%)</i>	<i>Dia 12 (%)</i>
Bioterápico (<i>E.coli</i>) 30 CH	4 (33,3)	0 (0)
<i>Pulsatilla</i> + Bioterápico 30 CH	6 (54,5)	6 (54,5)*
<i>Pulsatilla</i> 30 CH	7 (58,3)	2 (16,6)
Controle	4 (33,3)	0 (0)
Total de animais	47	47

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação ao Bioterápico e ao Controle

5.3.3 Ganho de Peso

Obteve-se um maior ganho de peso no grupo que tomou o medicamento *Pulsatilla* 30 CH (4.889g), em seguida o grupo Bioterápico 30 CH (*Escherichia coli*) (4.667g), posteriormente o grupo *Pulsatilla* 30 CH + Bioterápico 30 CH (4.527g) e por último o grupo controle (4.205g), embora haja uma diferença entre os grupos, ela não foi estatisticamente significativa (Tabela 11 e Gráfico 5). Antes do desmame houve um óbito em cada grupo do experimento e dois animais foram retirados do grupo *Pulsatilla* 30 CH e um do Bioterápico 30 CH com a alegação da granja que eles estavam com desenvolvimento superior ao lote.

Tabela 11 - Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame (em gramas), o número de leitões de cada grupo e o ganho de peso do lote (Experimento três)

<i>Lotes</i>	<i>Dia 0 (n leitões)</i>	<i>Dia 24 (n leitões)</i>	<i>Ganho de peso (desmame)</i>
Bioterápico (<i>E.coli</i>) 30 CH	1333 (12)	6000 (10)	4667
<i>Pulsatilla</i> + Bioterápico 30 CH	1273 (11)	5800 (10)	4527
<i>Pulsatilla</i> 30 CH	1333 (12)	6222 (9)	4889
Controle	1250 (12)	5455 (11)	4205
Total de animais	47	40

Gráfico 5 - Média do ganho de peso dos grupos em gramas

5.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Das amostras que foram utilizadas para fazer o bioterápico, uma apresentou o fator de virulência F41 (Quadro 13).

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
1T+	-	-	-	-	-	-	X	-	-
2T+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2T+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3T+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4T+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5T+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6T+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7T+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 13 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, para obtenção do bioterápico (Experimento 3)

Na primeira coleta do experimento três, nas amostras com *Escherichia coli*, não obteve-se na Análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), fator de virulência e enterotoxina (Quadro 14).

(Continua)									
Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
<i>Pulsatilla</i> 30 CH									
TMA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMA6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMA7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMA10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMA12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> 30 CH									
TUA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> 30 CH + <i>Puls</i> 30 CH									

Quadro 14 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, na primeira coleta (Experimento três)

(Conclusão)

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
TAbaA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAbaA6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAbaA8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAbaA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle									
T9CA5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CA7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CA12	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 14 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, na primeira coleta (Experimento 3)

Na segunda coleta do experimento três, nas amostras com *Escherichia coli*, obteve-se na Análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), no grupo que tomou a *Pulsatilla* 30 CH, três amostras positivas para F41, e uma amostra positiva para o F41 nos demais grupos. Então conseguiu-se cinco (14,3 %) amostras positivas para fatores de virulência e enterotoxinas (Quadro 15 e Gráfico 6).

(Continua)

Amostra	K88	LT	Stb	F18	Sta	Stx2e (Vte)	F41	987p	K99
<i>Pulsatilla</i> 30 CH									
TMB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMB3	-	-	-	-	-	-	X	-	-
TMB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMB7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMB10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> 30 CH									
TUB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUB4	-	-	-	-	-	-	X	-	-
TUB5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 15 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, na segunda coleta (Experimento 3)

(Conclusão)

TUB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUB10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUB11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TUB12	-	-	-	-	-	-	X	-	-
E.coli 30 CH + Puls 30 CH									
TAAb1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAAb3	-	-	-	-	-	-	X	-	-
TAAb5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAAb6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAAb8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAAb10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAAb11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle									
T9CB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CB5	-	-	-	-	-	-	X	-	-
T9CB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CB7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9CB10	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 15 - Presença dos fatores de virulência e enterotoxinas ao estudo da PCR, analisados nas amostras positivas para *Escherichia coli*, na segunda coleta (Experimento 3)

Gráfico 6 - Número de leitões positivos e negativos para Fatores de virulência e enterotoxinas (Coleta 1 e 2 – Experimento três)

Relação de animais com diarreia X Fatores de Virulência e Enterotoxinas:

No experimento três, isolou-se *E.coli* em oito animais diarreicos e somente um possuía o fator de virulência F41.

Na primeira coleta nenhum grupo apresentou fator de virulência embora apresentassem diarreia, o grupo que tomou Bioterápico 30 CH estava com quatro animais com diarreia e na segunda coleta (final do tratamento não tinha nenhum animal com diarreia, mas havia dois animais com o F41, o grupo que tomou *Pulsatilla*+Bioterápico 30 CH apresentou seis animais com diarreia e ao final manteve o número de animais com diarreia, mas apenas um apresentou fator de virulência F41, o grupo *Pulsatilla* 30 CH, apresentou sete animais com diarreia no início e apenas dois no final com um animal com F41, e por fim o grupo Controle que apresentou quatro animais com diarreia, ao final não havia nenhum com diarreia, mas havia um animal com F41 (Tabela 12).

Tabela 12 - Relação animais com diarreia e Fatores de Virulência e Enterotoxinas:

<i>Grupos</i>	<i>Coleta 1</i>			<i>Coleta 2</i>		
	Diarreia	F41	Stb	Diarreia	F41	Stb
Bioterápico 30 CH	4	-	-	0	2	-
<i>Pulsatilla</i> + Bioterápico 30 CH	6	-	-	6	1	-
<i>Pulsatilla</i> 30 CH	7	-	-	2	1	-
Controle	4	-	-	0	1	-

5.4 Resultados referentes ao cruzamento das 3 granjas

5.4.1 Número de animais com diarreia

O grupo que tomou Medicamento 30 CH ao início do tratamento apresentou vinte um (58,3%) animais com diarreia e ao final dois (5,5%) animais, uma diferença estatisticamente

significante ($p < 0,05$), o grupo Medicamento + Bioterápico 30 CH também apresentou significância ($p < 0,05$), pois apresentou dezesseis (47,0%) animais com diarreia no início e seis (20,0%) animais ao final, já os demais grupos embora apresentassem diferença não houve significância. O grupo que tomou Bioterápico apresentou no início do tratamento onze (30,5%) animais com diarreia e ao final cinco (13,8%) animais e o controle apresentou onze (32,3%) no início e seis (18,7%) ao final do tratamento. (Tabela 13 e Gráfico 7).

Tabela 13 - Número de animais com diarreia no início do tratamento e ao final e porcentagem de diarreia de cada lote das 3 granjas.

<i>Lotes</i>	<i>Dia 1 (%)</i>	Dia 12 (%)
Bioterápico (<i>E.coli</i>) 30 CH	11 (30,5%)	5 (13,8%)
Medicamento + Bioterápico 30 CH	16 (47,0%)	6 (20,0%)*
Medicamento 30 CH	21(58,3%)	2 (5,5%)*
Controle	11 (32,3%)	6 (18,7%)

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação ao dia 1 de tratamento

Gráfico 7 - Ocorrência de animais com diarreia no início e ao final do tratamento

5.4.2 Ganho de Peso

Na média do ganho de peso das 3 granjas somadas, o grupo com maior ganho de peso foi o Medicamento 30 CH, com uma média de peso de 4.685g, estatisticamente significante em relação ao Bioterápico 30 CH ($p < 0,05$) com 3.972g e ao Controle ($p < 0,05$) com 4.144g, seguido do grupo que tomou Medicamento + Bioterápico 30 CH, com 4.628g, que também foi estatisticamente significante em relação ao Bioterápico 30 CH ($p < 0,05$) e ao Controle (Tabela 14 e Gráfico 8).

Tabela 14 - Média do peso do lote ao início do tratamento e ao desmame em gramas

<i>Lotes</i>	<i>Dia 1 (n. leitões)</i>	<i>Dia 24 (n. leitões)</i>	Ganho de peso
Bioterápico (<i>E.coli</i>) 30CH	1389(36)	5361(33)	3972
Medicamento + Bioterápico 30 CH	1474(34)	6102(29)	4628*
Medicamento 30 CH	1452(36)	6137(33)	4685*
Controle	1489 (34)	5633(31)	4144

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação ao bioterápico e em relação ao controle

* Teste de Fischer, $p < 0,05$, em relação ao Bioterápico e ao controle

Gráfico 8 - Média do ganho de peso das 3 granjas em gramas

5.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Em todo o experimento obteve-se dezenove (12 %) de animais com Fatores de Virulência e Enterotoxinas (Gráfico 9).

Foram encontrados três (1,9%) animais com a enterotoxina Stb (Figura 7) e dezesseis (10,4%) animais com o Fator de Virulência F41 (Figura 6 e Gráfico 10).

Gráfico 9 – Animais com Fatores de Virulência e Enterotoxinas em todos os Experimentos

Gráfico 10 – Número de animais positivos por Fatores de Virulência e Enterotoxinas.

Figura 6 – Foto PCR de amostras com fator de virulência F41

Figura 7 - Foto PCR de amostras com enterotoxina Stb

É importante ressaltar a diferença dos custos de cada tratamento por leitão, depois de realizar os cálculos explicados no material e método, chegou-se aos resultados da tabela 15, onde o tratamento de menor custo foi o do grupo do medicamento homeopático e o Bioterápico isoladamente, R\$ 0,16 por leitão, e o de maior custo o do grupo que tomou Minoxfel® R\$ 2,34 por leitão.

Tabela 15 – Custo por leitão de cada tratamento

Grupos	Custo tratamento por leitão (R\$)
Bioterápico (<i>E.coli</i>) 30 CH	0,16
Bioterápico+Medicamento 30 CH	0,24
Medicamento 30 CH	0,16
Minoxfel®	2,34
Shotapen® L.A.	1,38
Fosbac®	0,30

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A criação intensiva de suínos criou problemas até então inexistentes, como uma alta taxa de reposição e, dessa forma, gerou a necessidade de incorporar periodicamente ao plantel um grande número de matrizes. Taxas de reposição anual em torno de 40% a 60% são comuns nos rebanhos de todo o mundo. A introdução frequente de animais nas granjas representa um risco muito grande à área sanitária, pela possibilidade de que sejam portadores ou estejam em período de incubação de doenças infecciosas ausentes no rebanho de destino (BARCELLOS, 2007).

Na espécie suína, *E. coli* é um dos agentes que apresenta alta capacidade para desenvolver resistência, destacando-se dentre as diversas amostras as *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), como causa da diarreia neonatal (BACCARO et al., 2002). As causas de diarreia em leitões são multifatoriais e a simples presença de enteropatógenos, nem sempre é suficiente para o desenvolvimento da doença. A morbidade e a mortalidade dependem da virulência do agente, da resistência do hospedeiro e da presença de fatores de risco, tais como a temperatura ambiente, higiene inadequada das instalações e dificuldade de acesso ao colostro e ao leite (CALDERARO et al., 2001).

Nos três experimentos como um todo neste estudo, observou-se que dois grupos se sobressaíram aos demais, que foram os grupos que tomaram os Medicamentos e os que tomaram Medicamento+Bioterápico. Quanto aos animais com diarreia houve no início do tratamento do grupo Medicamento 58,3% dos animais e ao final 5,5%, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e o grupo Medicamento+Bioterápico no início tinha 47% de animais com diarreia e ao final do tratamento 20% dos animais com diarreia, demonstrando que os medicamentos homeopáticos foram efetivos para o tratamento desta enfermidade. Camerlink et al. (2010), realizou experimento em cego, medicando as porcas durante um mês antes da parição com Bioterápico de *E. coli* 30 K e depois pesquisou a diarreia dos leitões nascidos e os resultados mostraram que o grupo placebo enfrentou seis vezes mais diarreia que o grupo de tratamento homeopático ($P < 0,0001$). Estes autores verificaram que os leitões do grupo tratado com homeopatia pareciam estar mais protegidos, pois quando a diarreia ocorria dentro da ninhada, a doença não se propagava, enquanto que os leitões do grupo placebo rapidamente eram infectados entre si.

No presente estudo o grupo que tomou somente o Bioterápico (*E.coli*) obteve uma melhora nos resultados entre o início do tratamento, onde havia 30,5% dos animais com diarreia e o final 13,8%, embora esta melhora não tenha sido estatisticamente significativa. Muitos trabalhos com homeopatia foram realizados com Bioterápicos (BONAMIN, et al., 2001; RUIZ-VEGA, et al., 2005; SAINTE-LAUDY; BELON, 2005; VELKERS et al., 2005; FONTES et al., 2005; BERCHIERI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008; SOTO et al., 2009). Há referências na literatura que apontam para a eficiência dos bioterápicos, como Berchieri et al. (2006) que mostraram que bioterápicos preparados a partir de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis fornecidas na água potável de 180 frangos foi eficiente para diminuir o cultivo de bactérias coletadas em “swabs” cloacais.

Velkers et al. (2005) realizaram um estudo com frangos e procuraram determinar a eficácia de isopáticos e medicamentos homeopáticos, no tratamento de colibacilose em frangos de corte. Três grupos de frangos de corte, infectados de forma intra traqueal com *E. coli* (O78: K80), foram tratados com diferentes combinações de remédios homeopáticos (três combinações foram dadas, grupo um recebeu *Carbo vegetabilis* 200 CH, *Arsenicum album* 30 CH, *Eriodictyon* 30 CH, *Pulsatilla* 30 CH, outro foi tratado com *Carbo vegetabilis* 200 CH, *Gelsemium* 30 CH, *Phosphorus* 30 CH, *Ipecacuanha* 30 CH e o terceiro tratado com *Carbo vegetabilis* 200 CH, *Antimonium tartaricum* 30 CH, *Ferrum Phosphoricum* 30 CH e *Natrum muriaticum* 30 CH). Um grupo controle e um grupo infectado tratados com doxiciclina foram incluídos. A eficácia do tratamento foi avaliada com base nos parâmetros de mortalidade, ganho de peso e lesões de colibacilose. A doxiciclina impediu a mortalidade e reduziu as lesões. Nenhum dos grupos tratados com homeopatia diferiram significativamente em relação a qualquer dos parâmetros do grupo controle infectado. No presente estudo não houve associação de medicamentos homeopáticos e o resultado foi superior ao tratado com medicamento alopático ($p < 0,05$).

Bonamin et al. (2001), mostraram que a injeção simultânea de potências altas de dexametasona (15CH) inibiam a ação do tratamento farmacológico de doses de dexametasona in vivo, tanto no processo inflamatório (edema de pata) quanto na migração de células polimorfonucleares e nenhum efeito foi observado nas células tumorais inoculadas, já que o experimento utilizou como modelo experimental: inflamação aguda induzida pela carragenina, tumor de Ehrlich ascítico.

Soto et al. (2009) utilizaram bioterápicos e medicamentos homeopáticos, com o objetivo de avaliar o uso do bioterápico de *Erysipelothrix rhusiopathiae* e medicamento homeopático (*Belladonna* 6 CH, *Rhus toxicodendron* 6 CH). A Erisipela suína (ES) é outra enfermidade encontrada em granjas e considerada como uma zoonose, os medicamentos foram misturados nas rações reprodutivas de forma contínua para a prevenção da ES, comparado com a utilização de antibióticos a base de oxitetraciclina misturado à ração e vacinação com bacterina em uma granja comercial de suínos. O período de avaliação foi de janeiro de 2002 a dezembro de 2007, e este foi dividido em duas fases iguais de três anos cada. Na primeira etapa utilizou-se somente a medicação alopática e imunoprofilaxia para a ES com o uso de bacterina comercial. Na segunda fase a utilização de antibióticos e bacterinas foi eliminada e implantou-se a profilaxia com o uso exclusivo de medicação homeopática. Na primeira fase do estudo vieram a óbito 45 fêmeas; na segunda fase ocorreram 19 mortes, representando uma redução significativa de 57,7% ($p = 0,04$). Também, com o uso do medicamento homeopático mais o bioterápico houve redução significativa ($p=0,01$) da natimortalidade e do número de abortos em fêmeas reprodutoras quando comparada com a profilaxia alopática convencional.

Há relato de infecção de camundongos com *Trypanosoma cruzi*, parasita que causa a doença de Chagas em seres humanos e um tratamento com uma preparação de isopático do mesmo parasita (*T. cruzi* 12d) ou com *Phosphorus* 12d, escolhido por repertorização dos sintomas de infecção por *T. cruzi*. Neste estudo, as diferenças biológicas entre reações desencadeadas pelos dois tratamentos, evidenciaram que cada um envolve um mecanismo diferente. Isopáticos como um pré-tratamento reduziram o período de parasitemia patente, aumento da contagem de linfócitos no sangue, e redução da taxa de mortalidade. Mas o pós-tratamento com *Phosphorus* foi associado com um período de parasitemia patente, parasitemia máxima mais elevada, a redução significativa do número de linfócitos, mas sem óbitos. O controle da infecção teve a maior taxa de mortalidade (ALMEIDA et al., 2008).

Fontes et al. (2005) utilizaram modelo adequado aos estudos tecnicamente aceitos na farmacologia convencional para verificar ações de medicamentos preparados de acordo com a farmacotécnica homeopática brasileira e comparar seus resultados terapêuticos com um medicamento alopático nas infecções urinárias por *Escherichia coli* (*E. coli*). Foram utilizados medicamentos homeopáticos (*Cantharis vesicatoria* nas potências 6CH e 30CH), Bioterápicos (Urina 30CH, *Escherichia coli* 30CH e *Colibacillum* 30CH) e alopático (ácido

nalidíxico), administrados por via oral. Fêmeas da raça Wistar foram contaminadas, com auxílio de uma sonda uretral, com uma suspensão de *E.coli*. A urina foi colhida assepticamente e submetida a exame microbiológico para constatação da infecção. Os animais contaminados foram divididos em sete grupos, sendo um deles o grupo controle. Cada grupo recebeu um medicamento diferente. Após o tratamento, a urina foi assepticamente colhida e submetida a exame microbiológico para constatação da infecção. Os animais foram tratados por via oral. Para a verificação da ação protetora dos medicamentos, estes animais foram tratados previamente por cinco dias. Em seguida, as ratas foram contaminadas com suspensão de cepas conhecidas de *E. coli*. A urina foi colhida assepticamente com auxílio de sonda uretral e submetida a exame microbiológico para constatação da infecção. Nas condições experimentais utilizadas, após a indução da infecção urinária, os medicamentos homeopáticos *Cantharis vesicatória* 6CH e 30CH e o medicamento alopático ácido nalidíxico foram efetivos no tratamento das ratas infectadas por *E. coli*, Fontes et al. (2005) obtiveram o mesmo resultado que este estudo com os leitões, sendo o medicamento mais efetivo que o Bioterápico. Já para o tratamento prévio de cinco dias, seguido da indução da infecção urinária, o medicamento que apresentou o melhor resultado foi o Bioterápico Urina 30CH, o seu efeito protetor mais efetivo parece dever-se à presença dos produtos da enfermidade, além do agente etiológico, uma vez que esse bioterápico foi preparado a partir da urina dos animais infectados, ao contrário dos medicamentos bioterápicos *Escherichia coli* e *Colibacillum*, ambos preparados a partir da bactéria *Escherichia coli*. A inibição bacteriana encontrada nos animais tratados com ácido nalidíxico era esperada, uma vez que o microrganismo mostrou sensibilidade a este fármaco no teste de antibiograma.

Albrecht e Schutte (1999) compararam o uso de antibióticos com tratamento homeopático em granjas de suínos de sistema intensivo com animais na fase de engorda e os resultados zootécnicos foram melhores para o lote tratado com homeopatia, colaborando com os resultados obtidos no presente estudo, onde o grupo controle apresentava no início do tratamento 32,3% de animais com diarreia e ao final 18,7% de animais com diarreia, não houve diferença estatística, portanto a frequência de animais com diarreia do grupo controle no início e no final do tratamento não apresentou alteração.

Rizzardi et al. (2008), realizou um experimento com leitões (período de aleitamento até o desmame) na primeira fase com 258 animais com tratamento convencional para prevenção de diarreias (antibiótico Colistina na dosagem de 1,0ml/ leitão), e 284 leitões

receberam o produto homeopático (na dosagem de 5,0g/leitão). Ambos os tratamentos foram administrados por via oral no 2º dia vida. A segunda fase do experimento foi realizado da mesma forma com 425 leitões e na outra sala 395 leitões receberam o medicamento homeopático, tanto na primeira quanto na segunda fase, não houve mudanças no manejo nutricional ou no manejo geral da granja. Os resultados da primeira fase indicaram uma incidência de 23,2% de diarreia na sala Controle, e na sala cujos leitões receberam o produto homeopático verificou-se uma incidência de 0,70% de diarreia. Na segunda etapa o resultado final foi uma incidência de diarreia de 69,4% na sala Controle e de 15,6% na sala que recebeu o produto homeopático concluindo que o medicamento homeopático permitiu uma redução significativa nos índices de diarreia em leitões lactentes.

Em cada experimento foi utilizado o antimicrobiano usual da granja e esta situação pode ter influenciado o resultado. No experimento um foi utilizado o Minoxfel® (Ceftiofur), considerado um bom antimicrobiano para o combate a *E. coli* (MACÊDO et al., 2007), Cunha et al. (2007) detectaram que 50 % entre 40 amostras de fezes colhidas na maternidade eram positivas para *E. coli* e oriundas de leitões de mães primíparas (leitoas), demonstrando a falta de imunização. A partir do momento em que se iniciou o uso de antibióticos indicados pelos antibiogramas, principalmente Ceftiofur, as amostras positivas de ninhadas de leitoas representaram 13 % positivas para *E. coli*. Segundo Menin et al. (2008) as maiores taxas de resistência foram observadas para Oxitetraciclina (84,0%) e Gentamicina (76,0%) e menores taxas de resistência para Ceftiofur (37,0%) e Enrofloxacin (39,0%). Outros autores que, estudando a resistência antimicrobiana em *E. coli* isoladas de leitões com diarreia, verificaram valores de resistência inferiores para Enrofloxacin (24%) e Gentamicina (38%) e valores de resistência mais elevados para Oxitetraciclina (100%) (HABRUM et al., 2004). As diferenças entre os antimicrobianos observadas entre os resultados dos estudos, podem ser atribuídas aos diferentes protocolos terapêuticos (dosagem, tempo de terapia) utilizados nos programas sanitários que poderiam influenciar diretamente na pressão de seleção de populações bacterianas (MENIN et al., 2008).

No experimento dois foi utilizado o Shotapen® L.A. (Benzilopenicilina procaína, Benzilpenicilina benzatina, Dihidroestreptomicina). As penicilinas em suas diferentes formulações (como a penicilina-procaína e amoxicilina) são usadas, por seu espectro compatível com algumas das principais infecções prevalentes em leitões na maternidade (SCHWARZ et al., 2007), mas Schwarz et al. (2007) descreveu em seu trabalho um surto de

mortalidade de leitões na fase de aleitamento, após administração do antibiótico à base de penicilina e estreptomicina. A injeção de penicilina em leitões em fase de aleitamento foi capaz de causar reações adversas como salivação excessiva, dispnéia e mortalidade elevada. As hipóteses levantadas para o problema são anafilaxia, reação tóxica por injeção de produto alterado (conservação inadequada), sensibilização dos leitões através do colostro de porcas tratadas por penicilina ou ainda predisposição genética relacionada às linhagens utilizadas na granja. Neste estudo os animais do grupo controle não conseguiram se recuperar da diarreia como os animais dos outros grupos, provavelmente este antimicrobiano não é o ideal para ser usado para o tratamento da *E.coli*, não aparecendo na maioria dos testes de sensibilidade.

No experimento três foi utilizado Fosbac® (Fosfomicina + Frutose 1,6 difosfato), segundo Macêdo et al. (2007), a Fosfomicina (63,16%) foi o terceiro medicamento no Teste de sensibilidade para *E.coli* ficando atrás apenas do medicamento Florfenicol (89,47%) e Ceftiofur sódico (84,21%).

As mudanças de métodos de produção na suinocultura, principalmente a adoção de sistemas de criação intensivos, aumentaram a pressão de infecção e o nível de estresse para os animais. Estas alterações resultaram no desencadeamento de problemas com várias doenças infecciosas, fazendo com que o uso de antimicrobianos se tornasse essencial à produção, na forma de medicamentos preventivos, curativos ou através da utilização de antimicrobianos em doses baixas para melhorar o crescimento animal (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

O amplo e, muitas vezes, indiscriminado uso dessas drogas resulta na seleção de bactérias que são resistentes. Estas não somente podem tornar-se predominantes em uma população de bactérias, como podem transferir material genético para bactérias susceptíveis, que então adquirem resistência (VAZ, 2009).

A resistência a drogas antibacterianas pode ser codificada pelo cromossomo bacteriano ou em plasmídeos o que facilita a difusão destes genes. A resistência a um agente antibacteriano, frequentemente, resulta em resistência cruzada com outros agentes da mesma classe, como por exemplo, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos e macrolídeos. Esse tipo de transferência pode ser realizado rapidamente entre diferentes gêneros e espécies de bactérias (QUINN et al., 2005). O potencial de mutação e de alterações genéticas entre todos os tipos de bactérias, combinado com o curto tempo de geração das bactérias, é de grande

importância na limitação do uso de drogas antimicrobianas no controle de infecções em animais. O uso de drogas antimicrobianas segundo Hirsh e Zee (2003) não induz resistência em bactérias, mas elimina as bactérias susceptíveis e deixa as bactérias resistentes presentes na população.

O uso indiscriminado e constante de antibióticos em medicina humana e veterinária tem determinado o aumento de resistência bacteriana (COSTA et al., 2006), interferindo no tratamento efetivo das infecções por estes agentes. A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microorganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (NIJSTEN et al., 1993). O desenvolvimento de resistência bacteriana, além de determinar uma menor eficácia da droga, também representa um potencial de risco à saúde pública, uma vez que o contato dos homens com os animais pode aumentar a ocorrência de resistência da microbiota desta espécie (BONGERS et al., 1995). Um correto manejo sanitário, profilaxia e higiene são formas simples de prevenção de doenças, podendo contribuir para a redução da resistência bacteriana (COSTA et al., 2006).

A resistência a *E.coli* em suínos criados intensivamente é pronunciada, pois nesta situação, o uso de antibióticos é frequente. Essas *E. coli* podem ser resistentes a até 10 drogas úteis clinicamente, como resultado de resistência mediada por plasmídeo. Entre as *E. coli* toxigênicas, resistência medida por plasmídeo a Tetraciclina, Sulfonamidas e Streptomicina são agora praticamente universais e está cada vez mais comum a Ampicilina e Neomicina. Plasmídeos de resistência a antibióticos em *E. coli* enterotoxigênicas podem também incluir genes determinantes de virulência como produção de toxinas e adesinas. Desta forma, o uso de antibióticos pode potencialmente promover a transferência de genes de virulência entre as bactérias (VAZ, 2009).

O efeito de resistência antimicrobiana em bactérias de origem animal tem sido estudado (HIRSH; ZEE, 2003). O foco maior tem sido no uso de drogas para tratamentos em humanos que estão sendo utilizadas como promotores de crescimento ou como drogas profiláticas na alimentação de suínos. Bactérias de origem animal podem atingir a população humana de várias formas: contaminação de fontes hídricas, contaminações no abate, efluentes de granjas e outros. Isto se torna particularmente importante com bactérias entéricas. Indivíduos que são mais expostos, como trabalhadores da indústria da carne, tratadores de

animais e veterinários, costumam ter um grau de resistência a antimicrobianos maior do que a população em geral. Entretanto, torna-se quase impossível quantificar a transferência desta resistência visto que o mesmo princípio ativo pode ter sido usado também em humanos (PRESCOTT, 2000; VAZ, 2009).

O uso de antibiótico na forma de promotor de crescimento leva a um benefício do desempenho do animal, mas as bactérias podem adquirir resistência de uma forma intrínseca ou através da aquisição de elementos genéticos que carregam genes de resistência. A persistência desta resistência no animal depende de um grande número de fatores externos, como o estresse, transporte de animais, manejo, doses terapêuticas utilizadas ou exposição prévia dos animais ou seus pais a exposição prévia a antibióticos. Todos estes fatores devem ser considerados quando se deseja estabelecer estratégias no controle de resistência bacteriana (BURCH, 2005; VAZ, 2009).

Observou-se que a resistência a antibióticos e habilidade de produzir enterotoxinas são frequentemente transferidas juntas, o que leva a crer que o uso de antibióticos pode provocar um aumento de estirpes enterotoxigênicas. Plasmídeos que codificam a resistência a antibióticos e ST podem ser transferidos *in vitro* e *in vivo* em camundongo neonato, sugerindo que a pressão seletiva do antibiótico pode levar a um aumento na frequência de ETEC (QUADRI et al., 2005).

Enfim, uma vez adquirida pela *E. coli*, a resistência aos antimicrobianos pode ser transmitida a outros isolados e mantida por um longo período de tempo. Logo, a conscientização dos técnicos é fundamental, bem como a realização de estudos com o objetivo de dimensionar esse problema, aplicar e descobrir novas estratégias alternativas ou complementares ao uso racional de drogas antimicrobianas na suinocultura (COSTA, et al., 2009).

No Brasil, com frequência, o diagnóstico de colibacilose em leitões é realizado somente pelo isolamento bacteriano, sem nenhuma caracterização de patogenicidade. Ainda são poucos os estudos brasileiros sobre a prevalência e importância de diferentes cepas patogênicas de *E. coli* (CALDERARO et al., 2001; BACCARO et al., 2002; BRITO et al., 2003; ALMEIDA et al., 2007; MACÊDO et al., 2007). O reconhecimento da patogenicidade dos isolados, bem como de seu perfil de sensibilidade às drogas antimicrobianas pode reduzir

o uso de drogas de largo espectro para o tratamento dos animais, o que auxilia na diminuição de *E. coli* resistentes presentes nos suínos e no seu ambiente (BRITO; TAGLIARI, 2000; ALMEIDA et al., 2007; MACÊDO et al., 2007).

A prevenção das infecções intestinais por *E. coli*, em suínos, envolve a redução no número de *E. coli* patogênicas no meio ambiente por meio da adoção de boas práticas de higiene, melhora no manejo e provisão de uma imunidade completa aos animais (COSTA, et al., 2009). O impacto ambiental, consequente do uso abusivo de antimicrobianos na produção animal, é um fator preocupante. A contaminação do meio ambiente constitui-se num sério risco, principalmente a partir da água que recebe dejetos de suínos e aves tratados incorretamente (PETERSEN et al., 2002).

O aumento da preocupação com o bem-estar animal aliado a busca por uma carne sem resíduos tem se tornado tema recorrente em discussões pelo mundo (LUDKE et al., 2007). No Brasil, alternativas ao sistema atual de produção como a do suíno orgânico ou o uso de medicamentos homeopáticos em lugar dos alopáticos na própria produção industrial, estão ganhando espaço nas discussões entre os produtores. O Brasil aparece em evidência nas principais discussões mundiais sobre sustentabilidade, economia verde e responsabilidade sócio-ambiental. Segundo dados do Ministério da Agricultura, os produtores de orgânicos nacionais movimentam anualmente US\$ 250 milhões, sendo que 70% da produção é vendida para o mercado externo (LIU, 2008).

A Pecuária Orgânica usa de uma metodologia com princípios e normas bem determinados, com ênfase no bem-estar animal e manejo ético, alimentação orgânica e terapêuticas brandas como a homeopatia, a fitoterapia e a acupuntura (MACHADO FILHO et al., 2001). A produção orgânica introduz novos valores de sustentabilidade ambiental e social dentro do sistema produtivo. O Brasil aprovou a lei que regulamenta o uso de orgânicos, e esta definida pela Lei Nº 10.831/2003 de 23 de dezembro de 2003 e pelo decreto Nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007). Um estudo da Associação de Comércio Orgânico dos EUA revelou que o consumo de produtos orgânicos cresceu 17% entre 2007 e 2008. O relatório indica ainda que esta tendência de crescimento deve se manter. Atualmente o preço do suíno orgânico nos Estados Unidos é mais alto, sobretudo em função dos custos de produção. O custo de mão-de-obra também aumenta já que serão necessários mais funcionários para a produção de uma mesma quantidade de suínos. Por outro lado, o

consumidor de produtos orgânicos também está disposto a pagar mais por este tipo de produto, o que acaba neutralizando o impacto do aumento dos custos de produção (SUINO, 2009). Mantendo-se o crescimento da demanda por suíno orgânico, haverá a consolidação de uma base de mercado consumidor mais ampla, favorecendo o ganho na produção.

No presente experimento, quanto ao ganho de peso, obteve-se na média dos lotes das 3 granjas somadas, que o grupo com maior ganho foi o Medicamento, com uma média de peso de 4.685g, estatisticamente significativa em relação ao Bioterápico 30 CH ($p < 0,05$) com 3.972g e ao Controle ($p < 0,05$) com 4.144g, seguido do grupo que tomou Medicamento + Bioterápico 30 CH, com 4.628g, que também foi estatisticamente significativa em relação ao Bioterápico 30 CH ($p < 0,05$) e ao Controle. Segundo os resultados deste estudo, o medicamento homeopático pode ajudar no ganho de peso dos leitões nesta fase de crescimento, quando escolhido segundo as premissas da homeopatia, já que nos dois grupos que mais ganharam peso durante o experimento havia a presença do medicamento. Independente do diagnóstico clínico, a homeopatia utiliza as premissas da *totalidade sintomática característica* e da *individualização medicamentosa* na escolha da sua conduta terapêutica. Assim sendo, indivíduos que apresentem uma mesma enfermidade, poderão receber medicamentos homeopáticos distintos, conforme o conjunto de suas manifestações peculiares (sintomas comportamentais, gerais e particulares). Fundamentados numa concepção comum e imprescindível de *totalidade sintomática característica* (TEIXEIRA, 2008), desta forma, neste estudo foi escolhido o medicamento mais indicado para cada granja, considerando-se o gênio epidêmico e assim cada granja como um indivíduo com suas peculiaridades.

Briones (1987), registrou uma diferença de 6,4% no ganho de peso em frangos tratados com homeopatia, quando comparado ao grupo controle (sem medicação), criados em sistema confinado. Por outro lado, Boratto et al. (2004) chegaram a resultados semelhantes no ganho de peso final das aves tratadas com antibióticos, probióticos ou homeopatia. Os autores concluem que os remédios homeopáticos podem ser utilizados como substitutos para os insumos mais comumente utilizados da indústria de aves. É a combinação do sistema diferenciado de produção com alternativas medicamentosas não-residuais que se pode encontrar algumas respostas positivas na avaliação de parâmetros zootécnicos e sanitários do rebanho como um todo (AMALCABURIO et al., 2009).

Amalcaburio et al. (2009) realizaram experimento com o objetivo de avaliar a influência de medicamentos homeopáticos no desempenho e saúde de frangos de corte em sistema semi-intensivo de produção alternativa, os animais foram divididos em 3 grupos, Controle, *Calcarea carbonica* 12 CH e *Calcarea phosphorica* 12 CH, não encontraram diferença entre os tratamentos no desenvolvimento ponderal (velocidade de crescimento ou ganho de peso final), quando comparado ao tratamento controle, os remédios homeopáticos não apresentaram qualquer efeito de promoção do crescimento, houve menor peso do fígado das aves tratadas com *Calcarea carbônica*, isto pode estar associado a uma menor susceptibilidade ao estresse. Estas diferenças nos resultados podem ser baseadas nas diferenças metodológicas dos medicamentos (potências, sincrasia dos animais). Os autores citados anteriormente estão utilizando o medicamento homeopático como promotores de crescimento e o objetivo do presente estudo não foi de promover crescimento e sim de melhorar a saúde dos animais e isso se refletiu no ganho de peso.

Um estudo bem desenhado em homeopatia deve levar em consideração as particularidades da pesquisa homeopática, como a lei de semelhança e os sintomas idiossincrásicos (VAN WASSENHOVEN, 2007). Na Europa, o tratamento homeopático é autorizado nas fazendas de criação de gado e seu uso permite evitar resíduos químicos na corrente alimentar. Em estudos recentes, o uso de medicamentos homeopáticos complexos foi testado em ensaios duplo-cegos, com resultados muito positivos em relação aos grupos-placebo, com homogeneidade das amostras, número suficiente de animais e protocolos de fácil aplicação no contexto das fazendas (VAN WASSENHOVEN, 2007).

Uma outra alternativa para o maior ganho de peso dos grupos onde havia medicamento homeopático é a diminuição do estresse dos animais realizada pelo medicamento (VUADEN, 2005).

O estresse é uma perturbação do funcionamento normal de um sistema biológico que é provocado por fatores ambientais, a amplitude e a persistência desta perturbação, podem causar a redução da taxa de crescimento ou aumento da mortalidade. Diferentes tipos de estresses, tais como a fome, a oxidação ou a irradiação ultra-violeta (UV), pode aumentar a taxa de mutação das bactérias. As mutações podem resultar da alteração direta da molécula de DNA em condições de estresse ou de um programa genético que é induzido sob estresse

(TENAILLON et al., 2004). Vários trabalhos com medicamentos homeopáticos indicam a ação na diminuição do estresse (MERLINI, 2006; PINTO et al., 2008).

Merlini (2006) realizou um estudo com tilápias do Nilo com o objetivo de avaliar o efeito do produto homeopático Homeopatila 100[®] nos níveis de cortisol, glicose, hemoglobina e nos parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foi utilizado um grupo homogêneo de 60 peixes com peso médio de $98,11 \pm 0,10$, distribuídos aleatoriamente, 10 peixes em cada caixa d'água de fibra de vidro, divididos em dois tratamentos: 30 animais do grupo-controle e 30 animais do grupo que recebeu Homeopatila 100[®]. O trabalho foi dividido em 3 partes, sendo que a primeira avaliou o nível de cortisol da tilápia do Nilo; no encerramento do experimento, aos 60º dias do seu início, os animais foram anestesiados e foram colhidos 3 ml de sangue para posterior análise de cortisol plasmático, nos peixes que receberam Homeopatila 100[®] a média de nível de cortisol plasmático foi $17,19 \text{ ng/ml} \pm 0,95$ e do grupo-controle foi $38,68 \text{ ng/ml} \pm 1,21$. A segunda parte avaliou o nível de glicose e hemoglobina, no dias 0 (zero), 15, 35, e 60 da implantação do experimento. Os animais do grupo controle apresentaram um aumento significativo na média de concentração de glicose $58,27 \pm 1,32 \text{ ng/ml}$, e para o grupo-tratado foi $34,60 \pm 0,73 \text{ ng/ml}$ e para hemoglobina foi de $5,38 \pm 0,16 \text{ ng/ml}$ do grupo tratado e o grupo controle de $5,98 \pm 0,31 \text{ ng/nL}$. Na última parte foram avaliados os parâmetros hematológicos, nos dias 0 (zero), 15, 35, e 60 da implantação do experimento, esse sangue destinou-se às determinações do hematócrito e a contagem diferencial de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e trombócitos. Os resultados dos parâmetros hematológicos, no grupo controle, foram os seguintes: linfócitos(%) $41,88 \pm 1,41$, neutrófilos(%) $31,73 \pm 1,46$, monócitos(%) $7,04 \pm 0,19$, eosinófilos(%) $1,29 \pm 0,23$, basófilos(%) $1,06 \pm 0,12$, trombócitos(%) $57,88 \pm 1,43$, hematócrito(%) $32,80 \pm 0,80$, eritrócitos $3,15 \pm 0,19\%$ VCM(%) $100,97 \pm 1,51$, HCM (%) $19,41 \pm 0,75$, CHCM (%) $19,47 \pm 0,53$. No grupo-tratado, os resultados foram os seguintes: linfócitos (%) $43,54 \pm 0,88$, neutrófilos (%) $30,07 \pm 0,87$, monócitos (%) $6,78 \pm 0,40$, eosinófilos (%) $1,95 \pm 0,20$, basófilos (%) $1,06 \pm 0,16$, trombócitos (%) $69,71 \pm 0,02$, hematócrito (%) $30,92 \pm 0,76$, eritrócitos $5,38 \pm 0,16$ VCM (%) $133,69 \pm 0,71$, HCM (%) $22,34 \pm 0,33$, CHCM(%) $16,22 \pm 0,34$. Nas condições desse estudo, concluiu-se que os animais que receberam Homeopatila 100[®] apresentaram aumento significativo na porcentagem de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e trombócitos, sendo que os monócitos e basófilos não apresentaram alterações ($p > 0,05$). Os níveis de cortisol, glicose e hemoglobina plasmáticos foram significativamente inferiores no sangue dos

peixes que receberam Homeopatila 100[®], quando comparados com os animais do grupo controle.

Pinto et al. (2008) avaliaram os efeitos hematológicos e comportamentais do tratamento com *Chamomilla* 6 CH em camundongos submetidos ao estresse experimental, Camundongos Swiss foram divididos aleatoriamente em pares, um animal foi inoculado com tumor de Ehrlich, o outro foi tratado diariamente com *Chamomilla* 6 CH ou controle ou não receberam tratamento. Após 7 dias, os animais foram observados em uma arena em campo aberto e amostras de sangue colhidas. Ratos que coabitaram com um doente mostraram uma diminuição na atividade geral, mas aqueles tratados com *Chamomilla* 6 CH foram menos afetados ($p=0,0426$). Não ocorreram alterações hematológicas. Em um segundo experimento, o teste de natação forçada foi aplicado em camundongos pré-tratados com *Chamomilla* 6 CH, os controles foram: água, etanol 10% ou amitriptilina. Somente o amitriptina e grupos tratados com etanol apresentaram comportamento excitatório significativa ($p=0,0020$). A diminuição da contagem de leucócitos foi observado nos grupos tratados com amitriptilina e *Chamomilla* 6 CH ($p=0,039$), estes dados sugerem que o tratamento com *Chamomilla* 6 CH acelera a recuperação de comportamento basal nos animais submetidos a situações estressantes. O presente estudo não teve como objetivo medir o estresse, mas como os autores anteriores comentam que o estresse esta diretamente relacionado com processos inflamatórios fixados nesses animais, os resultados influenciaram a diminuições dos processos, porém novos estudos devem ser realizados para avaliar o comportamento dos animais submetidos ao medicamento homeopático.

A carne suína é uma das fontes de proteína animal mais importante no mundo, com a produção de 100 milhões de toneladas, das quais aproximadamente metade é produzida na China, e o restante na União Européia, nos Estados Unidos e no Brasil, o quarto maior produtor e exportador, com 3% da produção, 11% das exportações e crescente inserção internacional. O mercado internacional de carne suína movimentou US\$ 11,9 bilhões e 5,4 milhões de toneladas. Neste cenário, o desempenho brasileiro na última década é positivo, passando de 4% para 11% das exportações mundiais, com aproximadamente 530 mil toneladas exportadas em 2008, atingindo o faturamento recorde de US\$ 1,4 bilhão em 2008 (ABIPECS, 2009; MIELE; MACHADO, 2010). A cadeia de produção suína brasileira, com

30 milhões de cabeças, geração de 630 mil empregos diretos e indiretos, é uma importantíssima atividade econômica (ABIEPCS, 2010).

Na criação de suínos como uma grande atividade econômica, é relevante a diminuição do número de animais com distúrbios entéricos, pois no caso das diarreias além dos custos diretos com a aquisição de medicamentos, devem ser considerados os custos adicionais com mão de obra, com menor desempenho dos animais, com a falta de uniformidade dos lotes e com a predisposição dos leitões a contrair outras infecções (CUNHA et al., 2007). Observou-se que no experimento um os grupos em que não houve animal com diarreia ao final do tratamento foram os que mais ganharam peso na hora do desmame, isso também aconteceu no experimento dois, já no experimento três obteve-se grupos que mesmo possuindo animais com diarreia obtiveram um bom ganho de peso, embora neste experimento não houve diferença estatística no ganho de peso entre os grupos ao desmame, presente no experimento um e dois.

Soto et al. (2007), realizaram trabalho em uma granja comercial de suínos com o objetivo de implantar a profilaxia e o tratamento nas fases de creche, recria e terminação com a utilização de medicamentos homeopáticos em substituição ao tratamento alopático, avaliaram os resultados de índice de mortalidade obtidos na creche, recria e terminação com o tratamento homeopático versus tratamento alopático e mensuraram e compararam o custo financeiro dos dois tratamentos. Demonstraram diferença a favor da homeopatia no item mortalidade nos animais das fases de creche ($p=0,003$), com redução da mortalidade nesta fase de 3,2% para 1,7%, e na fase de recria ($p<0,001$) de 5,9% para 0,3%. A homeopatia possibilitou a produção de um maior número de animais por matriz/ano com custo financeiro anual menor quando comparado com o tratamento alopático.

Além da melhoria dos índices de produtividade, a implantação da homeopatia em detrimento da alopatia ou tratamento convencional, representou também, segundo Soto et al. (2007), um ganho com redução de custos com medicamentos, enquanto a profilaxia e tratamento com medicamentos alopáticos representaram um custo anual de US\$ 5.063,39, o custo da homeopatia foi de US\$ 2.969,31, com uma diferença de US\$ 2.094,08. E ainda a eliminação do uso de antibiótico nas rações dos suínos, fator este muito importante. No presente estudo, o tratamento de menor custo foi o do grupo do medicamento homeopático e o Bioterápico isoladamente, R\$ 0,16 por leitão, e o de menor custo dos grupos controle foi o

grupo que tomou Fosbac®, R\$ 0,30 por leitão, enquanto o de maior custo foi o que tomou Minoxfel® com um custo de R\$ 2,34 por leitão, assim verificou-se que, como Soto et al. (2007), também houve um ganho de custo com a medicação homeopática. Talamini et al. (2006), chegaram a citar que o gasto por leitão com medicamentos alopáticos seria R\$ 3,46/leitão. Então segundo os resultados do presente estudo uma fêmea que produz 12 leitões irá produzir aproximadamente 30 leitões ao ano com um gasto com medicamentos homeopáticos de R\$ 4,80/matriz/ano, com o medicamento alopático mais barato (Fosfomicina) será de R\$ 9,00/matriz/ano é uma diferença de R\$ 4,20/matriz/ano, em uma granja com 200 matrizes, tem-se uma economia de R\$ 840,00/ano e efetuando-se os mesmos cálculos para um outro medicamento utilizado que foi o Ceftiofur, tem-se um gasto anual de R\$ 70,20/matriz/ano, é uma diferença de R\$ 65,40, em uma granja com 200 matrizes comparando-se o tratamento de Ceftiofur com o tratamento homeopático verifica-se uma economia anual de R\$ 13.080,00.

Em todo o experimento obteve-se dezenove animais (12 %) com Fatores de Virulência e Enterotoxinas. Foram encontrados três animais com a enterotoxina Stb e dezesseis animais com o Fator de Virulência F41.

Segundo Almeida et al. (2007) quando pesquisaram leitões da região de Ribeirão Preto (SP) isolaram diferentes bactérias e a *E. coli* enterotoxigênica foi uma das espécies mais frequentes, o que está de acordo com o relato de vários autores (BRITO et al., 2000; CALDERARO, 2001; FRANCIS, 2002; KIERS, et al, 2002; BRITO et al., 2003; COSTA et al, 2006).

Calderaro et al. (2001), destacou a *E. coli* ETEC como o microrganismo mais frequente, ocorrendo em 85,7% (18/21) dos plantéis estudados, sendo diagnosticada em 40,2% (70/174) das amostras analisadas. No que diz respeito à frequência de animais positivos para *E. coli* ETEC observou-se a ocorrência do genótipo STa+ em 25,7% (18/70) dos animais, STb+ em 21,5% (15/70), LT+ em 7,1% (5/70), STa+ STb+ em 4,3% (3/70), STb+LT+ em 34,3% (24/70) e STa+STb+LT+ em 7,1% (5/70). PARMA et al. (2000) relataram, em leitões com diarreia, frequências superiores para *E. coli* STa+ (55,6%-20/36) e STa+STb+ (13,9%-5/36) e inferiores para *E. coli* STb+ (0,0%-0/36), LT+ (0,0%-0/36), STb+LT+ (22%-8/36) e STa+STb+LT+ (0%-0/36%). Nas amostras processadas não foram detectadas *E. coli* com genótipos relativos a produção de verotoxinas (Vt1, Vt2 e Vt2e).

No presente estudo também não encontrou-se a presença de verotoxinas. Knöbl et al. (2008) também não encontraram Stx2e (Vt2e) em um estudo com papagaios. Suínos e aves não são considerados como uma fonte de EHEC (subgrupo das STEC) e os relatos esporádicos podem derivar da exposição acidental a dejetos de ruminantes (CAPRIOLI, 2005). Entretanto, PARMA et al. (2000) relataram na Argentina a ocorrência de 5.6% (2/36) de *E. coli* com genótipo Vt2e+STa+STb+ e 2,7% (1/36) de *E. coli* com genótipo VT2e+STa+ em suínos. Vidotto et al. (2009), encontraram somente um pequeno número de estirpes (3%) de Stx2e (Vt2e) positivas, em contraste de estirpes isoladas nos Estados Unidos que apresentaram 17,4% (ZHANG et al., 2007) e das estirpes isoladas em Minas Gerais, que apresentaram 21,4% (MACÊDO et al., 2007). A enterotoxina Stx2e, também conhecida como fator de doença do edema, é a causa de lesões associadas com a doença do edema em suínos. Quando absorvida pelo sangue, essa toxina destrói as células endoteliais em pequenos vasos, resultando na formação de coágulos sanguíneos, hemorragia, necrose isquêmica, e edema em órgãos vitais (FRANCIS, 2002).

Costa et al. (2006) encontraram em leitões no Sul do Brasil, a toxina Stb identificada em 50% dos isolados clínicos, seguido por Sta e Lt, com 35%. Dentre os fatores de adesinas pesquisados, a F18 foi encontrada em 27,5% das amostras.

Vidotto et al. (2009) mostram alta prevalência (92%) dos genes fimbriais e enterotoxinas em isolados de *E. coli* de leitões diarreicos no Estado do Paraná, e a associação mais prevalente desses genes foi F4⁺ F18⁺ F41⁺ STa⁺ STb⁺ e LT⁺. A frequência dos genes de virulência de *E. coli* isolados de leitões diarreicos no Estado Minas Gerais era de 42% (MACÊDO et al., 2007). No presente estudo a prevalência foi de 12%, mas não foram todos os animais que estavam com diarreia, apenas possuíam *E.coli* nas fezes. Foi encontrado 10,4% de animais com o fator de virulência F41 e 1,9% de enterotoxina Stb.

No experimento um, isolou-se *E.coli* em três animais diarreicos para fazer o Bioterápico e um possuía o fator de virulência F41, o grupo que tomou Bioterápico 30 CH ao final do tratamento apresentava um animal com o F41, o grupo que tomou *China off* +Bioterápico 30 CH apresentou um animal com fator de virulência F41, o grupo *China off* 30 CH, apresentou três animais com a enterotoxina Stb, e estes animais foram os únicos a apresentar em todo o experimento a enterotoxina, e por fim o grupo controle apresentou dois animais que possuíam o F41, mesmo tomando um antibiótico bem indicado (MACÊDO et al., 2007; MENIN et al., 2008).

No experimento dois, isolou-se *E.coli* em três animais diarreicos para o bioterápico e nenhum possuía o fator de virulência F41. Na primeira coleta apenas um animal que era do grupo controle apresentou fator de virulência F41, na segunda coleta nenhum fator de virulência, o grupo que tomou Bioterápico 30 CH havia três animais com o F41 na segunda coleta, o grupo que tomou *Phosphorus*+Bioterápico 30 CH apresentou um animal com fator de virulência F41, o grupo que tomou *Phosphorus* 30 CH, não apresentou fatores de virulência. Antes do tratamento nenhum animal apresentou fator de virulência e portanto não pode-se saber se houve interferência dos medicamentos.

No experimento três, isolou-se *E.coli* em oito animais diarreicos para fazer o Bioterápico e um possuía o fator de virulência F41. Na primeira coleta nenhum grupo apresentou fator de virulência, na segunda coleta o grupo que tomou Bioterápico 30 CH apresentou dois animais com o F41, e os outros grupos apresentaram um animal com fator de virulência em cada um, inclusive o controle.

Como pode se verificar entre a coleta para a produção de Bioterápico e o tratamento houve isolamento de microorganismos diferentes na mesma propriedade, devido a esse fato novos estudos devem ser realizados para avaliar se os Bioterápicos com e sem Fatores de Virulência presentes nos microorganismos interferem diretamente na profilaxia da diarreia nos leitões, porém se isto ocorrer o tratamento com Bioterápico pode apresentar limitações uma vez que durante o período de confecção até a sua utilização pode não ser mais eficiente para um novo microorganismo presente no processo. Desta forma a utilização de medicamento da farmacopéia homeopática adquire maior importância, pois além da facilidade de aquisição e preparo não sofre alterações relacionada a alteração de microorganismo e portanto não apresenta esse inconveniente que o Bioterápico pode apresentar.

Vidotto et al. (2009), mostraram nos resultados da análise de PCR que as cepas de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia possuíam as enterotoxinas LT e / ou ST (STa e / ou STb). A STa e STb genes foram encontrados em 40% e 47% dos isolados. Macedo et al. (2007) encontraram 33,3% e 40% para STa e STb.

Menin et al. (2008) encontraram, considerando a faixa etária e o fenótipo fimbrial, os sorotipos de *E. coli*, potencialmente patogênicos mais prevalentes até a terceira semana de idade, foram F5 (K99), F6 (987P), F42 e F41 em 29%, 23%, 11% e 10% , respectivamente.

Kitaka et al. (2003), de 321 cepas de *E.coli* isoladas de fezes diarréicas de leitões, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), detectaram nove cepas $f41^+$ (2,8%); 6 $f18^+$ (1,9%); 5 $987p^+$ (1,6%); 4 $k99^+$ (1,3%); 69 $est-II^+$ (21,5%); 7 $elt-I^+$ (2,2%) e 6 $est-I^+$ (1,9%). As associações observadas com o F41 foram: K99/F41/LT-I, K99/F41/ST-I.

Schierack et al. (2007) realizou um estudo da microbiota intestinal de populações de suínos domésticos saudáveis e constatou que a população de Enterobacteriaceae intestinal de suínos é altamente individual. Quando bactérias foram isoladas, as *E. coli* dominaram a maioria das amostras. O membro mais comum da família Enterobacteriaceae do intestino de suínos foi a *E. coli*, de acordo com um estudo anterior de 642 mamíferos da Austrália em que a *E. coli* foi o mais comum de 24 espécies entéricas (GORDON; FITZGIBBON, 1999). Em conclusão, a microbiota Enterobacteriaceae de suínos é particular ao indivíduo, e várias espécies podem prevalecer. A fixação de bactérias na mucosa em grande número não parece ser essencial para a colonização bem sucedida. Finalmente, a *E. coli* com diferentes perfis de fatores de virulência também pode se estabelecer em número elevado, sem afetar a saúde de seus hospedeiros, sugerindo uma baixa associação entre a presença de genes de virulência e patogenicidade ou virulência.

O modelo de *E. coli* em leitões pode ser promissor e deve continuar a ser estudado. Deve-se lembrar o fato de que a *E. coli* é zoonose. Sabe-se que o coelho tem a mesma limitação que o rato como modelo, pois não são adequados para estudar a diarréia de ETEC. Em contraste com camundongos e coelhos, suínos jovens que expressam receptores de adesinas ETEC são naturalmente suscetíveis à diarréia ETEC (FRANCIS, 2002; ZHANG et al., 2007). Suínos jovens infectados desenvolvem diarréia típica e podem ficar desidratados (BERBEROV et al., 2004; ZHANG et al., 2006), semelhante aos resultados clínicos de pacientes humanos com diarréia. A semelhança entre os suínos e as infecções humanas por ETEC na patogênese e evolução clínica sugerem que suínos jovens são um bom modelo para estudar diarréia ETEC de humanos (ZHANG et al., 2008), inclusive, segundo este trabalho, com o uso da homeopatia.

Ainda existe certa dificuldade em adequar os modelos clássicos de pesquisa a ciência homeopática, em vista dos aspectos peculiares ao modelo homeopático como a individualização do medicamento homeopático perante a totalidade de sintomas

característicos da individualidade enferma (ou podendo ser considerada a população), tanto a pesquisa quanto a prática clínica necessita de um tempo maior de acompanhamento dos pacientes, a fim de que as respostas clínicas tornem-se mais evidentes, isto dificulta as pesquisas, e também complica a reprodutibilidade de um experimento. Na prática, tanto na clínica de pequenos animais como nos animais de produção e silvestres uma das limitações é a necessidade sempre de um profissional homeopata na escolha dos medicamentos para que haja resultados satisfatórios. Outro problema a ser enfrentado é o fato da homeopatia trabalhar com a energia do indivíduo e isso exige que o paciente possa dispor desta energia para se curar. Assim, se o paciente sofre de uma doença que o debilita demasiadamente, a homeopatia, se não for usada de forma cuidadosa, além de não conseguir ajudar, pode agravar o quadro (TEIXEIRA, 2008).

É possível se realizar trabalhos homeopáticos de maneira adequada e com critérios bem definidos, o presente estudo tenta utilizar de metodologia criteriosa e definida para obter resultados expressivos.

Muitos estudos ainda devem ser realizados para se chegar à melhores resultados quanto à diminuição de diarreia em leitões e consequentemente maior ganho de peso destes. Estudos que devem abranger escolha de medicamentos, potências e frequências, porém o presente estudo dá um início neste processo.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O resultado mais significativo em número de diarréias e ganho de peso foi obtido nos animais que foram tratados com medicamentos homeopáticos escolhidos de acordo com as características das diarréias de cada plantel e portanto estes medicamentos são uma alternativa para os criadores de suínos.

A utilização de medicamentos homeopáticos ou Bioterápicos apresentam um custo inferior aos medicamentos alopáticos que estavam sendo utilizados em cada propriedade.

Novos estudos deverão ser realizados pra confirmar se os medicamentos homeopáticos podem interferir na presença dos fatores de virulência e enterotoxinas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABIPECS, 2009. Relatório ABIPECS 2008. Disponível em: < <http://www.abipecs.org.br> >. Acesso em 17 julho 2009.

ABIPECS, 2010. Disponível em: < <http://www.abipecs.org.br> > Acesso em: 22 maio 2010.

ABRAHÃO, A. F.; VIANNA, W. L.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORETTI, A. S. Preweaning piglets mortality in a intensive swine production system. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 86-91, 2004.

AGBODAZE, D. Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli*: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 221-230, 1999.

AGROCERES-PIC: Linhagem Comercial. Disponível em: <http://www.agrocerespico.com.br/produtos/matrizes/camborough23.html#> >. Acesso em: 18 maio 2010.

ALBRECHT, H.; SCHUTTE, A. Homeopathy versus antibiotics in metaphylaxis of infectious diseases: a clinical study in pig fattening and its significance to consumers. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 5, n. 5, p. 64-68, 1999.

ALMEIDA F. S.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; MALUTA, R. P.; ÁVILA, F. A. Diarréia suína: Estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 23, n. 3, p. 151-157, 2007.

ALMEIDA, L. R.; CAMPOS, M. C. O.; HERRERA, H. M.; BONAMIN, L. V. FONSECA, A. H. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopathy**, v. 97, p. 65-69, 2008.

AMALCABURIO, R.; MACHADO FILHO, L. C. P.; HONORATO, L. A.; MENEZES, N. A. Homeopathic remedies in a semi-intensive alternative system of broiler production. **International Journal of High Dilution Research**; v.8, n. 26, p.33-39, 2009.

BACCARO, M. R.; MORENO A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarréia. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.15-18, abr./jun., 2002.

BARBIERI, M. Life is Semiosis. The biosemiotic view of Nature. **Cosmos and History: The Journal of Natural and Social Philosophy**, v. 4, n. 1-2, 2008. Disponível em: <<http://www.cosmosandhistory.org/index.php/journal/article/view/99/198#>>. Acesso em: 24 junho 2010.

BARCELLOS, D. E. S. N.; LIPPKE, M. N. A. R. Adaptação e quarentena de matrizes suínas: conceitos tradicionais e o que está vindo por aí! **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. S9-S15, 2007. Supplement.

- BENEZ, S. M. **Manual de homeopatia veterinária**. São Paulo: Robe Editorial, 2002. 594 p.
- BENITES, N. R. A Homeopatia através dos séculos. **Clinica Veterinária**, v. 4, n. 20, p. 36, 1999.
- BENITES, N. R. Homeopatia. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 827-835.
- BERBEROV, E. M.; ZHOU, Y.; FRANCIS, D. H.; SCOTT, M. A.; KACHMAN, S. D.; MOXLEY, R. A. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3914–3924, 2004.
- BERCHIERI, J. R. A.; TURCO, W. C. P.; PAIVA, J. B.; OLIVEIRA G. H.; STERZO, E. V. Evaluation of isopathic treatment of *Salmonella enteritidis* in poultry. **Homeopathy**, v. 95, n. 2, p. 94-97, 2006.
- BETTI, L.; BORGHINI, F.; NANI, D. Plant models for fundamental research in homeopathy. **Homeopathy**, v. 92, p. 129–130, 2003.
- BETTI, L.; LAZZARATO, L.; TREBBI, G.; BRIZZI, M.; CALZONI, G.L.; BORGHINI, F.; NANI, D. Effects of homeopathic arsenic on tobacco plant resistance to tobacco mosaic virus. Theoretical suggestions about system variability, based on a large experimental data set. **Homeopathy**, v. 92, p. 195–202, 2003.
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, n.31, p.2483-2488, 1993.
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; KARCH, H. Virulence markers of Shiga-like Toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from Healthy domestic animals of different species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 631-635, 1995.
- BONAMIN, L.V.; MARTINHO, K.S.; NINA, A.L.; CAVIGLIA, F.; DO RIO, R.G. Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects in vivo. **British Homeopathic Journal**, v. 90: p. 198–203, 2001.
- BONAMIN, L. Sinais e Imagens: o legado de Madeleine Bastide. **Revista de Homeopatia**, América do Norte, v.72, n. 3/4, p. 5-8, 2009.
- BONGERS, J. H., FRANSSEN, F.; ELBERS, A. R. W., TIELEN, M. J. M. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from the faecal flora of veterinarians with different professional specialities. **Veterinary Quarterly**, v. 17, p. 146-149, 1995.
- BORATO, A. J.; LOPES, D. C.; OLIVEIRA, R. F.; ALBINO, L. F. T.; SÁ, L. M.; OLIVEIRA, G. A. Uso de Antibiótico, de Probiótico e de Homeopatia, em Frangos de Corte

Criados em Sistema de Conforto, Inoculados ou não com *Escherichia coli*. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1477-1485, 2004.

BRASIL. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Disponível em: <<http://www.aao.org.br/decreto6323.pdf>> Acesso em 22 mai 2010.

BRIONES, S. F. **Ensayos en pollos “broiler”. Estudios sobre la Aplicación de Homeopatía en Producción Animal**. Santiago (Chile); 1987. Disponível em: <<http://homeoint.org/articles/brioanim/index.htm#broiler>> ou <<http://homeovet.cl/BRIONES/pollos.pdf>> Acesso em: 22 maio 2010.

BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões lactentes com diarreia. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 117-119, 2000.

BRITO, B. G., ALFERI, A. A., MULLER, E. E. Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de leitões lactentes e recém-desmamados com diarreia em granjas do Estado do Paraná-Brasil. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, v.28, n.2, p.76-85, 2000.

BRITO, B.G.; TAGLIARI, K. C.; BERBEL, M. M.; FREIRE, R. L. Produção de enterotoxina termoestável, hemolisinas, colicina e fatores de colonização em amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia no sudoeste do Paraná. **Scientia Agrária**, v. 4. n. 1-2, p. 15-20, 2003.

BRUNINI, C.; SAMPAIO, C. Coord. **Homeopatía**: princípios, doutrina e farmácia IBEHE. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Mythos, 1993. 315 p.

BURCH D. Problems of antibiotics resistance in pig in the UK. **In Practice**, v. 27, p. 37-43, 2005.

CALDERARO, F. F.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, A. J.; PENA, H. J. F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 29-34, 2001.

CAMERLINK, I.; ELLINGER, L.; BAKKER, E.J.; LAUTINGA, E.A. Homeopathy as replacement to antibiotics in the case of *Escherichia coli* diarrhoea in neonatal piglets. **Homeopathy**, v. 99, p. 57–62, 2010.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. R.; ALBERTHUM, F.; GOMBERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 215-228.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**. 36(3): 289-311, 2005.

CASEY, T. A.; NAGY, B.; MOON, H. W. Pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* that do not express K88, K99, F41 or 987P adhesions. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, p. 1488-1492, 1992.

COELHO, C. P.; D'ALMEIDA, V.; PEDRAZZOLI NETO, M.; DURAN FILHO, C.; FLORIO, J. C.; ZINCAGLIA, L. M. C. L.; BONAMIN, L. V. Therapeutic and pathogenetic animal models for *Dolichos pruriens*. **Homeopathy**, v. 95, p. 136–143, 2006.

COSTA, M. M.; SÁ E SILVA, M.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos microbianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios de suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 5-8, 2006.

COSTA, R. **Homeopatia atualizada**. 3. ed. Rio de Janeiro: Vozes, 1988. 274 p.

COSTA, M.M.; MABONI, F.;WEBER, S.S.; FERRONATO, A.I.; SCHRANK, I.S.; VARGAS, A.P.C. Patotipos de *Escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 509-516, 2009.

CRUMP, J. A.; LANGER, A. J.; GAGE, R.; BAYSINGER, M.; WITHERS, G.; TONEY, D.M.; HUNTER, S. B.; HOEKSTRA, M.; WONG, S. K.; GRIFFIN, P. M.; VAN GILDER, T.J. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 555-560, 2002.

CUNHA, M.L.; COELHO, C.F.; ABILEIRA, F.S.; GOULART DO, NASCIMENTO, L.G.; HINNAH, E.G.; OLIVEIRA, S. J. Diarréia em leitões da maternidade e creche em uma Unidade Produtora de Leitões (UPL) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Veterinária em Foco**. v.4, n.2, 2007.

DAY, C. E. I. Alternative medicine. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. Oxford: Andrews, 1992. chap. 59, p. 886-905.

DOUGHARI, J. H.; NDAKIDEMI, P. A.; HUMANOS, S. I.; BENNADE, S. Shiga toxins (Verocytotoxins). **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 11 p. 681-693 November, 2009.

DREYFUS, L. A.; HARVILLE, B.; HOWARD, D. E.; SHABAN, R.; BEATTY, D. M. MORRIS, S. J. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v. 90, p. 3202–3206. 1993.

FAIRBROTHER, J. F. *Escherichia coli* diarrhea. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**. 8th. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. p. 433-440.

FERNANDES, M. E.; BENEZ, S. M. **Utilização da Isoterapia (Plumbum em dinamização homeopática) no Tratamento de Saturnismo em papagaio (Amazona aestiva)**. 2007. Disponível em:

<<http://www.escoladehomeopatia.org.br/profissionaisveteCH3.htm>>. Acesso em: 04 set. 2007.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doença das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 30-41.

FERREIRA, R. L. **Deteção de micoplasmas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em produtos intermediários da vacina contra a febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/ Fiocruz**. 2007, 95 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Tecnologia de Imunobiológicos, Rio de Janeiro, 2007.

FIALHO, O. B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreio gênicas por PCR-Multiplex**. Paraná, 2008, 106 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, 2008.

FONTES, O. L.; SEVERINO, P.; CHAUD, M. V.; NASCIMENTO, G. G. F.; ALVES, M. L. F.; GUTIERREZ, M. A. Ação Terapêutica do Medicamento Homeopático em Ratas com Infecção Urinária por *Escherichia coli*. **Cultura Homeopática**, v. 4, n. 13, p. 9-14, 2005.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, p. 33-81.

GORDON, D. M.; FITZGIBBON, F. The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects. **Microbiology**, v. 145, p. 2663-2671. 1999.

GREGORI, F.; RUIZ, V. L. A.; BERSANO, J. G.; CENTOFANTI, T. Rotavíruses em criações de suínos. **O Biológico**, v. 66, p. 11-12, 2004. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_tecnicos/Rotavirusos.htm>. Acesso em: 03 ago. 2007.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V.; The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**. Warsaw, v. 13, p. 60-98, 1991.

HABRUN, B.; HUMKI, A.; JEMERSIC, L.; CVETNIC, Z.; MITAK, M. Antimicrobial resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in weaned pigs from large pig breeding farms in Croatia. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 18., 2004, Hamburg, Germany. **Proceedings...** Hamburg, 2004. 522 p.

HAHNEMANN, S. **Organon da arte de curar**. 6. ed. São Paulo: Robe, 1996. 248 p.

HIRSH, D. C. *Escherichia*. In: HIRSH, D. C.; Zee, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.63-68, 2003.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 63-68.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 88, p. 450-465, 2005.

JULIAN, O.A. **Materia medica of nosodes with repertory**. India: B. Jain Publishers, 1980: 722 p.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KENT, J. T. **Repertory of the homoeopathic materia medica**. India: B. Jain Publishers, 2006: 1542 p.

KIERS, J. L., NOUT, M. J. R., ROMBOUTS, F. M., NABUURS, M. J. A., VAN DER MEULEN, J. Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 311-315, 2002.

KITAKA, P. R., MOURA, C., LEITE, D. S. Genotypic determination of the virulence factors K99, 987p, F41, and their association with heat labile toxin I (LT-I); heat stable toxin I (ST-I) and heat stable toxin II (ST-II) in *Escherichia coli* isolated diarrheic piglets. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XXII, 2003, Florianópolis, Brasil. **Resumo ...**
Disponível em: < <http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xicongresso/cdrom/pdfN/623.pdf> >
Acesso em 22 maio 2010.

KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 54-60, 2008. Suplemento.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergeys manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams, Wilkins, 1994. 984 p.

LENNETE, E. H.; HANSLER JR., W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of clinical Microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology Press. 1985. 1149 p.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiologic Reviews**, v.6, p. 31-51, 1984.

LEUNG, K. T.; MACKERETH, R.; TIEN, Y.; TOPP, E. A comparison of AFLP and ERICPCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. **FEMS Microbiology Ecology**. n. 47, p.111-119, 2004.

LIU, M. **Orgânicos brasileiros mostram força no exterior**. Agricultura e Pecuária Orgânica ou Agroecológica. 2008. Disponível em:
<<http://www.zoonews.com.br/noticiax.php?idnoticia=145752>> Acesso em: 22 maio 2010.

LOCKIE, A.; GEDDES, N. Homeopatia- Principios e métodos de tratamento. 1. ed. São Paulo: Ática. 2001. 240 p.

LOPES-SAUCEDO, C.; CERNA, J. F.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUES, F. R.; TORRES, J.; TARR, P. L.; ESTRADA-GARCIA, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.9, p.127-131, 2003.

LUDKE, J. V.; BERTOL, T. M.; FIGUEIREDO, E. A. P.; WOLOSZYN, N.; AJALA, L. C. Avaliação de dietas para sistema orgânico de criação de suínos. **Revista Brasileira Agroecologia**, v. 2, n. 1, 2007.

MACÊDO, N. R.; MENEZES, C. P. L.; LAGES, A. P.; RISTOW, L. E.; REIS, A.; GUEDES, R. M. C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1117-1123, 2007.

MAASS, N.; BAUER, J.; PAULICKS, B. R.; BOHMER B. M.; ROTH-MAIER, D. A. Efficiency of Echinacea purpurea on performance and immune status in pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, p. 244-252, 2005.

MACHADO FILHO, L. C. P.; SILVEIRA, M. C. A. C.; HÖTZEL, M. J.; MACHADO, L. C. P. Produção agroecológica de suínos – Uma alternativa sustentável para a pequena propriedade no Brasil. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUINA, 2., 2001. [Resumo...]. 2001.

MENIN, Á.; RECK, C.; WOLFF, C.; BIERHALS, T.; COSTA, U. M.; KLEIN, C. S.; VAZ, E. K. Fenotipia e concentração inibitória mínima (CIM) em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia nas fases de maternidade, creche, crescimento e terminação. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n. 3, p. 255-261, 2008.

MÉRIADÉC, M. C. As diáteses Homeopáticas. In: CORNILLLOT, P. **Tratado de homeopatia**. Tradução Jeni Wolf. São Paulo: Artmed, 2005. p. 93-120.

MERLINI, L. S. **Utilização de Homeopatia 100[®] em dieta para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2006. 50 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

MICHELON, A.; MICHELON, M.; SIMIONATTO, S.; LAGRANHA, V. L.; CONCEIÇÃO, F. R.; VAZ, E. K.; CERQUEIRA, G. M.; DELLAGOSTIN, E. A. Effect of the Kozak sequence on seroconversion of mice immunized with a DNA vaccine against swine colibacillosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 85-87, 2003. Supplement, 1.

MIELE, M.; MACHADO, J. S. Panorama da carne suína brasileira. **Especial Suinocultura** Janeiro de 2010. Disponível em: < http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/documentos-tecnicos/Especial_Suinocultura_-_Agroanalysis.pdf >. Acesso em: 22 maio 2010.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v. 30, p. 259-284, 1999.

NAKAZATO, G.; OSUGUI, L.; DE ÁVILA, F. A.; DE CASTRO, A. F. P. Identificação pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR) de amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) isoladas de cães com diarreia e normais no Estado de São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 218-223, 2001.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NIJSTEN, R.; LONDON, N.; BOGAARD, A.; STOBBERINGH, V.D. Antibiotic resistance of enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. **Veterinary Quarterly**, v. 15, n. 4, p. 152-157, 1993.

ORSKOV, F.; OSRKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 699-703, 1992.

PACHECO, A. B. F.; GUTH, B. E. C.; SOARES, K. C. C.; NISHIMURA, L.; ALMEIDA DE, D. F.; FERREIRA, L. C. S. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1521-1525, 1997.

PARMA, A.E.; SANZ, M.E.; VIÑAS, M.R.; CICUTA, M.E.; BLANCO, J.E.; OEHRINGER, S.I.; VENA, M.M.; ROIBON, W.R.; BENITEZ, M.C.; BLANCO, J.; BLANCO, M. oxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 269-276, 2000.

PINTO, S. A. G.; BOHLAND, E.; COELHO, C. P.; MORGULIS, S. M. F. A.; BONAMIN, L. V. Um modelo animal para o estudo da *Chamomilla* em stress e depressão: estudo piloto. **Homeopathy**. v. 97, n. 3, p. 141-144, 2008.

PRADA, I. L. S.; MASSONE, F.; CAIS, A.; COSTA, P. E. M.; SENEDA, M. M. Bases Metodológicas e neurofuncionais da avaliação de ocorrência de dor/sofrimento em animais. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2002.

PRESCOTT, J. F. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In: PRESCOTT J. F., BAGGOT, J. D.; WALKER R. D. (Ed.). **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. 3. ed. Ames: Iowa University Press, 2000. p. 27-49.

PUSTIGLIONE, M. **17 Lições de homeopatia – Estudos avançados do organon e leitura atualizada dos “Textos Maiores” de Samuel Hahnemann**. 1. ed. São Paulo: Typus, 2000. 252 p.

PUSTIGLIONE, M. **O Moderno organon da arte de curar de Samuel Hahnemann**. 1. ed. São Paulo: Typus, 2001. 320 p.

QUADRI, F.; SVENNERHOLM, A. M.; FARUQUE, A. S. G.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p. 465-483, 2005.

QUINN P. J.; MARKEY B. K.; CARTER M. E.; DONNELLY W. J.; LEONARD F. G. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Rio Grande do Sul: Artmed, 2005. 512 p.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W.; Diseases caused for *Escherichia coli*. In: RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. M. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed. London. W.B. Saunders, 2000. p. 779-809.

RIBEIRO FILHO, A. **Novo repertório de sintomas homeopático**. 2. ed. São Paulo: Robe, 2000. 1202 p.

RIZZARDI, R.; GOMES, O.P.; REAL, M.R. Estudo comparado de tratamentos preventivos: alopático e homeopático, na incidência de diarreias em leitões até a desmama. In: COMBRAVET, 35., 2008, Gramado- RS. Anais... 2008.

ROCHA P. S. **Homeopatia conceitos e preconceitos** - Palestra proferida no Hospital Psiquiátrico de Vila Mariana, São Paulo, 1992. Disponível em: <<http://www.psrocha.med.br/conceitos.htm>>. Acesso em: 16 março 2004.

RUIZ-VEGA, G.; POITEVIN, B.; PE'RES-ORDAZ, L. Histamine at high dilution reduces spectral density in delta band in sleeping rats. **Homeopathy**, v. 94, p. 86–91, 2005.

SAINTE-LAUDY, J.; BELON, P. Improvement of flow cytometric analysis of basophil activation inhibition by high histamine dilutions. A novel basophil specific marker: CD 203c. **Homeopathy**, v. 95, p. 3–8, 2005.

SAYLERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994. p. 190-204.

SCHIERACK, P.; WALK, N.; REITER, K.; WEYRAUCH, K. D.; WIELER, L. H. Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs **Microbiology**, v. 153, p. 3830–3837, 2007.

SCHWARS, P.; CARDOS, M.; CALVEYRA, J.; SELLA, A. B.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. **Mortalidade de leitões em aleitamento associada à injeção com penicilina**. UFRGS – Setor de Medicina Veterinária Preventiva. 2007. Disponível em: <http://www.suinos.com.br/mostra_noticia.php?id=1856&comunidade=Curiosidade> ou <<http://www.suinopaulista.com.br/7,1,26,10656.asp>> Acesso em: 20 maio. 2010.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiological Reviews**. v. 60, p.167-215, 1996.

SOARES, A. A. D. **Dicionário de medicamentos homeopáticos**. São Paulo: Santos Livraria Editora. 2005. 1301p.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS D. E. S. N. Doenças dos suínos. Goiânia: Editora Cãnone, 2007. 768 p.

SOTO, F. R. M.; VUADEM E. R.; BENITES, N. R.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BERNARDI, F.; COELHO, C. P.; VASCONCELLOS, S. A. Implantação da homeopatia e avaliação dos índices de produtividade de uma granja comercial de suínos comparado com a alopatia na fase de recria e terminação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 7-114, 2007.

SUINO.com. 12 de maio de 2009. Disponível em:

<<http://www.suino.com.br/BINoticia.aspx?codigoNot=U6UOUe1QbNA=&title=SUINO+ORGANICO:+DE+NICHO+A+PADRAO>> Acesso em: 22 maio 2010.

STELLA, A. E. **Fatores de virulência em isolados de Escherichia coli provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil**. 2009. 70vp. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

SUSSMAN, M. **Escherichia coli**: mechanisms of virulence. United Kingdom. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 639 p.

TALAMINI, D. J. D.; MARTINS, F. M.; PINHEIRO, A. C. A. **Rentabilidade da terminação de suínos no Estado de Santa Catarina**. Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 2005. p. 1-5. (Comunicado Técnico, 404).

TALAMINI, D. J. D.; MARTINS, F. M.; ARBOIT, C.; WOŁOZSYN, N. Custos agregados da Produção integrada de suínos nas fases de leitões e de terminação. 2006. Disponível em: <<http://www.custoseagronegocioonline.com.br/especialv2/custos%20agregados%20de%20producao.pdf>> Acesso em: 06 nov. 2009.

TEIXEIRA, M. Z. Pesquisa clínica em homeopatia: evidências, limitações e projetos. **Pediatria**. São Paulo, v. 30, n 1, p. 27-40. 2008.

TENAILLON, O.; DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolucionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Trends in Microbiology*, v.12, n 6, p. 264-270, 2004.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L. C. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. S.; SOUZA, C. P. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 28, p. 215-228.

TURNER, S. M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L. M.; HENDERSON, I. R. Weapons of mass destruction: virulence factor of the global killer enterotoxigenic Escherichia coli. **FEMS Microbiology Letters**, v. 263, p. 10-20, 2006.

VAN WASSENHOVEN, M. Evidências da eficácia da homeopatia (Evidence of the Effectiveness of homeopathy). **Cultura Homeopática**, n. 20, p. 27-31, 2007.

VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. s147-s150, 2009. Supplement, 1.

VELKERS, F. C.; LOO, A. J. H.; MADIN, F.; VANECK, J. H. H. Isopathic and pluralist homeopathic treatment of commercial broilers with experimentally induced colibacillosis. **Research in Veterinary Science**, v.78, n. 1, p. 77-83, 2005.

VIDOTTO, M. C.; LIMA, N. C. S.; FRITZEN, J. T. T.; FREITAS, J. C.; VENÂNCIO, E. J.; ONO, M. A. Frequency of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea in the North Parana State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, São Paulo, 2009.

VIEGAS, S. A. R. A. **Contribuição ao estudo da diarreia suína ocasionada por *Escherichia coli* enterotoxigênicos**. 1986. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

VUADEN, E. R. **Homeopatia na suinocultura**. 2005. 97 f. Monografia (Especialização em Homeopatia Veterinária) – Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, Centro de Ensino Superior de Homeopatia, São Paulo, 2005.

WILSON, R. A.; FRANCIS, D. H. Fimbriae and enterotoxins associated with *E. coli* serogroups isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, p. 213-217, 1986.

WITZANY, G. Review: Marcello Barbieri (Ed) (2007) Introduction to Biosemiotics. The new biological synthesis. Dordrecht: Springer. **TripleC - Cognition, Communication, Cooperation**. v. 5 n. 3, p. 104-109, 2007.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.

ZHANG, W.; BERBEROV, E. M.; FREELING, J.; HE, D.; MOXLEY, R. A.; FRANCIS, D. H. Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3107–3114, 2006.

ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 145-152, 2007.

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; SHERE, J.; GARBER, L. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 61, p. 1290-1293, 1995.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S. N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. s81-s86, 2008. Supplement, 1.