

Silvia de Araújo França

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E TERAPÊUTICOS
DA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA SUÍNA**

Dissertação apresentada no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do certificado de mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Patologia animal

Orientador: prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2007

F814a França, Silvia de Araújo, 1974-
Aspectos epidemiológicos e terapêuticos da enteropatia proliferativa suína / Silvia de
Araújo França. –2007
61 p.: il.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1.Suíno – Doenças – Tratamento - Teses. 2.Patologia veterinária – Teses.
3.Epidemiologia – Teses. I.Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II.Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III.Título.

CDD – 636.408 96

Dissertação defendida 28 de fevereiro de 2007, e avaliada pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes
(Orientador)

Dr. Glauber de Souza Machado

Profa. Zélia Inês Portela Lobato

Prof. Ernane Fagundes do Nascimento

Dedicada, com todo o meu amor,
ao meu MARAVILHOSO Deus e aos meus pais, Eustáquio e Ceci,
pelo que são em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados avós e irmãos, Alexandre e Daniel, e a toda minha família, pelo amor e pelo carinho.

Ao meu orientador, Professor Roberto Guedes, incansável na tarefa de ensinar. Não tenho palavras para lhe agradecer pelas oportunidades, confiança e ensinamentos.

Aos meus queridos professores, companheiros de trabalho e amigos do setor de Patologia: Profa Rogéria, Prof Renato Lima, Profa Roselene, Marilene, Adão, Tatiane Paixão, Alcina, Núbia, Júlio César, Eduardo, Patrícia, Mel, Sílvia, Fábio, Fabiana, Regina, Natália, Wériton, ..., por todos os momentos compartilhados.

Ao querido prof. Ernane Fagundes do Nascimento, à profa. Zélia Lobato e ao Dr. Glauber Machado pela participação na banca examinadora e grande contribuição para a melhoria deste trabalho.

À Integrall - Soluções em Produção Animal Ltda., pela parceria.

À CEVA Saúde Animal Ltda., pelo financiamento do experimento da leucomicina.

À Sanphar Química e Farmacêutica Ltda., pelo financiamento do experimento da AIVT.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários, professores da EV e a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Muitíssimo obrigada!

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1 <u>CAPÍTULO 1: ENTEROPATIA PROLIFERATIVA SUÍNA (EPS) - REVISÃO DE LITERATURA</u>	14
1.1 INTRODUÇÃO.....	15
1.2 ETIOLOGIA.....	15
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.4 PATOGÊNESE	17
1.5 SINAIS CLÍNICOS	18
1.6 PATOLOGIA	19
1.7 DIAGNÓSTICO.....	21
1.8 CONTROLE.....	22
1.8.1 Modelos experimentais para avaliação da eficiência de antimicrobianos	23
1.8.2 Antimicrobianos eficientes no controle e tratamento da EPS	24
1.9 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	25
2 <u>CAPÍTULO 2: SUSCEPTIBILIDADE DE PARDAIS, <i>PASSER DOMESTICUS</i>, A INFECÇÃO PELA BACTÉRIA <i>Lawsonia intracellularis</i></u>	26
RESUMO.....	27
2.1 INTRODUÇÃO.....	27
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	27
ANIMAIS.....	28
INOCULAÇÃO.....	29
DETECÇÃO DE <i>L. intracellularis</i> NAS FEZES DE PARDAIS.....	30
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IHQ.....	30
ANÁLISE DE DADOS.....	30
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
2.4 CONCLUSÕES.....	33
3 <u>CAPÍTULO 3: EFICÁCIA DA LEUCOMICINA (LEUCOMAG 30% PR) NO CONTROLE DA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA EM LEITÕES EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS</u>	34

	RESUMO.....	35
3.1	INTRODUÇÃO.....	35
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
	PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	35
	ANIMAIS.....	36
	Piloto I.....	36
	Piloto II.....	36
	Experimento	37
	INOCULAÇÃO.....	38
	AVALIAÇÃO CLÍNICA E DE DESEMPENHO.....	38
	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, HISTOLÓGICA E IHQ.....	38
	AVALIAÇÃO SOROLÓGICA.....	38
	AVALIAÇÃO DE <i>L. intracellularis</i> EM AMOSTRAS FECAIS.....	38
	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
	Piloto I.....	39
	Piloto II.....	39
	Experimento propriamente dito.....	39
	OBSERVAÇÕES CLÍNICAS.....	40
	DESEMPENHO.....	40
	RESULTADOS ANATOMO-PATOLÓGICOS.....	42
3.4	CONCLUSÕES.....	45
4	<u>CAPÍTULO 4: EFICÁCIA DO TARTARATO DE ACETIL-ISOVALERIL- TILOSINA (AIVLOSIN®) NO CONTROLE DA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA EM LEITÕES EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS</u>	46
	RESUMO.....	47
4.1	INTRODUÇÃO.....	47
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
	ANIMAIS.....	47
	INOCULAÇÃO.....	48
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
	OBSERVAÇÕES CLÍNICAS.....	48
	DESEMPENHO.....	49
	RESULTADOS ANATOMO-HISTOPATOLÓGICOS.....	51
4.4	CONCLUSÕES.....	54
	CONCLUSÕES GERAIS.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Peso médio e ganho de peso diário (GPD), em quilos, dos grupos não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina em diferentes períodos após inoculação	41
Tabela 3.2	Consumo médio diário (CMD) de ração, em gramas, e conversão alimentar (CA) dos grupos não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina em diferentes períodos após inoculação	41
Tabela 3.3	Gravidade de lesões macroscópicas e média de extensão de lesão, em cm, à necropsia, por animais afetados e pelos grupos não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina	42
Tabela 3.4	Intensidade de infecção por <i>L. intracellularis</i> em fragmentos de íleo baseado na marcação por IHQ em animais dos grupos não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina	43
Tabela 4.1	Peso médio e GPD, em quilos, dos grupos não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3) em diferentes períodos após a inoculação	50
Tabela 4.2	CMD de ração, em gramas, e CA dos grupos não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3) em diferentes períodos após a inoculação	50
Tabela 4.3	Gravidade de lesões macroscópicas e média de extensão de lesão, em cm, à necropsia, por animais afetados e pelos grupos não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3)	51
Tabela 4.4	Intensidade de infecção por <i>L. intracellularis</i> em fragmentos de íleo baseado na marcação por IHQ em animais dos grupos não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3)	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação esquemática do curso clínico, eliminação de bactéria nas fezes decorrente da infecção pela <i>L. intracellularis</i> e resposta imune em leitões experimentalmente infectados. Adaptado de Gebhart e Guedes, 2004. FC: forma crônica; FA: forma aguda.	19
Figura 1.2	Intestino delgado de leitões infectados com <i>L. intracellularis</i> . (A) Enteropatia proliferativa hemorrágica com sangue e coágulo no lúmen, além do típico espessamento da mucosa. (B) Lesão macroscópica típica da forma crônica de enteropatia proliferativa, com marcante espessamento da mucosa que apresenta pregas bastante evidentes.	20
Figura 1.3	Microfotografia de lesão histológica típica de EP, caracterizada por proliferação de células epiteliais de criptas intestinais e ausência de células calciformes. A (100x) e B (400x)	21

Figura 1.4	Microfotografia de seções histológicas de íleo de suíno com EP à IHQ para <i>L. intracellularis</i> , utilizando como cromógeno o AEC. Pontos em vermelho no ápice de enterócitos de criptas intestinais (seta larga) e em macrófagos (seta fina) da lâmina própria representam o antígeno bacteriano. (200x)	22
Figura 1.5	Estrutura química da eritromicina (A), da leucomicina (B) e da aivosina (C).	25
Figura 2.1	Local no qual os pardais ficavam alojados, em gaiolas individuais, desde a chegada até a eutanásia.	29
Figura 2.2	Pardal, <i>Passer domesticus</i> , sendo inoculado com cultura pura de <i>L. intracellularis</i> através de sonda.	29
Figura 2.3	Microfotografia de íleo de hamster experimentalmente inoculado. Pontos vermelhos no ápice de enterócitos representam o antígeno bacteriano (IHQ. 400x).	30
Figura 2.4	Necropsia de pardal (A) e coleta de intestinos inteiros para IHQ (B).	31
Figura 2.5	Microfotografia de íleo de Pardal, experimentalmente inoculado, corada pela técnica de IHQ com anticorpos específicos para <i>L. intracellularis</i> , usando AEC como cromógeno. Pontos vermelhos no citoplasma de macrófago representam o antígeno bacteriano (200x).	32
Figura 3.1	Baias suspensas de creche com piso ripado, cocho de depósito e bebedouro do tipo chupeta localizadas no Hospital Veterinário da UFMG utilizadas para condução do experimento.	37
Figura 3.2	Evolução cronológica da média de escores clínicos baseados na consistência das fezes em animais do grupo não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina.	40
Figura 3.3	Desuniformidade entre leitões no grupo T1, não medicado.	41
Figura 3.4	Intestino delgado de leitões inoculados experimentalmente com homogenado de mucosa contendo <i>L. intracellularis</i> . (a) Lesão macroscópica típica da forma crônica de enteropatia proliferativa, com marcante espessamento da mucosa que apresenta pregas bastante evidentes. (b) Enteropatia proliferativa hemorrágica com sangue e coágulo no lúmen, além do típico espessamento da mucosa.	42
Figura 3.5	Microfotografia de íleo coradas pela IHQ utilizando anticorpo específico para <i>L. intracellularis</i> . (A) Grau 1 de marcação, com até 25% das criptas infectadas pela bactéria (400x); (B) Grau 2, com até 50% das criptas infectadas (400x); (C) Grau 3, até 75% das criptas infectadas (200x); e Grau 4, com quase a totalidade das criptas infectadas (200x).	43
Figura 4.1	Evolução cronológica da média de escores clínicos baseados na consistência das fezes em animais do grupo não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3).	49
Figura 4.2	Desuniformidade entre leitões do grupo T1, inoculados e não medicados.	50

Figura 4.3 EP na forma crônica. (A) Intestino delgado. Observa-se intensa congestão e edema de mesentério adjacente ao íleo. (B) Intestino delgado e (C) intestino grosso. Observa-se intenso espessamento de mucosa intestinal com marcante protrusão de pregas. 52

LISTA DE ABREVIACÕES

ADG	Average daily gain
AEC	3-amino-9etilcarbazol
AIVT	Acetil-isovaleril-tilosina
CA	Conversão alimentar
CMR	Consumo médio de ração
EP	Enteropatia proliferativa
EPS	Enteropatia proliferativa suína
FC	Feed conversion
GPD	Ganho de peso diário
HE	Hematoxilina e eosina
IHQ	Imunoistoquímica
IPX	Imunoperoxidase
MIC	Concentração inibitória mínima
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SFB	Soro fetal bovino
SPG	Sacarose, fosfato e glutamato

RESUMO

Esta dissertação inclui três experimentos distintos. No primeiro, avaliou-se a susceptibilidade de pardais a infecção experimental com culturas puras de *L. intracellularis*. Antígeno bacteriano somente foi detectado na lâmina própria de dois pardais à IHQ, e à PCR, todas amostras de fezes foram negativas. Assim, aparentemente, o pardal não é importante na epidemiologia da EP. Outros dois trabalhos foram realizados para testar a eficiência de dois antimicrobianos, leucomicina e acetil-isovaleril-tilosina (AIVT), no controle da EPS. Utilizaram-se 90 leitões de cinco semanas de idade, com 30 leitões por tratamento. No experimento da leucomicina, os grupos foram T1, inoculados com *L. intracellularis* e não medicados, T2 e T3, inoculados e medicados na ração com 90 ppm e 180 ppm de leucomicina, respectivamente. Todos os leitões foram eutanasiados no dia 23. Sinais clínicos foram mais evidentes nos T1 que nos T2 e T3. Animais T2 e T3 apresentaram melhor GPD (0,419g e 0,438g vs. 0,339g) e CA (1,63 e 1,44 vs. 1,83) que os T1. Já no experimento com AIVT, T2 foram inoculados e medicados com 50 ppm de AIVT e T3 inoculados e medicados com 100 ppm de tiamulina. Sinais clínicos foram mais evidentes no T1 que nos T2 e T3. O GPD (0,541g e 0,568g vs. 0,451g) e a CA (1,58 e 1,59 vs. 1,84) foram melhores nos T2 e T3 que nos T1, respectivamente. A média do comprimento de lesão, por leitão, de T1, T2 e T3 foi 94,9, 6,1 e 6,8 cm, respectivamente. Assim, reproduziu-se a doença experimentalmente e a eficiência da leucomicina nas doses de 90 e 180 ppm e do AIVT na dose de 50ppm foi demonstrada.

Palavras-chave: suíno; pardal; enteropatia proliferativa; *Lawsonia intracellularis*; epidemiologia; antimicrobianos; controle.

ABSTRACT

This dissertation comprises three experiments. The first one, evaluated the house sparrow susceptibility to *L. intracellularis* experimental infection. Only two sparrows had discrete antigen labelling in the lamina propria and all fecal samples were negative by PCR. Thus, it seems that house sparrows are not important in the epidemiology of PPE. Another two studies were conducted to evaluate the efficacy of leucomycin and acetyl-isovaleryl-tylosin (AIVT) for the prevention and control of PPE. Ninety healthy five week-old pigs were balanced by weight and then randomly allotted to three groups, with 30 pigs per treatment. In the study with leucomycin, the groups were: T1, no medication/challenged; T2, 90 ppm of leucomycin/challenged; T3, 180 ppm of leucomycin/challenged. All animals were challenged with *L. intracellularis* organisms. Clinical presentation of the disease was more evident in T1 than in T2, T3 animals. T2 and T3 animals had higher ADG (0.419g and 0.438g vs. 0.339g) and better FC (1.63 and 1.44 vs. 1.83) than T1. In the study with AIVT, the groups were: T1, no medication/challenged; T2, 50 ppm of AIVT /challenged; T3, 100 ppm of tiamulin/challenged. Clinical presentation of the disease was more evident in T1 than in T2 and T3. T2 and T3 animals had higher ADG (0.541g and 0.568g vs. 0.451g) and better FC (1.58 and 1.59 vs. 1.84) than T1. Average lesion length in T1, T2 and T3 was 94.9, 6.1 and 6.8 cm, respectively. The reproduction of the disease was successful. The efficacy of leucomycin, at the doses of 90 and 180 ppm, and of AIVT at the dose of 50 ppm, was demonstrated.

Keywords: pigs; house sparrow; proliferative enteropathy; *Lawsonia intracellularis*; epidemiology, antimicrobials; control.

INTRODUÇÃO GERAL

No primeiro capítulo desta dissertação foi realizada uma revisão de literatura abrangendo diversos aspectos da EP, desde caracterização e cultivo “in vitro” da bactéria causadora aos métodos de tratamento dessa doença, com destaque especial para epidemiologia e controle.

A epidemiologia da doença é pouco conhecida. Ocorrência de surtos de enteropatia proliferativa em granjas nunca antes povoadas e que receberam animais de reposição de granjas sem história clínica da enfermidade tem sido constatada, gerando a hipótese da existência de vetores biológicos ou mecânicos. Apesar da descrição de EP em aves, como emu e avestruz, não existem trabalhos avaliando o papel de espécimes da ordem Passeriformes na epidemiologia da doença.

Pelas razões descritas anteriormente, realizou-se o experimento descrito no capítulo 2. Este teve como objetivo avaliar a possibilidade de pardais serem susceptíveis (*Passer domesticus*) à infecção experimental pela *L. intracellularis*, e assim verificar a importância dessa espécie na epidemiologia da EP.

Por ser a utilização de antimicrobianos a forma mais utilizada no controle da EP, no capítulo 3, descreve-se o estudo realizado com o objetivo de avaliar a eficiência de um macrolídeo, a leucomicina, administrada na ração, nas concentrações de 90 e 180 ppm, no controle da doença em leitões experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*. No capítulo 4, relata-se o estudo no qual avaliou-se a eficiência do AIVT, antimicrobiano do grupo dos macrolídeos, no controle da EP em leitões experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*, à semelhança do que foi feito no capítulo 3, para leucomicina.

Capítulo 1:

ENTEROPATIA PROLIFERATIVA SUÍNA

- REVISÃO DE LITERATURA -

1.1. INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa (EP) é uma patologia entérica, infecto-contagiosa que afeta suínos (Biester e Schwarte, 1931; Rowland e Rowntree, 1972; Cooper et al, 1997a; Guedes, 2002; Lindecrona et al, 2002) e outras espécies animais (Fox et al, 1994; Cooper et al, 1997ab; Lawson e Gebhart, 2000; Tomonová et al, 2003). O agente etiológico da EP, em todas as espécies nas quais foi diagnosticada, é a bactéria intracelular obrigatória *Lawsonia intracellularis* (McOrist et al, 1993; McOrist et al, 1995a).

A EP foi descrita pela primeira vez por Biester e Schwarte (1931) e somente em 1974 (Rowland e Lawson, 1974) associou-se a doença a uma bactéria intracelular curva, na época identificada como do gênero *Campylobacter*. Entretanto, em 1995, McOrist et al. (1995a) demonstraram que a bactéria causadora da EP era uma nova espécie, de um novo gênero. Foi então proposto o nome *Lawsonia intracellularis*, dentro da família das Desulfovibrionaceas.

A EP tem sido diagnosticada em praticamente todos os países de expressiva produção suinícola, acarretando perdas e impacto econômico significativo em diferentes fases do sistema de produção (Chang et al., 1997; McOrist et al., 1997c; Chiriboga et al., 1999; Stege et al., 2000). Estas perdas são representadas por redução do ganho de peso e diarreia em animais em crescimento, forma crônica; mortalidade de animais de reposição ou próximo à idade de abate, forma aguda; e, na forma subclínica, expressiva diminuição de desempenho dos animais infectados, que são a principal fonte de infecção dos animais susceptíveis (Lawson e Gebhart, 2000).

Foi estimado um custo anual de 20 US\$ por matriz na Austrália (Lawson e McOrist,

1993) e de 20 milhões de dólares anuais nos Estados Unidos em decorrência da EPS (Winkelman e Dee, 1996). De acordo com resultados do monitoramento sanitário executado nos Estados Unidos, a enfermidade é a doença mais comum em animais de crescimento e terminação, ocorrendo em 1/3 das unidades de produção de suínos norte americana e reportada em 75% dos grandes sistemas de produção (Highlights, 2002). Depois de colibacilose, EPS foi a doença entérica mais frequentemente diagnosticada no Laboratório de referência em Alberta, Canadá (Wilson et al, 2002).

1.2. ETIOLOGIA

A *Lawsonia intracellularis*, agente causador da EP, por ser um microorganismo intracelular obrigatório (McOrist et al, 1995a; Guedes, 2002; McCluskey et al., 2002; Yeh et al, 2006), necessita para seu crescimento “in vitro” de cultivos celulares contendo células ainda em multiplicação, condições semelhantes as necessárias para crescimento viral (Lawson et al, 1993). As linhagens celulares mais frequentemente utilizadas para manutenção e propagação da *L. intracellularis* “in vitro” são a IEC-18, células intestinais de rato; a McCoy, células de camundongo com morfologia semelhante a fibroblasto; e a INT-407, linhagem celular derivada de intestino de feto humano (Guedes, 2002). Além disso, são necessários níveis de gases similares aos encontrados no intestino, e a utilização de estufas com oxigênio reduzido e altos níveis de nitrogênio (Lawson et al, 1993; McOrist et al, 1995a).

A *L. intracellularis* é uma pequena bactéria curva, gram negativa e microaerófila. Um flagelo longo e unipolar pode ser visualizado, por microscopia eletrônica. No entanto esse flagelo não foi observado quando a bactéria se encontra no citoplasma

de enterócitos (Lawson e Gebhart, 2000), mas o mecanismo de penetração não é conhecido. Em maio do ano de 2006, foi finalizado o sequenciamento completo do genoma dessa bactéria, que é constituído por um cromossomo circular, identificado por NC 008011, no “Genome” do NCBI, e composto por 1.457.619 nucleotídeos, e três plasmídios, denominados plasmídio 1 (NC 008012), com 27.048 nucleotídeos, plasmídio 2 (NC 008013), com 39.794 nucleotídeos, e plasmídio 3 (NC 008014), com 194.553 nucleotídeos, apresentando no total 1.344 genes.

O isolamento da *L. intracellularis* a partir de enterócitos infectados é muito difícil, pois essas células são retiradas de um ambiente altamente contaminado, sendo necessário que se façam filtrações e centrifugações com o objetivo de se retirar do material a ser utilizado a maior quantidade possível de microrganismos contaminantes. Posteriormente, deve-se utilizar antimicrobianos de ação restrita, que apresentem ação somente extracelular e que sejam ineficientes contra *L. intracellularis* (McOrist et al., 1995b; McOrist et al., 1999).

1.3. EPIDEMIOLOGIA

A ocorrência de EP, causada pela infecção por *L. intracellularis*, foi descrita primeiramente em suínos (Biester e Schwarte, 1931) e posteriormente em hamster (Johnson e Jacoby, 1978), em cobaio (Elwell et al., 1981), equino (Duhamel e Wheeldon, 1982), rato (Vandenberghe et al., 1985), furão (Fox e Lawson, 1988), raposa (Ericksen et al., 1990), cão (Leblanc et al., 1993), coelho (Hotchkins et al., 1996), avestruz, veado (Cooper et al., 1997ab), emu (Lemarchand et al., 1997), macaco (Klein et al., 1999), camundongo (Smith et al., 2000), bovino, porco espinho e girafa (Herbst et al., 2003). Estudo comparativo entre as amostras isoladas de diferentes espécies animais,

baseado no sequenciamento do DNA ribossomal 16S da bactéria, não demonstrou diferença entre elas, caracterizando a *L. intracellularis* como o agente etiológico da doença em todas as espécies acometidas (Cooper et al., 1997a). Especulou-se que a *L. intracellularis* seria o agente etiológico da doença intestinal inflamatória humana, também conhecida por doença de Crown, por essa última apresentar características anatomo-histopatológicas similares a EP. Entretanto, em estudo recente não foi possível a identificação da bactéria em amostras coletadas de pacientes com a doença (Michalski et al., 2006).

A infecção de animais susceptíveis ocorre por via oro-fecal (Lawson e Gebhart, 2000). Animais infectados podem eliminar até cerca de 10^8 organismos de *L. intracellularis* por grama de fezes (Smith e McOrist, 1997). Esta eliminação da bactéria nas fezes pode ocorrer por um período de até 3 meses em alguns animais (Guedes et al., 2002b; Guedes e Gebhart, 2003b). A colonização intestinal pela *L. intracellularis* foi detectada em animais inoculados oralmente com fezes mantidas a 23°C por 14 dias, demonstrando que a bactéria pode sobreviver por até 2 semanas à temperatura ambiente (Collins et al., 2000). Inóculo contendo 10^3 organismos de *L. intracellularis* provocou infecção em leitões (Collins et al., 2001), demonstrando que um número reduzido de bactérias é suficiente para infectar animais susceptíveis. Com base nesses e outros trabalhos científicos, demonstrou-se que *L. intracellularis*, apesar de ser um organismo muito exigente para o crescimento e manutenção “in vitro”, é eliminado em grande quantidade e por um longo período nas fezes de animais infectados, resiste por certo tempo no meio ambiente e não necessita de uma dose infectante elevada. Por esses motivos, não causa surpresa o fato de que estudos sorológicos de prevalência da enfermidade venham mostrando índices entre 60 e 90%

de rebanhos positivos em diferentes países (Lawson e Gebhart, 2000).

1.4. PATOGÊNESE

Em estudos “in vivo” da doença, inclusive de aspectos patogênicos, é necessário que se faça a reprodução da doença, através da inoculação dos animais susceptíveis com cultura pura de *L. intracellularis* ou com raspado de mucosa intestinal de animais doentes (McCluskey et al., 2002). Ambos apresentam vantagens e desvantagens. A utilização de cultura pura é mais segura, pois sabidamente se inocula apenas um microrganismo, a *L. intracellularis*, utiliza-se um menor volume de inóculo, pois este é concentrado, por outro lado, é mais onerosa, visto que envolve purificação e cultivo de uma bactéria extremamente fastigiosa. A utilização de raspado de mucosa envolve processos simples e baratos, entretanto menos seguros, uma vez que será inoculado no animal desafiado grande volume de raspado total de mucosa intestinal, que pode conter inúmeros microrganismos além da *L. intracellularis*.

Através de estudo “in vitro”, McOrist et al. (1995b) demonstraram que 10 minutos após exposição à bactéria, esta pode ser encontrada em íntimo contato com a membrana de células eucariotas permissíveis à infecção. Uma hora após exposição, a bactéria pode ser encontrada em vacúolos no citoplasma de células eucariotas. Três horas após inoculação é observada livremente no citoplasma de células infectadas, onde se multiplica por divisão binária e, cinco a 10 dias após infecção, protusões celulares repletas do microrganismo se rompem liberando-o no meio extracelular. A proliferação celular, característica marcante da EP, não é reproduzida “in vitro”. Em decorrência disto, experimentos “in vivo” se fazem necessários.

Pouco se sabe sobre os mecanismos celulares de infecção pela *L. intracellularis* (McOrist et al., 1997a; McCluskey et al., 2002). Sabe-se que essa bactéria tem tropismo por células epiteliais intestinais, e a maior consequência patológica da infecção é a hiperplasia desses enterócitos (Lawson e Gebhart, 2000). Mas, o mecanismo através do qual a *L. intracellularis* se adere e penetra a célula não é conhecido. Entretanto, McCluskey e colaboradores identificaram o gene denominado Lsa A que é transcrito e traduzido pela *L. intracellularis* durante a infecção, com possível importância durante a adesão e entrada da bactéria nas células epiteliais imaturas. Esse gene é responsável pela síntese de algumas proteínas de superfície que se ligariam a receptores específicos presentes na superfície apical de enterócitos (McCluskey et al., 2002). Há indícios de que possa haver uma associação de eventos que promova a penetração da bactéria na célula alvo. Primeiramente, ocorre a interação entre antígenos de superfície da *L. intracellularis* e receptores específicos presente na superfície externa apical do enterócito imaturo (McOrist et al., 1997a). Posteriormente, através de processo endocítico, envolvendo polimerização de actina pela célula epitelial, a bactéria penetra na célula (Lawson et al., 1995). Especula-se que a *L. intracellularis* produza toxinas que permitam que esta escape do vacúolo endocítico e da digestão lisossômica e possa se multiplicar no citoplasma do enterócito infectado, livremente (Guedes et al., 2003c).

A primeira lesão a ser observada na infecção pela *L. intracellularis* é a hiperplasia da mucosa intestinal com progressiva substituição de enterócitos maduros, colunares e absorptivos das vilosidades, por células indiferenciadas, semelhantes as células das criptas intestinais (Smith e McOrist, 1997). A hiperplasia de enterócitos está diretamente

relacionada à presença da *L. intracellularis*, ou seja, enterócitos hiperplásicos contém a bactéria. No entanto, o mecanismo através do qual ocorre essa hiperplasia de mucosa é desconhecido (Rowland e Lawson, 1974; Lawson e Gebhart, 2000; Guedes, 2002; McCluskey et al., 2002).

É sabido que células das criptas e do ápice das vilosidades apresentam diferenças quantitativas e qualitativas de suas proteínas de membrana celular. Por exemplo, enterócitos imaturos das criptas apresentam um número significativamente maior de proteínas que formam bombas de cotransporte de íons sódio e bicarbonato (Seidler et al., 2001). Esse fato pode ajudar a explicar diarreia em animais com hiperplasia de mucosa. A avaliação da expressão gênica de enterócitos hiperplásicos, talvez possa mostrar o aumento quantitativo de algumas proteínas e a diminuição de outras.

1.5. SINAIS CLÍNICOS

A doença no suíno possui formas clínicas distintas, aguda e crônica, e a forma subclínica. A forma aguda é caracterizada por diarreia hemorrágica e morte em animais de reposição e cevados próximos à idade de abate. A crônica é caracterizada

por redução no ganho de peso, diminuição do crescimento e desuniformidade entre animais da mesma idade, diarreia transitória que acomete animais de faixa etária de 6 a 20 semanas (Lawson e Gebhart, 2000; Guedes, 2002). A forma subclínica é assintomática e caracterizada principalmente por desempenho reduzido (Ward e Winkelman, 1990).

Quando a EPS é reproduzida experimentalmente os sinais clínicos começam a ser observados de sete a dez dias após a inoculação, ou seja, o período de incubação da EP é de aproximadamente sete dias (Fig. 1.1) (Lawson e Gebhart, 2000; Guedes, 2002).

As bactérias ingeridas ou inoculadas por via intragástrica colonizam o terço médio e final do intestino delgado, ceco e cólon, resultando em proliferação das células epiteliais das criptas de Lieberkühn no intestino delgado e glândulas mucosas do intestino grosso com subsequente espessamento da mucosa intestinal (Jubb et al., 1993; Huerta et al., 2003). Ponto importante a ser considerado é que animais infectados, mesmo que não apresentem diarreia, sofrem redução de desempenho durante algum período da infecção.

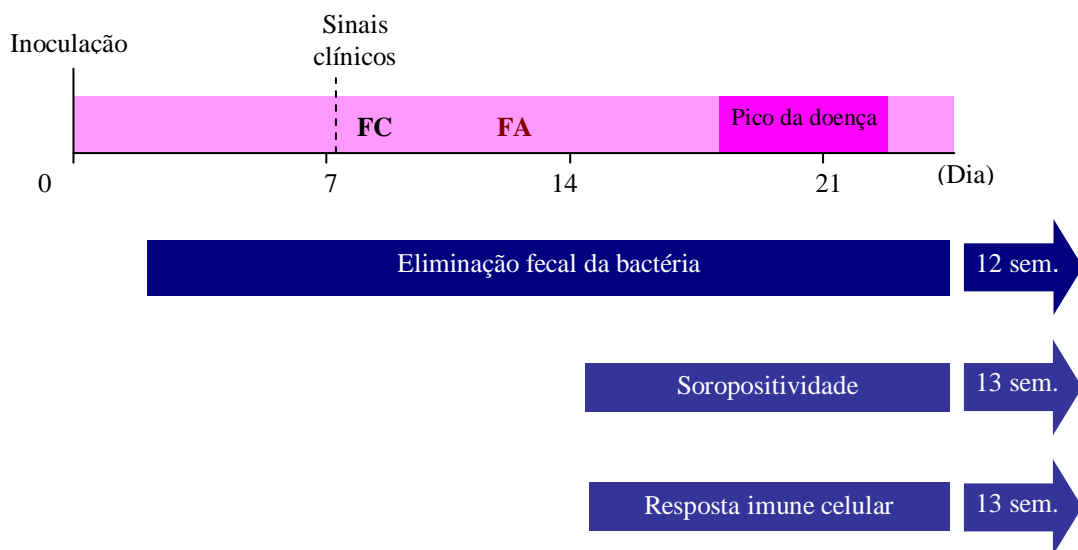


Figura 1.1: Representação esquemática do curso clínico, eliminação de bactéria nas fezes decorrente da infecção pela *L. intracellularis* e resposta imune em leitões experimentalmente infectados. Adaptado de Gebhart e Guedes, 2004. FC: forma crônica; FA: forma aguda.

1.6. PATOLOGIA

À necropsia de animais com a forma aguda, observam-se lesões intestinais caracterizadas por espessamento da parede intestinal, edema e congestão do mesentério, rugosidade da mucosa com pregas espessas e evidentes, e conteúdo fibrino-hemorrágico com coágulo sanguíneo preenchendo o lúmen intestinal (Fig. 1.2a). Animais com a forma crônica

apresentam edema de mesentério próximo à inserção com a alça intestinal lesada, serosa intestinal apresenta aspecto cerebróide, parede intestinal espessada e a mucosa com pregas bem evidentes (Fig. 1.2b). Tanto na forma aguda quanto na forma crônica, o íleo é mais frequentemente afetado, mas lesões podem ser encontradas em qualquer segmento intestinal, do duodeno ao reto (Guedes, 2002).

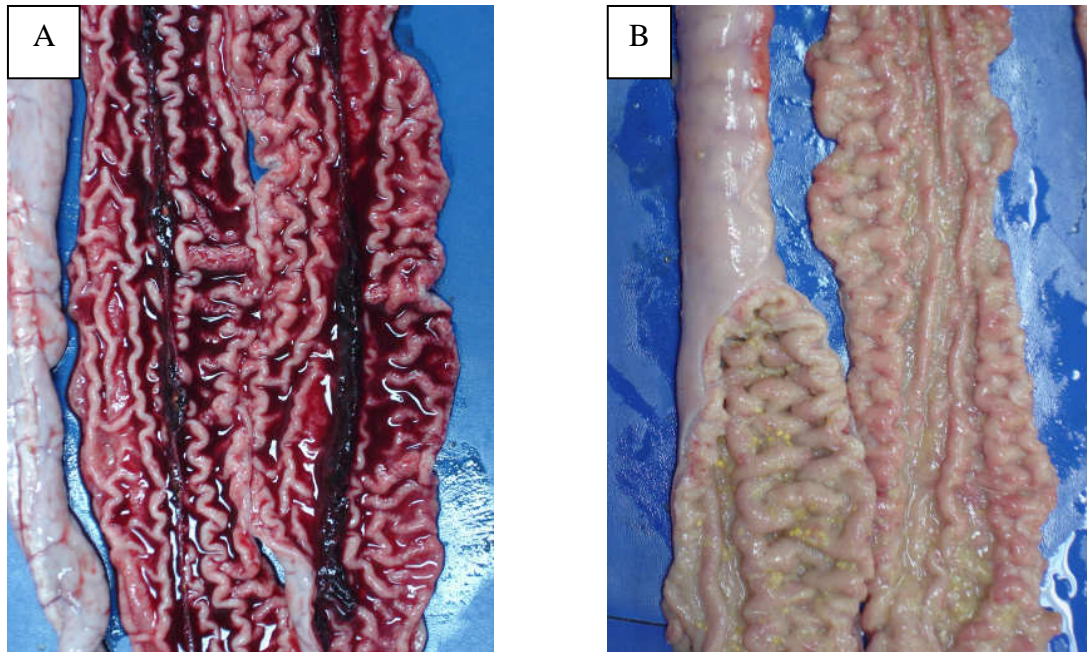


Figura 1.2: Intestino delgado. (A) Enteropatia proliferativa hemorrágica. Observar mucosa espessada e presença de sangue e coágulo no lúmen. (B) Enteropatia proliferativa crônica, com marcante espessamento da mucosa que apresenta pregas bastante evidentes.

As duas formas clínicas da doença, aguda e crônica, têm basicamente as mesmas características histopatológicas. As criptas de Lieberkühn estão alongadas e alargadas com um número aumentado de células epiteliais imaturas com elevado índice mitótico (Fig. 1.3 ab). Observa-se uma proliferação das células epiteliais dessas criptas no intestino delgado e glândulas mucosas do intestino grosso com a presença de um microorganismo intracelular curvo

na porção apical destes enterócitos (Rowland e Lawson, 1974; Jubb et al., 1993). Há uma redução marcante do número de células caliciformes nas criptas afetadas (Lawson e Gebhart, 2000). O animal com a forma subclínica, na maioria dos casos, apresenta características macroscópicas e histopatológicas semelhantes as observadas em animais com a forma crônica (Ward e Winkelman, 1990; Guedes, 2002).

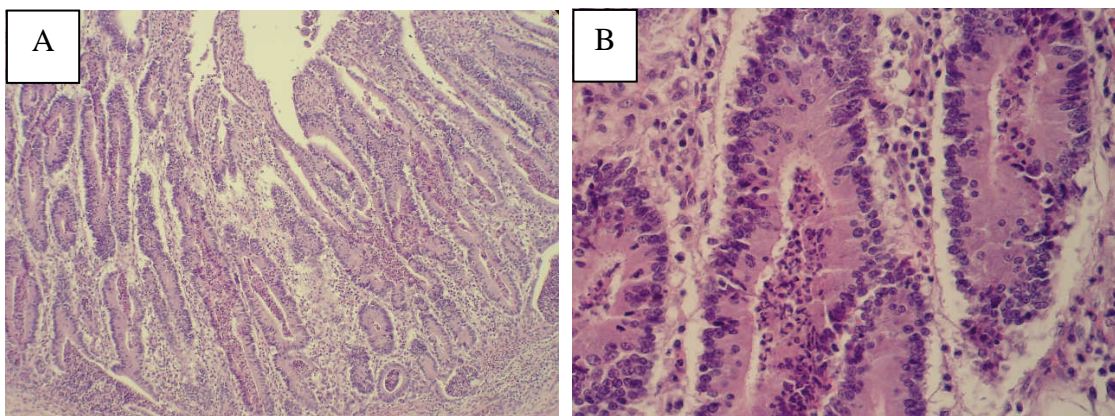


Figura 1.3: Microfotografia de lesão histológica típica de EP, caracterizada por proliferação de células epiteliais de criptas intestinais e ausência de células caliciformes. A (100x) e B (400x).

1.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico ante-mortem pode ser feito através de sorologia ou de PCR. A técnica qualitativa de PCR detecta especificamente DNA da bactéria e, aplicada em amostras fecais, pode determinar se o animal testado está eliminando a *L. intracellularis*. Entretanto, apresenta baixa sensibilidade, devido a presença de inibidores da ação da enzima polimerase, com valores variando entre 40 e 70%, em amostras viciadas (de animais com diarreia), pela presença da grande quantidade de inibidores fecais da reação em cadeia da polimerase. Apesar disso, a PCR ainda é a melhor forma de identificar animais vivos infectados (Guedes et al., 2002a). No entanto, justamente pela baixa sensibilidade da técnica, uma amostragem significativa de animais, de 15 a 20, é fundamental para a interpretação correta dos resultados (Guedes, 2003).

Já o diagnóstico post-mortem pode ser feito através de exames anatomopatológicos e

PCR de mucosa intestinal. Para maximizar a probabilidade de diagnóstico em animais infectados, deve-se sacrificar animais com sinais clínicos (Guedes, 2003). Além da coloração de rotina pela hematoxilina e eosina, métodos auxiliares, como técnicas histoquímicas, de coloração pela prata (Warthin Starry, Young modificado ou Levaditi) (Rowland e Lawson, 1974; Mores et al, 1985), imunofluorescência indireta (McOrist et al, 1987) e IHQ (Jensen et al, 1997) usando anticorpo monoclonal específico contra *L. intracellularis* (McOrist et al, 1987) facilitam o diagnóstico histopatológico, pois através delas é possível visualizar a bactéria na porção apical de enterócitos imaturos.

A técnica de IHQ (Fig. 1.4) em cortes histológicos usando anticorpos específicos para *L. intracellularis* demonstrou ser mais sensível que a coloração histológica de HE, que técnicas histoquímicas como a coloração pela prata e que a PCR de amostras fecais (Guedes et al., 2002a).

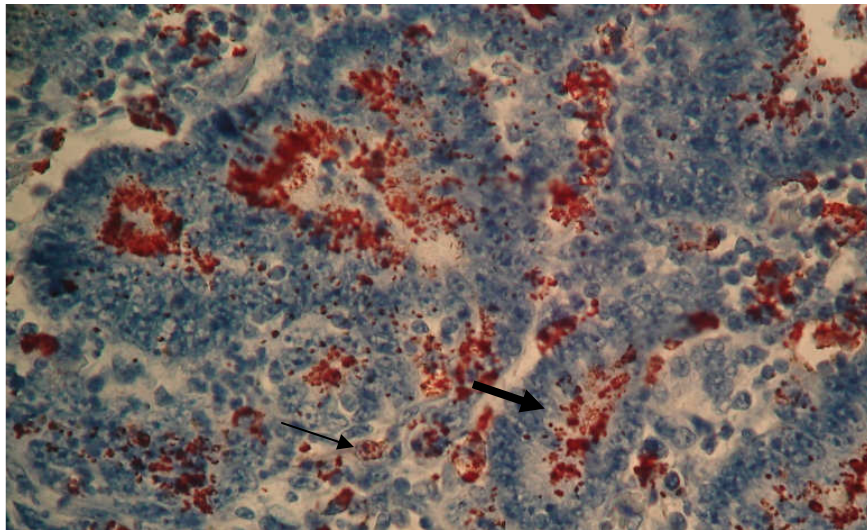


Figura 1.4: Microfotografia de seções histológicas de íleo de suíno com EP à IHQ para *L. intracellularis*, utilizando como cromógeno o AEC. Pontos em vermelho no ápice de enterócitos de criptas intestinais (seta larga) e em macrófagos (seta fina) da lâmina própria representam o antígeno bacteriano. (200x)

Dentre os diagnósticos diferenciais, em relação a forma aguda é importante considerar úlcera gástrica, síndrome hemorrágica intestinal, salmonelose e disenteria suína (causada pela *Brachyspira hyodysenteriae*) (Guedes et al., 2002a). A lista de diagnósticos diferenciais da forma crônica inclui diversas patologias caracterizadas por fezes amolecidas, dentre elas gastroenterite transmissível enzoótica (ou TGE), espiroquetose colônica (causada pela *Brachyspira pilosicoli*), disenteria suína, salmonelose (causada pela *Salmonella typhimurium*), colibacilose (infecção por *Escherichia coli*) e hipersensibilidade a soja (Guedes, 2003).

1.8. CONTROLE

EPS causa importantes perdas econômicas para a indústria suínica mundial (Lawson e Gebhart, 2000; Lee et al., 2001; Guedes, 2003). Nos EUA, esse prejuízo equivale a aproximadamente 98 milhões de dólares anuais (Lawson e Gebhart, 2000). Por esse motivo, é importante a utilização de métodos para o controle dessa doença, que

é realizado principalmente através da utilização de antimicrobianos, na ração, na água de beber, ou na forma injetável (Bane et al., 2001).

Métodos alternativos de controle da EPS têm sido estudados. Por exemplo, uma vacina viva modificada, Enterisol[®] Ileitis, vendida na forma liofilizada, está disponível comercialmente em vários países do mundo, inclusive no Brasil. A aplicação dessa vacina tem mostrado desenvolvimento de imunidade, humoral e celular (Guedes e Gebhart, 2003b), contra a *Lawsonia intracellularis* e melhora de GPD de cerca de 30 gramas quando comparado com animais não vacinados (Kroll et al., 2004; McOrist e Smith, 2006; Yamaguchi et al., 2006).

A eficácia de acidificantes adicionados à ração para o controle da EPS é motivo de muita especulação. Teoricamente, haveria diminuição significativa do pH intestinal, que resultaria em morte de grande número de bactérias entéricas (Boesen et al., 2004), inclusive de organismos de *L.*

intracellularis que estivessem no lume intestinal, e assim o número destes microrganismos que conseguiriam penetrar enterócitos seria menor. Entretanto, essa diminuição de pH do conteúdo intestinal, provavelmente, não resultaria em alterações do pH citosólico de enterócitos e portanto não influenciaria a viabilidade de *L. intracellularis* que estivessem no interior dessas células.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para se conhecer drogas eficientes no controle e tratamento da EPS. Diferentes antimicrobianos mostraram eficácia no controle dessa doença. Entretanto, seu uso deve ser criterioso, pois a utilização de posologia inadequada pode aumentar a probabilidade de ocorrência de surtos de doenças entéricas (Bane et al., 2001). A escolha do antimicrobiano a ser utilizado deve ser baseada em conhecimento farmacológico e custo da droga, idade dos animais e presença de outras enfermidades concomitantes, como salmonelose, disenteria suína, espiroquetose colônica, micoplasmose e pasteurelose, que possam ser controladas pelo mesmo antimicrobiano (Guedes, 2003).

Estudos têm descrito os efeitos benéficos do uso de promotores de crescimento em animais afetados por EP. Apesar disso, o efeito dessas substâncias sobre a doença é pouco conhecido (Lawson e Gebhart, 2000). Por exemplo, o uso prolongado de promotores de crescimento poderia interferir na dinâmica de infecção de *L. intracellularis* no rebanho, induzindo com isto a formação de lotes de animais totalmente suscetíveis que desenvolveriam a forma aguda da doença tardiamente, quando da retirada destas drogas da ração. Desta forma, não é possível utilizar promotores de crescimento com o intuito de se permitir baixos níveis de exposição a *L. intracellularis* e desenvolvimento de imunidade.

A administração de antimicrobianos para tratamento de EP em suínos deve ser considerada em duas situações principais. A primeira em rebanhos com a forma crônica da EP, nos quais a mortalidade é mínima, mas existe impacto significativo no desempenho. Nestes casos, a antibioticoterapia tem como principal objetivo melhorar os índices produtivos da granja. A segunda situação é quando existe a forma aguda ou hemorrágica da EP, e o objetivo do tratamento é minimizar a mortalidade e reduzir as chances de ocorrência da doença em lotes subsequentes (Lawson e Gebhart, 2000).

Não é intenção deste texto discutir aspectos da resposta imune associada à infecção por *L. intracellularis*, mas é importante salientar alguns pontos relacionados ao uso de agentes antimicrobianos. O objetivo principal do controle de ambas as formas da EP é permitir que animais susceptíveis sejam naturalmente expostos à bactéria, na ausência de medicamentos eficientes, desenvolvendo assim imunidade, e então intervir usando os mesmos evitando doença clínica e impacto no desempenho. Desta forma, estimar o momento ideal de uso de um ou vários pulsos de antimicrobianos é um dos segredos do sucesso de um programa de controle. O uso prolongado de doses terapêuticas de droga eficaz contra *L. intracellularis* e em momento errado podem provocar problemas maiores com a forma aguda da doença em animais próximo a idade de abate (Guedes e Gebhart, 2002a).

1.8.1. Modelos experimentais para avaliação da eficiência de antimicrobianos.

Experimentos para se testar a eficiência de um antimicrobiano contra um determinado patógeno podem ser desenvolvidos “in vitro” (McOrist et al., 1995b) ou “in vivo” (McOrist et al., 1996ab; Tsinas et al., 1998ab; Schwartz et al., 1999; Walter et al., 2001; Winkelman et al., 2002ab). Em

estudo “in vitro”, McOrist e colaboradores (1995b), determinaram a concentração inibitória mínima (MIC) de antimicrobianos como penicilinas, tetraciclina, tiamulinas, macrolídeos (p. ex. eritromicina e tilosina) e lincomicina, além das concentrações nas quais essas substâncias têm ação bactericida contra *L. intracellularis*. O valor da MIC expressa a mínima dose da droga na qual esta é eficiente em inibir o crescimento do microrganismo em questão. Nesse estudo, observou-se que a penicilina G procaínica, eritromicina, difloxacina, virginiamicina e clortetraciclina foram as drogas mais efetivas contra a *L. intracellularis*.

Estudos “in vivo” para avaliação de antimicrobianos utilizados contra *L. intracellularis* podem ser desenvolvidos com animais natural (Tsinas et al., 1998ab) ou experimentalmente infectados (McOrist et al., 1996ab; Schwartz et al., 1999). Nos experimentais, o inóculo pode ser de cultura pura de *L. intracellularis* (McOrist et al., 1996ab; Walter et al., 2001) ou homogenado de mucosa intestinal de suínos sabidamente infectados (Winkelman et al., 2002ab).

Experimentos a campo, com exposição natural à bactéria, refletem a real cinética da infecção. Entretanto, são muitas as variáveis não controladas, e as chances de insucesso e de não confirmação das hipóteses pré-propostas. Já os estudos com inoculação experimental, apesar de não representarem tão bem a realidade do campo, permitem um controle das variáveis interferentes e, com isto, uma avaliação mais precisa e específica do efeito da droga testada sobre a infecção e as perdas associadas à doença (Guedes, 2002).

Sabe-se que a atividade “in vitro” de antibióticos contra a *L. intracellularis* nem sempre é correlata com a eficácia “in vivo”, em consequência da farmacodinâmica da droga. Por exemplo, tilosina apresentou MIC alta, ou seja, foi necessária uma alta

dose da droga para que esta fosse eficiente em inibir o crescimento da *L. intracellularis* (McOrist et al., 1995b). Entretanto, em estudos “in vivo”, a tilosina mostrou-se eficiente no controle e tratamento da EP em animais infectados (McOrist et al., 1997b; Veenhuizen et al., 1998; Lee et al., 2001). Essa diferença de ação entre estudos “in vitro” e “in vivo” pode também ser explicada por ser a *L. intracellularis* uma bactéria intracelular obrigatória.

1.8.2. Antimicrobianos eficientes no controle e tratamento da EPS

A avaliação da eficiência do antimicrobiano baseia-se na redução de eliminação de bactérias nas fezes, detectada por PCR (Walter et al., 2001; Tasker et al., 2004), diminuição da extensão e severidade das lesões macroscópicas no intestino, e mais importante, melhora no desempenho de animais medicados (Kyriakis et al., 1996; McOrist et al., 1996b; Schwartz et al., 1999; Walter et al., 2001). Para ser eficiente, a droga deve chegar ativa e em concentração adequada ao íleo e, posteriormente, penetrar o enterócito e, no citosol, atuar sobre as bactérias gram negativas. Algumas drogas não penetram na célula ou se localizam em compartimentos celulares inapropriados a ação contra bactéria intracelular (McOrist et al., 1995b).

Os principais grupos que apresentam antimicrobianos comprovadamente eficientes no tratamento e controle da EPS são as tetraciclina, lincosamidas, pleuromutilinas e especialmente os macrolídeos. Dentre estes, os mais amplamente utilizados são a tilosina (McOrist et al., 1997b; Tsinas et al., 1998b; Veenhuizen et al., 1998; Lee et al., 2001), do grupo dos macrolídeos, e a tiamulina (McOrist et al., 1996b; Schwartz et al., 1999), do grupo das pleuromutilinas.

Vários são os macrolídeos cuja eficiência contra *L. intracellularis* foi cientificamente

comprovada. Dentre eles citam-se tilosina (McOrist et al., 1997b; Tsinas et al., 1998b; Lee et al., 2001), josamicina (Kyriakis et al., 2002) e associações (McOrist et al., 2000), aivlosina (Tasker et al., 2004) e espiramicina (Tsinas et al., 1998b). O termo macrolídeo está relacionado a estrutura

química desses antimicrobianos que possuem em sua estrutura química um anel de lactona com vários membros, aos quais se ligam um ou vários açúcares desóxi, como observado na eritromicina (Fig.1.5A), leucomicina (Fig. 1.5B) e na aivlosina (Fig. 1.5C) (Rang t al., 1997).

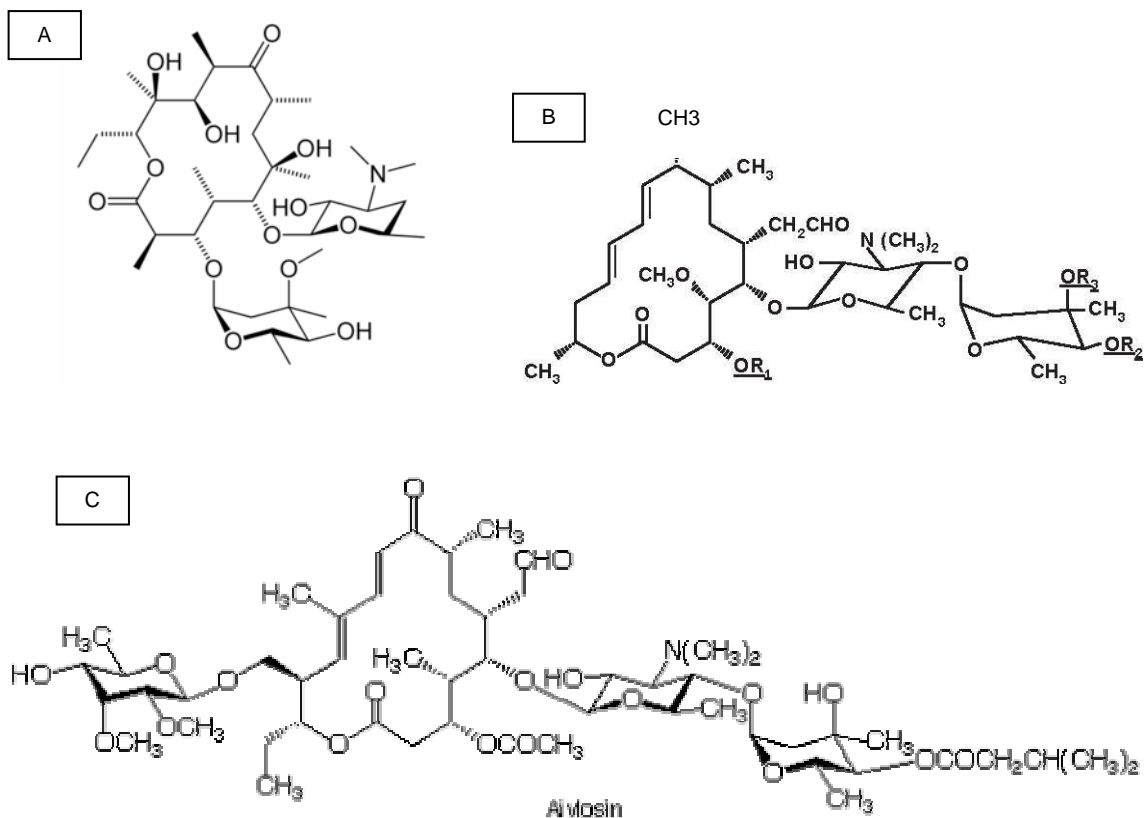


Figura 1.5: Estrutura química da eritromicina (A), da leucomicina (B) e da aivlosina (C).

1.9. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A enteropatia proliferativa é uma doença importante pelas significativas perdas econômicas que acarreta em sistemas de produção de suínos. Pouco se conhece sobre a epidemiologia da doença e, como já houveram casos em aves, é importante se investigar o possível papel de passariformes na epidemiologia da doença.

Como a utilização de antimicrobianos vem sendo o método mais freqüente de controle da EPS é muito interessante que se conheça o maior número de drogas eficientes contra *L. intracellularis*, uma vez que, apesar de não existirem indícios de desenvolvimento de resistência, criem-se opções de mercado relacionadas a custo e disponibilidade de medicamentos, além das limitações e variações relativas ao tempo de retirada para se evitar resíduos na carne.

Capítulo 2:

Susceptibilidade de pardais, *Passer domesticus*, a infecção pela bactéria *Lawsonia intracellularis*

RESUMO

Teve-se como objetivo estudar a susceptibilidade de pardais a infecção experimental por *L. intracellularis*. Utilizaram-se 43 pardais, sendo 32 inoculados com cultura pura de *L. intracellularis* e 11 com placebo, por via oro - esofágica, no mesmo dia. Após 21 dias, os pardais foram eutanasiados e necropsiados. Os intestinos, fígado, moela e coração foram coletados, processados e corados pela técnica de IHQ, usando o método da Streptavidina marcada, e anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis*. Dos 32 pardais inoculados, dois apresentaram marcação positiva, discreta e focal, à IHQ, em macrófagos de lâmina própria do intestino. Entretanto, não foi observada hiperplasia de enterócitos característica da doença. Houve marcação positiva também em macrófagos do fígado de quatro pardais. Amostras de fezes coletadas de todas as aves nos dias -1, 7, 14 e 21 e testadas através da técnica de PCR, para detecção do DNA da bactéria, resultaram negativas. Nenhum dos animais controle foi positivo nos testes realizados. Portanto, o pardal, provavelmente, não é importante na epidemiologia da EP.

Palavras-chave: pardal; enteropatia proliferativa; epidemiologia.

2.1. INTRODUÇÃO

É sabido que a presença de animais subclínicamente infectados, eliminando *L. intracellularis* nas fezes, levam a contaminação das instalações e transmissão para animais susceptíveis (Bane et al., 2001; Guedes, 2003). Entretanto, a ocorrência de surtos de enteropatia proliferativa em granjas nunca antes povoadas e que receberam animais de reposição de granjas sem história clínica da enfermidade têm sido constatada. Desta forma, surgiram questionamentos a cerca da existência de possíveis vetores biológicos ou mecânicos (Guedes, 2002).

A epidemiologia da doença é pouco conhecida (Guedes et al, 2002c), e é de grande interesse estabelecer possíveis mecanismos epidemiológicos de transmissão da *L. intracellularis* (Guedes, 2003). Existem relatos da doença em aves, como o emu (*Dromaius novaehollandiae*) (Lemarchand et al., 1997) e o avestruz (*Struthio camelus*) (Cooper et al., 1997ab; Cooper e Gebhart, 1998). Por outro lado, estudos indicam que aves domésticas (*Gallus gallus*), não são susceptíveis a bactéria (Collins et al., 1999; McOrist et al,

2003). Não existem estudos na literatura avaliando a possibilidade de aves da ordem Passeriformes atuarem como vetores biológicos. Sendo o pardal (*Passer domesticus*) uma espécie ubíqua, com capacidade de vôo de aproximadamente 6 a 8 quilômetros de distância (Fitzwater, 1994), e que possui contato estreito com suínos em diferentes unidades de produção, realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar a susceptibilidade desta espécie à infecção por *L. intracellularis* após inoculação experimental com cultura pura da bactéria.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado como descrito por Guedes e Gebhart (2003abc), no laboratório de enteropatia proliferativa da University of Minnesota, EUA. Resumidamente, a monocamada de células McCoy (ATCC CRL 1696) crescidas em meio Eagle modificado Dulbecco's com 1% de L-glutamina e 5% de soro fetal bovino (SFB), sem antibióticos, à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, foi exposta a suspensão de *L. intracellularis*, cepa PHE/MN1-00 (ATCC

PTA-3457). A passagem das células infectadas foi feita com tratamento por cloreto de potássio a 0,1% e raspagem das células do fundo das garrafas de cultivo celular. Assim as células infectadas eram rompidas e em seguida novas células McCoy eram expostas aos organismos de *L. intracellularis* cultivados. O nível de infecção era calculado antes de cada passagem através da técnica de imunoperoxidase indireta. Na nona passagem “in vitro”, quando as células apresentavam-se altamente infectadas, entre seis e sete dias de infecção, o cultivo foi tratado com cloreto de potássio a 0,1%. Neste momento, os organismos de *L. intracellularis* em suspensão no meio de cultivo e as bactérias liberadas pelas células McCoy rotas foram misturadas, homogeneizadas por 15s e centrifugadas por 20 minutos a 3.400 x g, para formação de precipitado de *L. intracellularis*. Esse material foi ressuscitado em solução de SPG com 5% de SFB. A suspensão foi alicotada em tubos criogênicos de 3,6 mL e armazenada a -80°C, até a inoculação.

Animais

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CETEA) (Protocolo nº. 9/2003) e seguiu as normas do mesmo. Para obtenção de 95% de confiança para detecção de pelo menos um animal infectado em uma população com prevalência estimada de infecção de 10%, seria necessária a inoculação de 30 animais, no mínimo (Martin et al., 1987). Desta forma, um total de 43 pardais foi

capturado para o experimento, na região metropolitana de Belo Horizonte, e, conseqüentemente, sem contato com criatório de suínos, sendo 32 inoculados com a bactéria e 11 receberam placebo, pela mesma via e no mesmo dia, constituindo o grupo controle.

Inicialmente, foi realizado um bioensaio em hamsters com a finalidade de comprovar a patogenicidade do inóculo de culturas puras de *L. intracellularis* PHE/MN1-00 (ATCC PTA-3457) (Guedes e Gebhart, 2003ab). Para isto, foram utilizados oito hamsters que, no dia zero do experimento, estavam com 18 dias de idade e peso médio de 18,52 g. Estes foram alojados em caixas plásticas, recebendo ração comercial e água à vontade e mantidos em regime de 12 horas de luz diária.

Após o bioensaio com hamsters, 43 pardais (*Passer domesticus*) foram capturados, sem fazer distinção de sexo ou idade, sendo 25 machos e 18 fêmeas, adultos e com peso médio de 21,98g \pm 1,342. Devido a inviabilidade de alojar, ao mesmo tempo, os 43 pardais necessários ao experimento, os pássaros foram blocados por tempo e assim formaram-se seis blocos, com sete aves cada, com exceção de um que foi formado por oito. Os pardais foram separados em dois grupos ou tratamentos, sendo T1, os inoculados, com cinco repetições, ou seja, n=5, e T2 ou controle, com duas repetições ou n=2. Desde a captura, foram mantidos em gaiolas individuais (Fig. 2.1), passando por um período de adaptação de sete dias.



Figura 2.1: Local no qual os pardais foram alojados, em gaiolas individuais, desde a chegada até a eutanásia.

Inoculação

No bioensaio com hamsters, no dia 0 do experimento, cada um dos cinco animais do grupo a ser inoculado recebeu 0,5 mL de cultura pura de *L. intracellularis* PHE/MN1-00 (ATCC PTA-3457), por via oral, preparado segundo Guedes e Gebhart (2003ab), contendo aproximadamente $7,75 \times 10^7$ organismos de *L. intracellularis* por mL. Os demais hamsters receberam SPG,

como placebo, pela mesma via, no mesmo dia.

No experimento com pardais, em cada bloco de sete pássaros, cinco pardais receberam 0,5 mL do inóculo, por via oroesofágica (Fig. 2.2), através de sonda uretral nº. 4 acoplada à seringa de 3 mL, contendo aproximadamente $7,75 \times 10^7$ bactérias por mL. Os dois pássaros do grupo controle receberam 0,5 ml de água destilada.



Figura 2.2: Pardal, *Passer domesticus*, sendo inoculado com cultura pura de *L. intracellularis* através de sonda.

Deteção de *L. intracellularis* nas fezes de pardais

Durante o período experimental de cada repetição, foram coletadas amostras frescas de fezes de cada pardal, nos dias -1, sete, 14 e 21, baseado no que é conhecido da patogenia no suíno (Guedes, 2002; Gebhart e Guedes, 2004). No dia de cada coleta, pela manhã, o fundo da gaiola, que alojava individualmente cada pardal, era revestido com plástico. Neste acumulavam-se as fezes produzidas que eram coletadas em microtubos de poliestileno de 1,5 mL, durante todo o dia, até que se obtivesse aproximadamente 0,6 g de fezes, quantidade suficiente para a realização de três extrações de DNA. Estas amostras coletadas foram armazenadas à - 20°C e, posteriormente, testadas pela técnica de PCR para detecção de ácido nucléico da *L. intracellularis*, como descrito por Jones et al. (1993).

Avaliação histológica e IHQ

Após 21 dias, tanto os hamsters quanto os pardais foram eutanasiados e necropsiados. Os intestinos delgado e grosso eram avaliados macroscopicamente e coletados

inteiros em um cassete para processamento histológico de rotina (Luna, 1968). Foram preparadas duas lâminas de cada animal, sendo uma corada pela HE e a outra pela técnica de IHQ. A técnica de IHQ utilizada foi a de Streptavidina marcada (Dako, catálogo K0675), usando anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003c).

Análise de Dados

Foi feita somente avaliação observacional e estatística descritiva dos resultados.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos hamsters do grupo inoculado apresentou 10 cm de alteração intestinal macroscópica sugestiva de EP, posteriormente confirmadas por HE e IHQ. Os outros quatro hamsters inoculados com cultura pura de *L. intracellularis* apresentaram hiperplasia de enterócitos e infecção dos mesmos, detectada pela IHQ (Fig. 2.3), comprovando a patogenicidade do inóculo. Nenhum sinal de infecção por *L. intracellularis* foi observado nos animais controle.

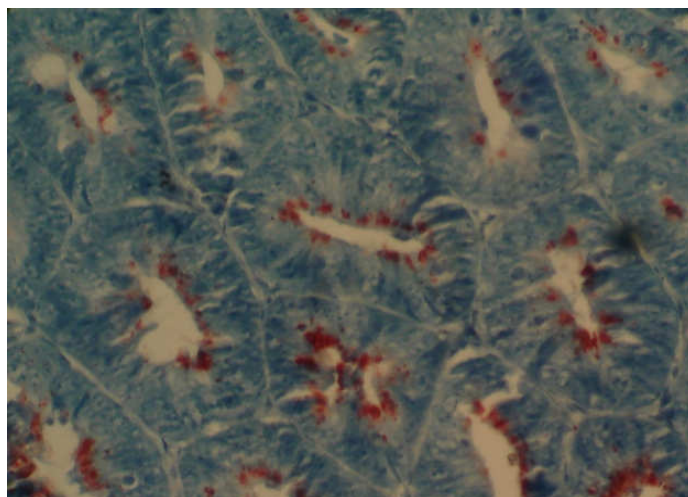


Figura 2.3: Microfotografia de íleo de hamster experimentalmente inoculado. Pontos vermelhos no ápice de enterócitos representam o antígeno bacteriano (IHQ, 400x).

Todos os 43 pardais foram necropsiados e os intestinos inteiros, do início do duodeno a cloaca, foram coletados, além de fígado, moela e coração (Fig. 2.4). A coleta da

cloaca era importante pois no caso de infecção pela *L. intracellularis* relatado em emu (Lemarchand et al., 1997) esta estava associada à proctite.



Figura 2.4: Necropsia de pardal (A) e coleta de intestinos inteiros para IHQ (B).

Nenhum dos pardais inoculados com a cepa patogênica de *L. intracellularis* apresentou a hiperplasia de enterócitos característica da doença e os dois que mostraram marcação positiva apresentaram localização do antígeno bacteriano diferente da encontrada em outras espécies animais. Estes pardais apresentaram marcação positiva em macrófagos de lâmina própria e, além desses, outros dois apresentaram antígeno de *L. intracellularis* no citoplasma de macrófagos no fígado. Importante salientar, que nesses casos, os pontos de marcação não apresentavam a forma intacta da

bactéria, indicando apenas a presença de fragmentos antigênicos da mesma. Pode ser hipotetizado que algumas bactérias localizadas no citoplasma de enterócitos passem através da membrana basal para a lâmina própria, sejam então internalizadas por células apresentadoras de antígeno e drenadas para linfonodos mesentéricos e fígado. A ocorrência da presença de antígenos de *L. intracellularis* já foi relatada em linfonodos mesentéricos de animais afetados (Guedes e Gebhart, 2003a; Segales et al., 2001). Nenhum dos animais controle foi positivo nos testes realizados.

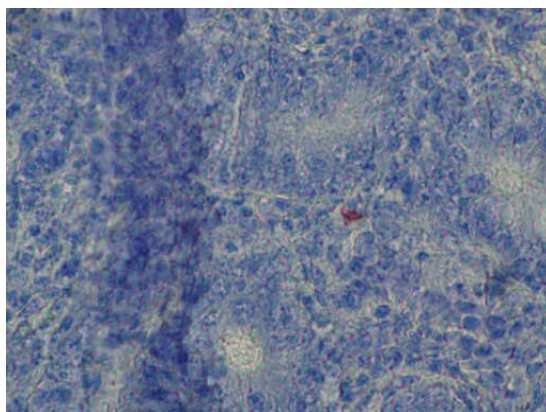


Figura 2.5: Microfotografia de íleo de Pardal, experimentalmente inoculado, corada pela técnica de IHQ com anticorpos específicos para *L. intracellularis*, usando AEC como cromógeno. Pontos vermelhos no citoplasma de macrófago representam o antígeno bacteriano (200x).

Nenhuma das amostras de fezes dos pardais testadas pela técnica de PCR, apresentou positividade para o DNA da *L. intracellularis*. Ou seja, nenhum dos 43 pardais testados durante o experimento estava eliminando, nas fezes, níveis detectáveis de *L. intracellularis* no dia anterior ou sete, 14 e 21 dias após a inoculação.

Há na literatura trabalhos relatando casos naturais de EP em duas espécies de aves, avestruz e emu (Cooper et al., 1997ab; Lemarchand et al, 1997, respectivamente), e a não susceptibilidade de outra, galinha (Collins et al., 1999). Tanto o emu quanto o avestruz apresentaram lesões histológicas características da infecção pela *L. intracellularis*, confirmada pela coloração pela prata. Segmentos intestinais e da região retal do emu foram positivos à IHQ para antígenos da bactéria e amostra de raspado de mucosa intestinal de avestruz foi positiva em PCR utilizando primers específicos para *L. intracellularis*. Já Collins et al. (1999) realizaram inoculação experimental de galinhas com cultura pura de *L. intracellularis*. Grupos dessas aves foram necropsiados em diferentes momentos do experimento, 14, 21 e 28 dias após inoculação, sendo que nenhuma delas

apresentou lesões macroscópicas ou histopatológicas de EP, e IHQ negativa.

Além disso, diferentes espécies animais podem ser susceptíveis a um agente patogênico em diferentes níveis, especialmente em se tratando de um patógeno intracelular. Para infectar a célula do hospedeiro é necessário que primeiramente este agente consiga aderir e penetrar a célula, sendo bastante complexos os mecanismos de invasão celular de bactérias intracelulares (Olsen et al., 2004).

A detecção de DNA de *L. intracellularis* em amostras clínicas através de PCR é um método específico, mas de baixa sensibilidade (40 a 70%) em amostras fecais (Guedes et al., 2002a). Entretanto, segundo Jones et al. (1993), quando se utiliza o protocolo de extração de DNA a partir de amostras clínicas, preconizado por Boom et al. (1990), e se aplica a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers específicos para amplificação de fragmento de DNA de *L. intracellularis* de 319 pares de base, por eles descrita, é possível a identificação de uma quantidade tão pequena de ácido nucléico quanto 10^3 organismos por grama de fezes, sensibilidade analítica. Nesse trabalho,

todas as amostras fecais, coletadas nos dias -1, 7, 14 e 21 do experimento, dos 32 pardais inoculados com cultura pura de *L. intracellularis* e 11 pardais do grupo controle foram negativas para DNA do agente etiológico da EP. Três são as principais hipóteses que explicariam esse fato: grande quantidade de inibidores específicos da reação de PCR podem estar presentes nas fezes de pardais; ou a bactéria é eliminada nas fezes em quantidades inferiores a 10^3 nos dias 7, 14 e 21 após a inoculação; ou essas bactérias seriam totalmente destruídas no trato gastrointestinal desses pássaros, não conseguindo penetrar intactas em enterócitos. Sabidamente, fezes de um modo geral, contêm diversas substâncias que funcionam como inibidores da PCR, que dificultam em diferentes graus a amplificação da seqüência alvo de DNA (Wilde et al, 1990). O pardal pode apresentar algum ou vários desses inibidores em quantidades maiores que outros animais. Com relação a sensibilidade do método de extração, seria interessante testar kits de extração específicos para amostras fecais, como o “Qiagen stool”, apesar de serem mais caros. Essas hipóteses podem ser objeto de estudo em futuros experimentos.

Alguns pardais, aproximadamente 50% dos pássaros utilizados nas repetições um, quatro e seis, apresentaram infestação, que variou de moderada a intensa, por coccídeo intestinal, com morfologia compatível com microrganismos do gênero *Eimeria*. Esta infestação é muito comum em aves, podendo algumas espécies de *Eimeria* não serem patogênicas (Allen e Fetterer, 2002). Esse parece ser o caso em pardais pois não houve quadro de diarreia ou lesão histopatológica associada a presença dessas formas parasitárias intracelulares em enterócitos.

2.4. CONCLUSÕES

Considerando que os 32 pardais receberam elevada dose de cultura pura de *L. intracellularis*, por via oroesofágica, não desenvolveram nenhum sinal clínico, não eliminaram quantidades detectáveis de bactérias nas fezes e somente dois pássaros apresentaram antígenos bacterianos, aparentemente degradados, no citoplasma de macrófagos na lâmina própria, conclui-se que, provavelmente, essas aves não são susceptíveis a infecção por *L. intracellularis* e, conseqüentemente, apresentem papel epidemiológico insignificante.

Capítulo 3:

**Eficácia da leucomicina (Leucomag 30% PR)
no controle da enteropatia proliferativa em leitões experimentalmente inoculados**

RESUMO

Esse experimento foi realizado com o objetivo de se testar a eficiência da leucomicina no controle da EPS. Para isso, utilizaram-se 90 leitões de cinco semanas de idade, provenientes de granja sem histórico clínico de EPS. Os animais foram divididos em três grupos (tratamentos) de 30, sendo T1 o grupo dos inoculados e não medicados, T2 e T3 os inoculados e medicados com 90 ppm e 180 ppm de leucomicina, respectivamente. No dia zero do experimento, os 90 suínos foram inoculados com aproximadamente $4,5 \times 10^9$ *L. intracellularis*. A medicação foi utilizada nas rações dos grupos T2 e T3 somente do dia anterior até 13 dias após a inoculação com *L. intracellularis*. Todos os leitões foram eutanasiados no dia 23 e a média do comprimento de lesão, por leitão, de T1, T2 e T3 foi 29,97, 20,56 e 12,26 cm, respectivamente. Sinais clínicos foram mais evidentes nos animais do grupo T1 que nos T2 e T3 entre os dias 16 e 21. Os animais dos grupos T2 e T3 foram ao final em média 2 kg mais pesados que os do grupo T1. Além disso, os grupos T2 e T3 apresentaram melhor GPD (0,419g e 0,438g vs. 0,339g) e CA (1,63 e 1,44 vs. 1,83) que o grupo T1. A média do comprimento de lesão, por leitão, de T1, T2 e T3 foi 29,97, 20,56 e 12,26 cm, respectivamente. Com base nos sinais clínicos, lesões macroscópicas e histopatológicas pode-se afirmar que reproduziu-se com sucesso a doença, validando assim o experimento. A eficiência da leucomicina nas doses de 90 e 180 ppm foi demonstrada baseando-se principalmente nos resultados de desempenho, aspecto importante na indústria suinícola.

Palavras-chave: Suínos, enteropatia proliferativa, *L. intracellularis*, controle, leucomicina.

3.1. INTRODUÇÃO

A medida de controle da EPS mais utilizada é a adição de antimicrobianos a ração. A leucomicina (Leucomag 30% PR) é um macrolídeo registrado no Brasil pela empresa CEVA Saúde Animal. À semelhança de outros macrolídeos, a leucomicina age impedindo a síntese protéica bacteriana por interrupção da translocação, por se ligar à subunidade ribossômica bacteriana 50S. Assim, esta droga inibe a síntese protéica bacteriana e, conseqüentemente, a multiplicação do microrganismo. Dependendo da dose, os macrolídeos, inclusive a leucomicina, podem ter ação bacteriostática ou bactericida. Por ser lipossolúvel apresenta grande capacidade de penetração celular, atravessando a bicamada lipídica de membrana celular de eucariotos, característica importante uma vez que a *L. intracellularis* é uma bactéria intracelular. A maior parte da leucomicina absorvida é eliminada na forma ativa na bile, sendo

parte reabsorvida no intestino e parte eliminada nas fezes, outra propriedade importante no caso de agentes enteropatogênicos. Além disso, no Brasil, esta droga vem sendo utilizada empiricamente a campo para o controle de EPS, apresentando bons resultados. Desta forma, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de testar a eficiência de duas concentrações de leucomicina no controle da EP em leitões experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do inóculo

Para inoculação de leitões, utilizaram-se segmentos intestinais de animais com lesões típicas de EP, doença confirmada por IHQ, que foram congelados e mantidos a -80°C . No dia da inoculação, os segmentos intestinais foram descongelados em água corrente, seccionados longitudinalmente com tesoura e a mucosa foi raspada

utilizando-se lâminas de vidro. O material obtido da mucosa foi homogeneizado em solução de SPG na proporção de 1:1 em liquidificador por cerca de um minuto (Winkelman e Tasker, 2002). Esse material foi submetido a avaliação bacteriológica e parasitológica, que asseguraram a ausência de outros patógenos relevantes. Cerca de 40 mL desta suspensão foi utilizado para inoculação de cada leitão.

A quantificação de cada um dos inóculos foi feita através de diluições seriadas de 1:10 do inóculo em PBS (pH 7,2), impregnação de lâmina de vidro e coloração por IPX. Resumidamente, colocou-se 10 µL de cada diluição em um poço de lâmina de vidro de 15 poços, e a lâmina era colocada em estufa à 37°C, por 30 min, para secagem do líquido. Em seguida, a lâmina era fixada em acetona gelada e corada através da técnica de imunoperoxidase indireta utilizando-se anticorpo monoclonal específico para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003c). O número de organismos era contado ao microscópio ótico. A concentração final era obtida através da multiplicação do número de bactérias presentes e o valor da diluição avaliada.

ANIMAIS

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da UFMG (Protocolo nº. 5/2006) e seguiu suas normas.

Piloto I

Este piloto foi realizado com o objetivo de amplificar o inóculo, uma vez que não se dispunha de quantidade suficiente de intestinos infectados com *L. intracellularis* para reprodução da doença em 90 animais. Para tanto, um número menor de leitões susceptíveis teve de ser inoculado experimentalmente com o inóculo de homogenado de mucosa disponível.

Para este piloto foram utilizados 19 leitões de cinco semanas de idade, de ambos os sexos, com peso médio de 8,35 Kg, procedentes de um rebanho sem histórico de enteropatia proliferativa ou outras doenças que pudessem gerar possíveis confundimentos. Os 19 leitões foram alojados em uma baia de 12 m², de piso sólido, com aquecimento artificial (campânula a gás), água e ração à vontade, em galpão do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG.

No dia seguinte ao alojamento (dia zero do experimento), cada um dos 19 animais foi inoculado com homogenado de mucosa dissolvido em SPG, preparado como descrito anteriormente, através de sonda intragástrica. Vinte e três dias após a inoculação todos os animais foram eutanasiados, utilizando-se o método de insensibilização por eletrocussão e sangria.

Foram realizados exames clínicos para avaliação da consistência das fezes da ampola retal, em todos os animais, três vezes por semana (segundas, quartas e sextas feiras), usando escore que varia de zero a três. Grau zero significava fezes normais, grau 1 fezes semisólidas ou pastosas, grau 2 fezes líquidas e grau 3 fezes líquidas ou pastosas com sangue e/ou fragmentos de mucosa necrótica.

Piloto II

Como não foi possível a produção de inóculo suficiente no piloto I para o experimento com 90 leitões, fez-se necessária a execução de um segundo piloto. Para o piloto II, utilizaram-se outros 20 leitões, também com cinco semanas de idade, de ambos os sexos e peso médio de 7,05 ± 0,828 Kg, provenientes da mesma propriedade do piloto I. Os animais foram alojados nas mesmas instalações, e seguiram exatamente o mesmo protocolo descrito no piloto I. A principal diferença foi o aumento significativo na quantidade

de bactéria (*L. intracellularis*) inoculada por animal no piloto II.

Experimento

Foram utilizados 94 leitões de cinco semanas de idade, de ambos os sexos, provenientes da mesma granja dos pilotos I e II. Estes animais, já identificados por brincos, foram pesados à chegada e alojados em 16 baias suspensas de creche, localizadas nas Escola de Veterinária da UFMG, recebendo água e ração a vontade (Fig. 3.1). Os leitões foram divididos em três grupos (T1, T2 e T3), com 30 animais por grupo, utilizando delineamento

inteiramente casualizado, agrupando e balanceando por peso: leve, moderadamente leve, médio, moderadamente pesado e pesado. Foram utilizadas cinco baias, com seis animais em cada, para cada grupo experimental. Três leitões muito leves e um muito pesado foram retirados do experimento e alojados na 16ª baia. Através de sorteio, determinou-se qual tipo de ração, sem medicação (T1), medicadas com concentração de 90 ppm (T2) ou 180 ppm de leucomicina (T3), cada baia receberia durante o período do dia -1 ao dia 13 do experimento. Após este período, os animais de todos os grupos passaram a receber ração não medicada.



Figura 3.1: Baias suspensas de creche com piso ripado, cocho de depósito e bebedouro do tipo chupeta localizadas no Hospital Veterinário da UFMG utilizadas para condução do experimento.

Inoculação

No dia zero, todos os animais foram inoculados, por via intragástrica, com inóculo de homogenado de mucosa contendo aproximadamente 4.5×10^9 organismos de *L. intracellularis*, segundo o mesmo protocolo utilizado para inoculação dos animais dos experimentos piloto.

Avaliação clínica e de desempenho

Avaliações clínicas com relação à consistência das fezes foram realizadas três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), a partir do dia da inoculação, como descrito no piloto I. O consumo de ração por baía foi avaliado até o dia 13 e deste dia até o dia 23, quando todos os animais foram eutanasiados. Todos os leitões foram pesados no dia -2, antes da inoculação, no dia 13, após troca de ração, e no dia 23, antes da avaliação necroscópica.

Avaliação macroscópica, histológica e IHQ

No dia 23 após a inoculação, os 90 animais do teste da leucomicina foram eutanasiados, pesados e necropsiados. Os intestinos delgado e grosso foram avaliados macroscopicamente, com anotação da extensão e intensidade da lesão, que variou de grau zero a grau 3, sendo grau zero o intestino normal, grau 1 intestino com espessamento de mucosa intestinal, grau 2 intestino com espessamento e necrose de mucosa e grau 3 o intestino com espessamento de mucosa e hemorragia com formação de coágulo intraluminal.

Fragmentos de dois centímetros de jejuno, íleo e cólon foram coletados e fixados em formol tamponado 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e preparadas duas lâminas, uma corada pela técnica histológica de HE (Luna, 1968) e a outra pela IHQ usando a técnica da Streptavidina marcada, usando anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis* (Guedes e

Gebhart, 2003c). Achados histológicos foram classificados de zero a três, sendo zero histologicamente normal, 1 áreas focais de hiperplasia de criptas intestinais, 2 áreas multifocais de hiperplasia de criptas e 3 quase a totalidade das criptas hiperplásicas. A marcação pela IHQ foi graduada em escala de zero a quatro, sendo zero nenhuma marcação para *L. intracellularis*, grau 1 foco isolado de marcação antigênica, grau 2 múltiplos focos de marcação antigênica (cerca de 25% das criptas), grau 3 quando a maioria da mucosa apresenta marcação (26 a 75% das criptas) e grau 4 quase a totalidade da mucosa intestinal apresenta marcação antigênica (acima de 80% das criptas).

Avaliação sorológica

No dia anterior a inoculação, amostras de sangue foram coletadas da veia jugular de todos os animais e testadas utilizando-se um kit de ELISA de competição específico para *L. intracellularis* (Enterisol[®] Ileitis-ELISA), para verificação da negatividade dos animais, antes da inoculação.

Deteção de *L. intracellularis* em amostras fecais

Amostras de fezes de dois leitões de cada baía foram coletadas diretamente do reto, no anterior à inoculação. Estas amostras foram armazenadas à -20°C e, posteriormente, testadas pela técnica de PCR para deteção de ácido nucléico da *L. intracellularis*, como descrito por Jones et al. (1993), também para verificação de negatividade dos animais antes da inoculação.

Análise estatística

Os resultados de GPD, consumo de ração e CA por grupo (T1, T2 e T3) foram analisados estatisticamente usando Análise de Variância (One-Way ANOVA), delineamento inteiramente casualizado, e comparação de médias pelo teste LSD (Least Statistical Difference), sendo a

unidade experimental indivíduo para GPD, e baia para consumo de ração e CA. Resultados macroscópicos foram analisados usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis One-Way ANOVA, sendo indivíduo a unidade experimental. A extensão das lesões macroscópicas foi multiplicada pelo número que caracteriza a severidade da lesão em cada animal afetado, para levar em consideração a gravidade do processo (Guedes e Gebhart, 2003a).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Piloto I

O inóculo do piloto I continha aproximadamente 10^6 organismos de *L. intracellularis*. Um dos 19 leitões inoculados morreu no dia seguinte a inoculação por motivos não relacionados à infecção por *L. intracellularis*. Durante os 23 dias após a inoculação nenhum dos 18 leitões restantes apresentou episódios de diarreia. À necropsia, nove dos 18 animais apresentaram lesões macroscópicas discretas, sugestivas de EPS. Através da técnica de IHQ, observou-se que 17 (94,4 %) dos 18 animais apresentaram marcação positiva para *L. intracellularis*.

Apesar da ausência de sinais clínicos típicos e presença somente de lesões leves à necropsia, o ganho de peso médio diário dos animais (225,14 g/dia) foi muito inferior ao observado rotineiramente em animais com a mesma idade e nas mesmas condições (cerca de 0,450 g/dia). Além disto, quase a totalidade destes animais se infectaram com a bactéria, como demonstrado na coloração de IHQ. Por esses motivos, pode-se afirmar que obteve-se a reprodução da forma subclínica da EPS, sendo esta a primeira tentativa bem sucedida deste modelo experimental na América Latina. Entretanto, o objetivo inicial deste piloto de ampliação do inóculo para o experimento com 90 leitões não foi

alcançado, necessitando a execução de um segundo piloto.

Piloto II

Nesse experimento, cada leitão recebeu aproximadamente 1×10^9 organismos de *L. intracellularis* por via intragástrica, contida em 40 mL homogenado de mucosa. Um dos 20 leitões morreu no dia seguinte a inoculação por motivos não relacionados à infecção por *L. intracellularis*. Durante o período pós-inoculação, especialmente a partir do dia 14 após a inoculação, 11 leitões apresentaram diarreia pastosa e líquida, tendo um dos animais apresentado diarreia com sangue por três dias consecutivos.

Todos os dezenove leitões apresentaram lesões macroscópicas compatíveis com a forma crônica de EPS e 18 apresentaram marcação positiva à coloração por IHQ, demonstrando o sucesso da inoculação e reprodução da doença clínica. O ganho de peso médio diário dos animais foi baixo, inferior ao observado nos animais do piloto I ($198,41 \pm 98,28$ g/dia). Concluiu-se ter sido bem sucedida a reprodução experimental da forma crônica da EPS com apresentação clínica evidente, lesões macroscópicas, histológicas, infecção comprovada pela IHQ e marcante redução do ganho de peso diário. Desta forma, todo o material intestinal com lesões macroscópicas produzido neste piloto foi preservado sob congelação a -80°C para preparação do inóculo do experimento com 90 animais. Esta foi a primeira vez que a doença clínica foi reproduzida experimentalmente na América Latina.

Experimento

Por não existirem dados experimentais sobre a eficácia da leucomicina em leitões optou-se pela utilização das duas concentrações da droga mais

freqüentemente utilizadas a campo e já presentes na bula do produto comercial.

Observações clínicas

Onze leitões, um do grupo não medicado, sete do grupo medicado com 90 ppm e três do grupo medicado com 180 ppm de leucomicina, morreram ou tiveram que ser eutanasiados no dia seguinte à inoculação por motivos não relacionados à infecção por *L. intracellularis*. Mesmo assim, o experimento manteve os grupos balanceados por peso e com repetições suficientes para avaliação dos objetivos propostos.

O curso da doença clínica, baseado na consistência das fezes, está ilustrado na figura 3.2. A freqüência de diarreia foi

discreta e isolada durante todo experimento nos grupos medicados e mais freqüente e grave no grupo T1, não medicado, especialmente entre os dias 16 e 20 após a inoculação. Este período é normalmente o mais crítico com relação a doença clínica em animais controle (inoculados e não medicados), neste tipo de modelo experimental (Guedes et al, 2002b, Guedes e Gebhart, 2003a). Dois animais do grupo não medicado apresentaram diarreia sanguinolenta 16 dias após inoculação. Dois animais morreram durante o experimento, um do grupo não medicado, 18 dias após inoculação, e um no grupo medicado com 90 ppm de leucomicina, no dia 22. Ambos apresentaram à necropsia palidez intensa generalizada e alterações intestinais típicas da forma aguda de EPS.

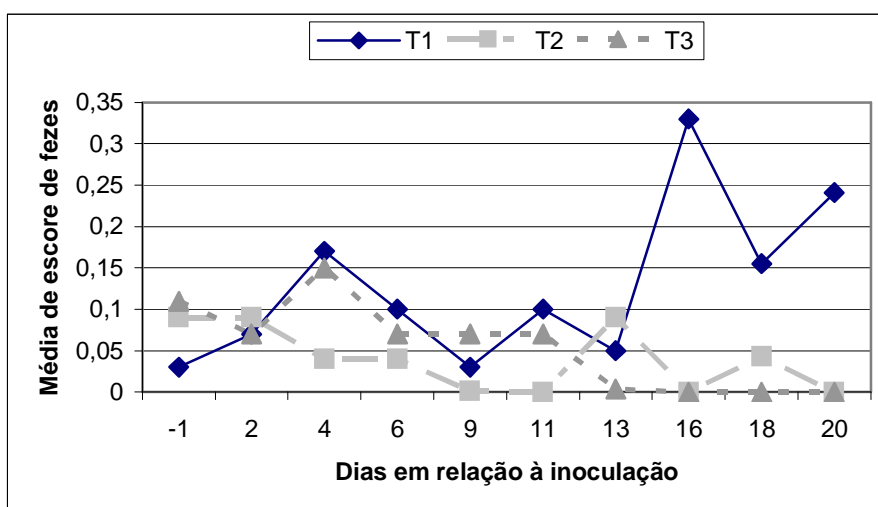


Figura 3.2: Evolução cronológica da média de escores clínicos baseados na consistência das fezes em animais do grupo não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina.

Ainda em relação a doença clínica, especialmente no período entre os dias 16 e 20, alguns animais do grupo controle apresentaram-se com discreta apatia. Já o escore corporal apresentou grande variação, sendo que alguns animais do grupo não medicado estavam magros ao final do experimento. Além disso, observou-se

marcante desuniformidade entre os animais do grupo não medicado (Dados não apresentados).

Desempenho

A diferença de ganho de peso diário, entre o grupo não medicado e os dois grupos

medicados, demonstrou o efeito positivo da leucomicina (Tab. 3.1); os animais medicados apresentaram a média do peso

final 2,0 kg superior e GPD, em média, 80 gramas a mais que os animais não medicados (Fig. 3.3).

Tabela 3.1. Peso médio, em quilos, ganho de peso diário (GPD), em quilos por dia e coeficiente de variação, em porcentagem (%), dos grupos não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina em diferentes períodos após inoculação.

Grupos	Peso dia -2	Peso dia 13	GPD -2 a 13	Peso dia 23	GPD -2 á 23
T1 (n=29)	6,278 ± 0,812 ^{a*} 12,9% ^{**}	11,602 ± 1,390 ^a 12%	0,355 ± 0,064 ^a 18%	8,458 ± 3,021 ^a 35,7%	0,339 ± 0,119 ^a 35,1%
T2 (n=23)	6,068 ± 0,667 ^a 11%	11,843 ± 1,596 ^{ab} 13,5%	0,385 ± 0,080 ^{ab} 20,8%	10,474 ± 2,14 ^b 20,4% ^{**}	0,419 ± 0,086 ^b 20,5%
T3 (n=27)	6,227 ± 0,686 ^a 11%	12,267 ± 1,924 ^b 15,7%	0,403 ± 0,095 ^b 23,6%	10,972 ± 2,625 ^b 23,9%	0,438 ± 0,105 ^b 24%

* Diferentes letras indicam diferenças (P<0.05) entre grupos experimentais.

** Coeficiente de variação (CV)



Figura 3.3.: Leitões do grupo T1. Observar desuniformidade.

O consumo médio diário de ração no período inicial até dia 13 após inoculação não diferiu entre os grupos (P>0.05), mas houve diferença estatística entre o grupo

medicado com 90 ppm (T2) e o grupo não medicado (T1) (Tab 3.2). O mesmo foi observado com relação a conversão alimentar em todo o período.

Tabela 3.2. Consumo médio diário (CMD) de ração, em gramas por dia, e conversão alimentar (CA) dos grupos não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina em diferentes períodos após inoculação.

Grupos	CMD de 2 à 13	CMD de 14 à 23	CMD de 2 à 23	CA
T1	649,0 ± 59,9a [*] 9,2% ^{**}	547,7 ± 99,8a 18,2% ^{**}	600,8 ± 61,8a 10,3% ^{**}	1,838 ± 0,328a 17,8% ^{**}
T2	670,9 ± 53,5a 8% ^{**}	699,0 ± 69,6b 9,9% ^{**}	684,3 ± 42,5b 6,2% ^{**}	1,632 ± 0,109ab 6,7% ^{**}
T3	661,2 ± 45,8a 6,9% ^{**}	635,0 ± 98,7ab 15,5% ^{**}	662,3 ± 62,3ab 9,4% ^{**}	1,448 ± 0,269b 18,6% ^{**}

* Diferentes letras indicam diferenças (P<0.05) entre grupos experimentais.

** Coeficiente de variação (CV)

Resultados anatomopatológicos

Os dois animais que vieram a óbito durante o experimento apresentaram lesões macroscópicas típicas da forma hemorrágica da EPS, com extensão de 280 e 160 cm para o animal do grupo não medicado e medicado com 90 ppm de leucomicina, respectivamente. À necropsia, apenas um animal do grupo não medicado

(T1) apresentou lesão necrótica. Este mesmo grupo apresentou o maior número de animais com lesão macroscópica típica de EPS e maior extensão de lesão quando comparado com os outros dois grupos (Tab. 3.3). Ou seja, foram observados diferentes tipos de lesões macroscópicas à necropsia, inclusive a forma hemorrágica (Fig. 3.4ab), validando o modelo experimental para o desenvolvimento da doença clínica.

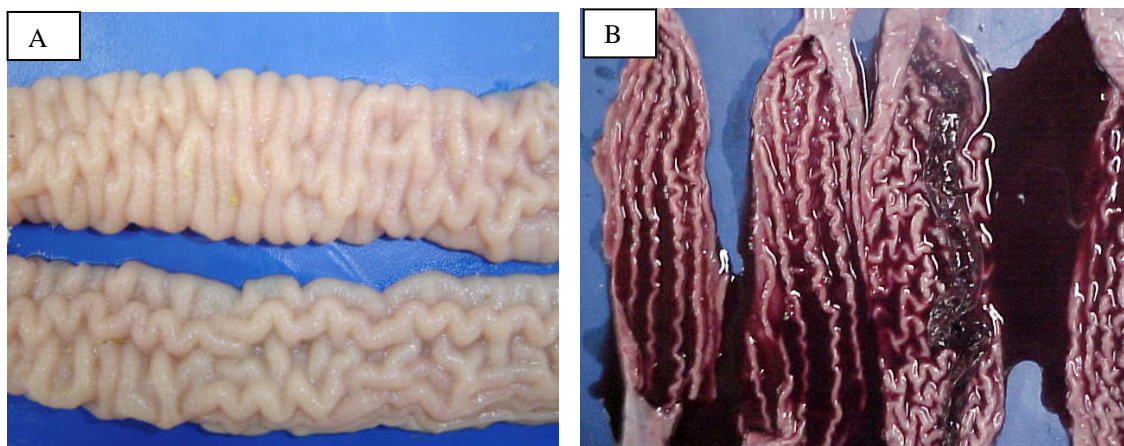


Figura 3.4: Intestino delgado de leitões inoculados experimentalmente com homogenado de mucosa contendo *L. intracellularis*. (a) Enteropatia proliferativa crônica, observar espessamento da mucosa com pregas bastante evidentes. (b) Enteropatia proliferativa hemorrágica, observar espessamento da mucosa com sangue e coágulo no lúmen, além do típico espessamento.

Tabela 3.3. Gravidade de lesões macroscópicas e média de extensão de lesão, em cm, à necropsia, por animais afetados e pelos grupos não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina.

Grupos	Grau 0*	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Número de animais com lesão	Extensão total de lesão (cm)	Média de comprimento de lesão/ leitão afetado (cm)
T1 (n=29)	18	9	1	1	11	869	79,00
T2 (n=23)	18	4	0	1	5	473	94,60
T3 (n=27)	18	9	0	0	9	331	36,78

* Grau 0 = normal; Grau 1 = espessamento da mucosa; Grau 2 = espessamento e necrose de mucosa; Grau 3 = espessamento de mucosa e hemorragia com formação de coágulo intraluminal.

A grande maioria dos animais inoculados apresentou marcação positiva na IHQ nos fragmentos de íleo (Tabela 3.4),

confirmando a presença de infecção induzida pela inoculação experimental.

Tabela 3.4. Intensidade de infecção por *L. intracellularis* em fragmentos de íleo baseado na marcação por IHQ em animais dos grupos não medicado (T1), medicado com 90 ppm (T2) e 180 ppm (T3) de leucomicina.

Grupos	Grau 0*	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Número de animais com marcação	% de animais com marcação
T1 (n=28)	2	3	8	10	5	26	92,86
T2 (n=23)	9	9	3	1	1	14	60,87
T3 (n=27)	2	5	13	5	1	25	92,59

* Grau 0 = Nenhuma marcação de antígeno; Grau 1 = Foco isolado de marcação antigênica; Grau 2 = Múltiplos focos de marcação de antígeno; Grau 3 = Maioria da mucosa apresenta marcação; e Grau 4 = Toda a mucosa apresenta marcação.

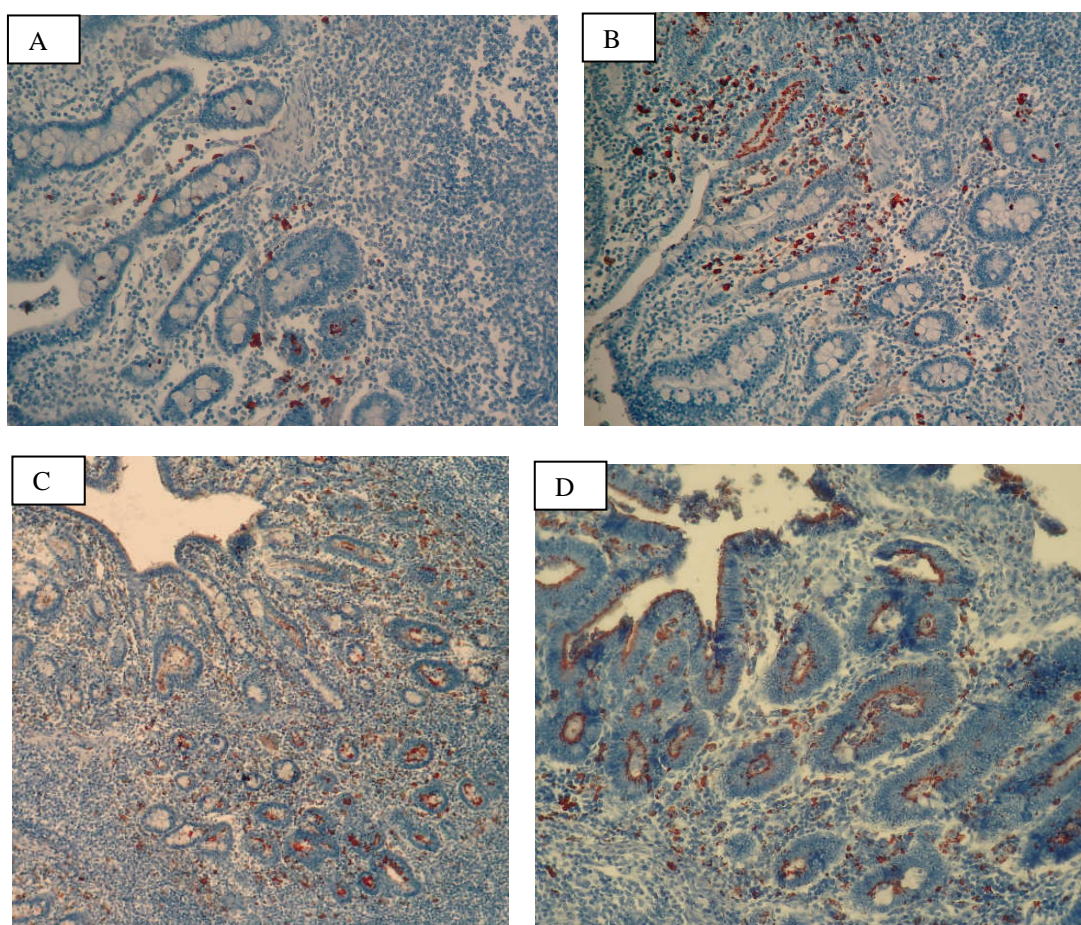


Figura 3.5: Microfotografia de íleo corado pela IHQ utilizando anticorpo específico para *L. intracellularis*. Observar diferentes graus de marcação: (A) Grau 1, até 25% das criptas infectadas pela bactéria (400x); (B) Grau 2, com até 50% das criptas infectadas (400x); (C) Grau 3, até 75% das criptas infectadas (200x); e Grau 4, com quase a totalidade das criptas infectadas (400x).

Dois animais, um animal T1 e outro T2, foram sorologicamente positivos, no dia

anterior à inoculação, os demais negativos. Apesar desses leitões serem provenientes de

granja sem quadro clínico de EP, apresentaram anticorpos contra *L. intracellularis* anteriormente a inoculação, possivelmente anticorpos passivos recebidos da matriz. Todas as amostras fecais, coletadas no dia anterior à inoculação, foram negativas para DNA do agente etiológico da EP, inclusive dos animais soropositivos, ou seja, apesar de possuírem anticorpos contra a bactéria, não estavam eliminando-a nas fezes.

Neste estudo, para se testar o possível efeito positivo da leucomicina no controle da EP, utilizou-se um modelo experimental de exposição-desafio semiquantitativo, de acurácia comprovada (Winkelman et al., 2002ab). Assim, todos os 90 animais foram experimentalmente inoculados com homogenado de mucosa intestinal contendo elevada concentração de organismos de *L. intracellularis*, no mesmo dia e receberam a mesma dose da bactéria, para que a cinética da infecção fosse o mais parecida possível em todos os animais desafiados. Pôde-se observar que o fornecimento contínuo de leucomicina na ração, nas concentrações de 90 e 180 ppm, do dia anterior à inoculação ao dia 13 do experimento, foi eficiente em controlar a infecção e conseqüentemente os efeitos desta.

Assim, à semelhança de outros macrolídeos, como tilosina (McOrist et al., 1997b; McOrist e Morgan, 1998; Tasker et al., 2004), a leucomicina mostrou-se eficiente contra a *L. intracellularis*. Para apresentar eficiência “in vivo” o antimicrobiano ingerido deve passar pelo trato gastrointestinal e atingir a porção distal do intestino delgado, ambiente de fermentação bacteriana e baixa tensão de oxigênio, em forma farmacologicamente ativa, em concentração inibitória, penetrar os enterócitos e no citosol dessas células agir sobre a bactéria (McOrist et al., 1997b). Sabidamente, o grau de lesão macroscópica e a histologia está diretamente relacionado ao número de

enterócitos infectados. Quando o animal ingere inóculo contendo dose infectante de *L. intracellularis* e não recebe antimicrobiano eficiente, ao mesmo tempo, sofre infecção pela bactéria, que após penetrar enterócitos, se dividir inúmeras vezes, é liberada no meio extracelular e assim pode infectar outros enterócitos, continuando o ciclo de infecção (Lawson e Gebhart, 2000). Entretanto, quando, simultaneamente, há ingestão de bactéria e consumo de antimicrobiano eficiente contra esta, a multiplicação do agente é limitada, limitando-se também as conseqüências da infecção (McOrist et al., 1997a).

Estudos “in vivo”, refletem a real cinética da infecção, diferentemente do que ocorre em experimentos “in vitro” (McOrist et al., 1997a). Assim, com base nos resultados obtidos nesse estudo, pode-se observar que a leucomicina foi capaz de limitar a atividade da *L. intracellularis* nos enterócitos de animais que foram inoculados e tratados, melhorando, conseqüentemente, os resultados de performance. Isso, se justifica já que quando uma extensa área intestinal apresenta enterócitos infectados e, portanto com baixa capacidade de absorção e de secreção de enzimas, o animal continua ingerindo ração, entretanto essa ração não é adequadamente digerida nem tampouco absorvida pelas células intestinais infectadas e, conseqüentemente, os resultados de ganho de peso e conversão alimentar são inferiores aos de animais nos quais a infecção é controlada.

Além disso, a severidade da diarreia dependerá da extensão, intensidade e localização da principal área lesada. Em outras palavras, a principal função do intestino delgado é absorção de nutrientes, assim o animal que apresenta a maior parte das lesões no intestino delgado apresentará ganho de peso diário e conversão alimentar aquém de um animal não infectado.

3.4. CONCLUSÕES

No piloto I, até onde pode ser constatado na literatura, este é o primeiro relato de reprodução experimental da forma subclínica de EP na América Latina. No piloto II, desenvolveu-se a forma clínica em leitões experimentalmente inoculados, também pela primeira vez na América Latina.

Baseado nos achados clínicos, lesões macroscópicas, resultados imunoistoquímicos e de desempenho dos animais tanto nos pilotos quanto no

experimento propriamente dito, associado a ocorrência de mortalidade neste último, ficou demonstrado que o modelo experimental foi bem sucedido, desenvolvendo quadro típico de EPS.

Com base principalmente nos resultados de desempenho (GPD, CMD e CA) econômico em um sistema de produção de suínos, a leucomicina mostrou-se eficiente no controle da EPS com melhora significativa dos índices avaliados de animais medicados com ambas concentrações da droga, 90 e 180 ppm, em comparação com o grupo não medicado.

Capítulo 4:

Eficácia do tartarato de acetil-isovaleril-tilosina (Aivlosin[®]) no controle da enteropatia proliferativa em leitões experimentalmente inoculados

RESUMO

Teve-se como objetivo testar a eficiência do acetil-isovaleril-tilosina (AIVT) no controle da EPS. Para isso, utilizaram-se 90 leitões de cinco semanas de idade. Grupos de 30 animais foram submetidos a três tratamentos diferentes. T1 foi o grupo dos inoculados e não medicados, T2 inoculados e medicados com 50 ppm de AIVT e T3 inoculados e medicados com 100 ppm de tiamulina. No dia zero do experimento, os 90 suínos foram inoculados com aproximadamente $1,3 \times 10^{10}$ *L. intracellularis*. Os leitões começaram a receber seus respectivos medicamentos no dia anterior à inoculação e foram eutanasiados no dia 20. Sinais clínicos foram mais evidentes no grupo não medicado que nos medicados. O desempenho diferiu entre T1, T2 e T3, mostrando o efeito positivo tanto do AIVT quanto da tiamulina. Os animais T2 e T3 foram, ao final, em média, 2 kg mais pesados e o GPD foi, em média, 90g por dia maior, que os do grupo T1. Além disso, os animais T2 e T3 apresentaram melhor CA melhor que os T1. A média do comprimento de lesão, por leitão, de T1, T2 e T3 foi 94,9, 6,1 e 6,8 cm, respectivamente. A porcentagem de positividade a IHQ foi de 96,7%, 53,6% e 33,3%, respectivamente. Baseando-se nos sinais clínicos, lesões macroscópicas e histopatológicas demonstrou-se que tanto a AIVT quanto a tiamulina, à 50 e 100 ppm respectivamente, foram eficientes para o controle da EPS.

Palavras-chave: Suíno; EPS; *L. intracellularis*; controle; AIVT.

4.1. INTRODUÇÃO

É importante que se conheçam o maior número possível de antimicrobianos eficientes no controle e tratamento da enteropatia proliferativa suína (EPS), principalmente em relação ao desenvolvimento de resistência bacteriana. O acetil-isovaleril-tilosina (AIVT - Aivlosin[®]) é um macrolídeo, derivado da eritromicina, registrado pela empresa ECO Animal Health. À semelhança de outros macrolídeos, inclusive da leucomicina, o AIVT tem sido utilizado empiricamente no controle da EPS. Assim, realizou-se esse trabalho com o objetivo de avaliar a eficiência do AIVT em leitões experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA)

da UFMG (Protocolo nº. 9/2006) e seguiu suas normas durante sua execução.

A preparação do inóculo ocorreu como descrito no experimento da leucomicina. Neste experimento foram utilizados 90 leitões, de ambos os sexos, de cinco semanas de idade, procedentes do mesmo rebanho dos leitões utilizados no experimento do capítulo 3. Estes animais, já identificados por brincos, foram pesados à chegada (dia -3 do experimento) e alojados em 15 baias de creche suspensas, em galpão do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, recebendo ração e água à vontade, como descrito no capítulo 3.

Utilizando delineamento inteiramente casualizado, separando os animais por peso, formaram-se cinco grupos, a saber: leve, moderadamente leve, médio, moderadamente pesado e pesado. Os 90 leitões foram divididos em três grupos experimentais (tratamentos), T1, T2 e T3, com 30 animais por grupo, sendo cinco repetições (baias) por grupo. Através de sorteio, determinou-se a qual tipo de

tratamento cada baia seria submetida, sendo que cinco baias receberam ração sem medicação, formando o grupo T1, cinco baias receberam ração com 50 ppm de AIVT, grupo T2, e cinco baias receberam ração com 100 ppm de tiamulina, formando o grupo T3. Todos os animais receberam suas respectivas rações (T1, T2 e T3) do dia -1 do experimento, dia anterior a inoculação, até o dia 13 experimental. Do dia 14 ao dia 20, quando foram eutanasiados, todos os leitões dos três grupos receberam ração sem medicação.

Inoculação

A preparação do inóculo e a quantificação do mesmo foram realizadas como mencionado no capítulo 3 dessa dissertação. No dia zero do experimento, por via intragástrica, usando sonda orogástrica, os 90 leitões foram inoculados com homogenado de mucosa intestinal de suínos infectados, contendo aproximadamente $1,3 \times 10^{10}$ organismos de *L. intracellularis*.

Avaliação clínica e de desempenho

Avaliações clínicas com relação a atitude, escore corporal e consistência de fezes foram realizadas três vezes por semana, as segundas, quartas e sextas-feiras. As fezes eram descritas como normais, pastosas, líquidas e fezes com sangue e / ou material necrótico, como mencionado no capítulo 3.

O consumo de ração por baia foi avaliado do dia -1 ao dia 13 e do dia 14 ao dia 20 do experimento, quando todos os leitões foram eutanasiados. Os 90 leitões foram pesados nos dias 13 e 20. Assim com o valor da quantidade de ração consumida no período e do ganho de peso diários dos animais, pode-se determinar a conversão alimentar.

Avaliação macroscópica, histológica e IHQ

No dia 20 após a inoculação, os 90 animais do teste da AIVT foram eutanasiados, pesados e

necropsiados. Avaliações sorológicas, PCR de amostras fecais, macroscópica e histológica, e análise estatística foram realizadas de forma semelhante ao descrito no capítulo 3.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência do AIVT já foi demonstrada anteriormente (Winkelman e Tasker, 2002; Tasker et al., 2004). Entretanto, nesse estudo optou-se por comparar os efeitos do AIVT com a ação da tiamulina, um antimicrobiano do grupo das pleuromutilinas, eficiente no controle da EP em suínos (McOrist et al., 1996b; Schwartz et al., 1999; Walter et al., 2001). Portanto, utilizou-se um controle positivo, com animais inoculados e não medicados (T1), e um grupo com animais inoculados e medicados com tiamulina (T3).

Observações clínicas

O curso da doença clínica, baseado na consistência das fezes, está ilustrado na figura 4.1. Assim, pode-se observar que a ocorrência de diarreia no intervalo do dia zero ao dia nove do experimento foi discreta e isolada, tanto nos grupos medicados quanto no grupo não medicado. Esse fato era esperado, pois segundo a literatura (Guedes, 2002), geralmente, os animais começam a apresentar sintomas clínicos entre os dias sete e dez após inoculação. A partir do nono dia após a inoculação, os grupos medicados e o não medicado apresentaram resultados diferentes quanto ao escore clínico de diarreia (Fig. 4.1). O grupo T1, não medicado, passou a apresentar episódios mais frequentes e mais graves de diarreia, em relação aos grupos medicados, sendo que dois animais deste grupo apresentaram diarreia sanguinolenta entre os dias 11 e 20 do experimento. Como mencionado no capítulo 3, esse período é crítico em relação a doença clínica em animais não medicados.

Assim, comparando-se a linha correspondente aos animais inoculados e não tratados (T1) da figura 4.1 com a figura 3.2 do experimento com a leucomicina, observa-se que o escore de diarreia em relação aos dias após a inoculação é semelhante. Ou seja, nos nove dias iniciais,

após inoculação, observaram-se casos isolados e discretos. Com o passar do tempo o número e a gravidade da diarreia foram aumentando, atingindo o período crítico entre os dias 13 e 20, sendo que ambos os experimentos, apresentaram dois animais com diarreia sanguinolenta.

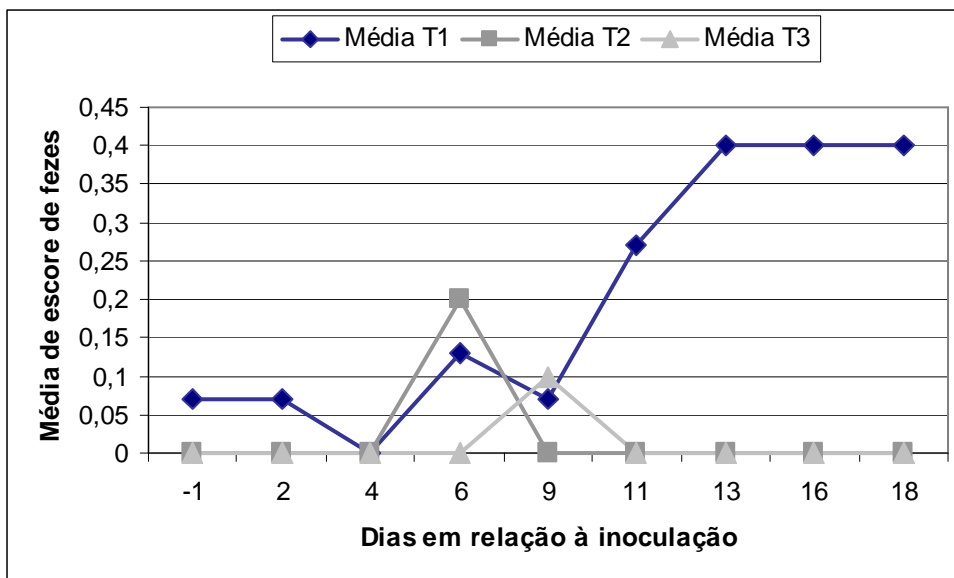


Figura 4.1: Evolução cronológica da média de escores clínicos baseados na consistência das fezes em animais do grupo não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3).

Em relação à atitude, somente os dois animais que apresentaram diarreia sanguinolenta mostraram-se moderadamente apáticos durante a manifestação clínica da doença, sendo que um deles apresentou-se prostrado durante este período. Já o escore corporal apresentou grande variação, sendo que vários animais do grupo não medicado estavam magros ao final do experimento. Além disso, observou-se marcante desuniformidade dentro do grupo não medicado.

Desempenho

A diferença de ganho de peso diário entre o grupo não medicado (T1) e os grupos

medicados (T2 e T3) foi estatisticamente significativa, demonstrando o possível efeito positivo do AIVT e da tiamulina, como mostra a tabela 4.1. Ou seja, os animais medicados com AIVT ou com tiamulina apresentaram peso médio final 2 kg maior que o peso médio final dos animais que não foram medicado. E os animais medicados apresentaram, em média, no GPD 90g a mais que os animais não medicados (tab. 4.1). Esta diferença foi observada clinicamente pela desuniformidade observada entre os animais do grupo T1 (Fig. 4.2). Não se observou diferença significativa de peso no dia 20 e de GPD, entre o grupo medicado com AIVT (T2) e o grupo medicado com tiamulina (T3).

Tabela 4.1. Peso médio e GPD, em quilos, dos grupos não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3) em diferentes períodos após a inoculação.

Grupos	Peso dia -3	Peso dia 13	GPD -3 a 13	Peso dia 20	GPD -3 a 20
T1 (n=30)	10,303 ± 1,174a 11,4%*	18,35 ± 1,329a 7,2%	0,503 ± 0,099a 19,7%	20,686 ± 1,73a 8,4%	0,451 ± 0,076a 16,8%
T2 (n=30)	10,295 ± 1,174a 11,4%	18,879 ± 1,679a 8,9%	0,536 ± 0,091ab 17%	22,75 ± 2,24ab 9,8%	0,541 ± 0,054b 10%
T3 (n=30)	10,326 ± 1,249a 12,1%	19,514 ± 1,934a 9,9%	0,574 ± 0,078b 13,6%	23,388 ± 2,168b 9,3%	0,568 ± 0,047b 8,3%

* Diferentes letras indicam diferenças (P<0.05) entre grupos experimentais.

** Coeficiente de variação (CV)



Figura 4.2: Desuniformidade entre leitões do grupo T1, inoculados e não medicados.

Não houve diferença (P>0,05) de consumo médio de ração entre os três grupos experimentais, T1, T2 e T3 em nenhum dos períodos avaliados (Tab. 4.2). Já a conversão alimentar do grupo T1 foi diferente (P < 0,05) dos valores obtidos para T2 e T3, que foram estatisticamente iguais entre si. Portanto, os animais dos três tratamentos ingeriam a mesma quantidade

de ração, entretanto a conversão alimentar nos grupos medicados foi estatisticamente superior ao resultado de T1, indicando que o fornecimento de antimicrobianos, tanto AIVT quanto tiamulina, é benéfico no controle da infecção pela *L. intracellularis* e, conseqüentemente, melhora a conversão alimentar.

Tabela 4.2. Consumo médio diário (CMD) de ração, em gramas, e conversão alimentar (CA) dos grupos não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3) em diferentes períodos após a inoculação.

Grupos	CMD de -1 à 13	CMD de 14 à 20	CMD de -1 à 20	CA
T1	807,9 ± 58,6a* 7,2%*	977,8 ± 209,2a 21,4%	862,0 ± 96,1a 11,1%	1,846 ± 0,189 10,2%
T2	813,3 ± 67,9a 8,3%	1074,0 ± 150,4a 14%	896,4 ± 89,9a 10%	1,583 ± 0,016 1%
T3	850,1 ± 75,4a 8,9%	1125,0 ± 119,3a 10,6%	886,0 ± 186,1a 21%	1,597 ± 0,063 3,9%

* Diferentes letras indicam diferenças (P<0.05) entre grupos experimentais.

** Coeficiente de variação (CV)

Como esperado, todos os animais testados no dia anterior à inoculação foram negativos ao teste de ELISA específico para sorologia contra *L. intracellularis*. Todas as amostras fecais, coletadas no dia anterior a inoculação e testadas através da técnica de PCR, descrita por Jones et al. (1993), foram negativas para DNA do agente etiológico da EP. Ambos os resultados demonstram que os animais ainda não haviam entrado em contato com a bactéria, sendo infectados a partir da inoculação experimental.

Resultados anatomo-histopatológicos

A tabela 4.3 mostra que 76,7% dos animais inoculados e não medicados (T1) apresentaram lesões de EPS à necropsia,

enquanto que nos grupos medicados, T2 e T3, esses valores foram de 30 e 27,7, respectivamente. Esse fato fica mais claro, ao se considerar que a extensão total de intestino com lesão macroscópica característica de EPS foi de 32,34 metros, e destes, mais de 88% ocorreram em animais que receberam ração sem medicação (Tabela 4.3). Com base nesses valores, pode-se afirmar que os animais do grupo T1 apresentaram lesões de EPS com maior frequência e gravidade em relação aos grupo medicados, T2 e T3. Ou seja, o AIVT e a tiamulina são eficientes, de forma semelhante, em limitar a infecção e portanto as consequências da EPS.

Tabela 4.3. Gravidade de lesões macroscópicas e média de extensão de lesão, em cm, à necropsia, por animais afetados e pelos grupos não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3).

Grupos	Grau 0*	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Número de animais com lesão	Comprimento total de lesão (cm)	Média de comprimento de lesão/ leitão afetado (cm)
T1 (n=30)	7	23	0	0	23	2.847	123,78a**
T2 (n=30)	21	9	0	0	9	183	20,33b
T3 (n=30)	22	8	0	0	8	204	25,5b

* Grau 0 = normal; Grau 1 = espessamento da mucosa; Grau 2 = espessamento e necrose de mucosa; Grau 3 = espessamento de mucosa e hemorragia com formação de coágulo intraluminal.

** Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre grupos experimentais.

É importante ressaltar que tanto na forma aguda quanto na forma crônica, o íleo é mais frequentemente afetado, mas lesões podem ser encontradas em qualquer segmento intestinal, do duodeno ao reto

(Guedes, 2002). E esse fato foi observado nesse experimento, uma vez que a maior parte das lesões se localizavam no íleo (Fig.4.3ab), no entanto observou-se lesão de EP no intestino grosso (Fig. 4.3c).

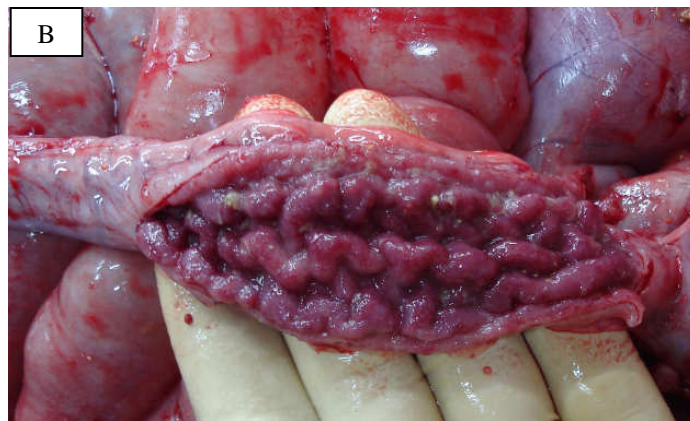
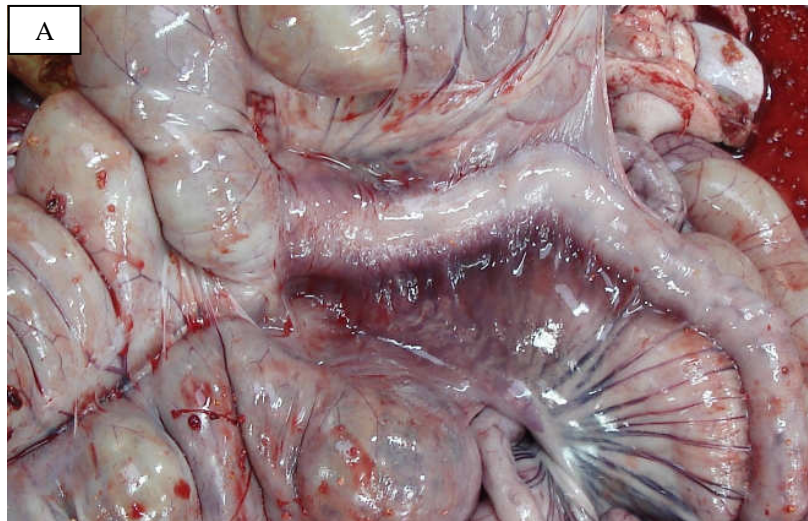


Figura 4.3: EP na forma crônica. (A) Intestino delgado. Observa-se intensa congestão e edema de mesentério adjacente ao íleo. (B) Intestino delgado e (C) intestino grosso. Observa-se intenso espessamento de mucosa intestinal com marcante protrusão de pregas.

Através da técnica de IHQ, verificou-se a presença de antígeno de *L. intracellularis*,

em segmento de íleo de todos os leitões do experimento. No grupo T1, 96,7% dos

animais apresentaram marcação positiva à IHQ, valor muito superior ao encontrado para os grupos T2 e T3, que foram 53,3% e 33,3%, respectivamente (Tab. 4.4). Além disso, a intensidade de marcação diferiu entre os tratamentos, e de forma significativa entre o grupo não medicado e os medicados. Por exemplo, em 75,9% dos animais T1 que apresentaram marcação positiva à IHQ, esta foi classificada como de grau 3 e 4. Já para os animais dos grupos medicados, T2 e T3, a porcentagem de animais com graus 3 e 4 à IHQ, foi de

18,7% e 0%, respectivamente (Tab. 4.4). Ou seja, nos grupos tratados, o número de animais infectados e a intensidade de infecção foi significativamente menor em relação aos animais do grupo controle. Assim, pode-se afirmar que a presença de antígeno da bactéria foi maior e mais freqüente em animais não medicados. Não houve diferença estatística entre os resultados de T2 e T3. Esses fatos corroboram a eficácia dos medicamentos utilizados.

Tabela 4.4. Intensidade de infecção por *L. intracellularis* em fragmentos de íleo baseado na marcação por IHQ em animais dos grupos não medicado (T1), medicado com 50 ppm de AIVT (T2) e 100 ppm de tiamulina (T3).

Grupos	Grau 0*	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Número de animais com marcação	% de animais com marcação
T1 (n=30)	1	3	4	18	4	29	96,7a**
T2 (n=30)	14	5	8	3	0	16	53,3b
T3 (n=30)	20	7	3	0	0	10	33,3b

* Grau 0 = Nenhuma marcação de antígeno; Grau 1 = Foco isolado de marcação antigênica; Grau 2 = Múltiplos focos de marcação de antígeno; Grau 3 = Maioria da mucosa apresenta marcação; e Grau 4 = Toda a mucosa apresenta marcação.

** Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre grupos experimentais.

Pode-se observar que o modelo experimental efetivamente induz a doença nos animais desafiados e não tratados. Além disso, observou-se claramente que o fornecimento contínuo de AIVT na ração, na concentração 50 ppm, do dia anterior à inoculação ao dia 13 do experimento, foi eficiente em controlar a infecção e as conseqüências da doença em leitões expostos a alta dose de *L. intracellularis*.

Assim, à semelhança de outros macrolídeos, como tilosina (McOrist et al., 1997b; McOrist e Morgan, 1998; Tasker et al., 2004), o AIVT, quando fornecido na ração diminui a ocorrência de lesões macroscópicas e histopatológicas encontradas na EPS, ou seja, o AIVT foi eficiente em limitar a infecção e assim diminuir as conseqüências da doença, como ocorrência de diarreia, lesões intestinais, macro e microscópicas, e perda de

performance, incluindo GPD e CA. Como esse experimento apresentou um grupo no qual houve inoculação não associada ao fornecimento de antimicrobianos, os resultados produtivos superiores nos grupos inoculados e medicados podem ser atribuídos ao uso do medicamento, que efetivamente limitou a infecção pela *L. intracellularis*. O AIVT apresentou resultados patológicos e de performance similares aos encontrados no grupo de animais medicados com tiamulina, sendo os resultados de ambos estatisticamente superiores aos resultados encontrados para os animais do grupo inoculado e não medicado. Entretanto, deve-se salientar que o custo da utilização do AIVT é alto e por isso proibitivo.

4.4. CONCLUSÕES

O modelo experimental foi eficiente na reprodução da EPS, desenvolvendo quadro típico da doença.

O AIVT é eficiente no controle da EPS, com melhora significativa dos índices produtivos avaliados de animais medicados em relação a animais inoculados e não medicados. Além de reduzir significativamente a extensão e grau de infecção de animais experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*. A utilização do AIVT na ração apresentou resultados semelhantes aos da tiamulina, que é comprovadamente eficiente no controle da EP em suínos.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base no experimento em que pardais foram experimentalmente inoculados, com alta dose de cultura pura de *L. intracellularis*, não apresentaram alterações clínicas ou patológicas decorrentes da infecção por essa bactéria, conclui-se que provavelmente essas aves não são susceptíveis a infecção por *L. intracellularis* e, portanto os pardais não são importantes na epidemiologia da EP.

No estudo que teve como objetivo avaliar a eficiência de leucomicina no controle da EPS em leitões experimentalmente inoculados com *L. intracellularis* se fez pela primeira vez a reprodução experimental da forma subclínica e posteriormente da forma clínica da EP na América Latina.

Baseado nos achados clínicos, lesões macroscópicas, resultados imunoistoquímicos e de desempenho dos animais tanto do experimento para testar leucomicina quanto do trabalho para avaliar o AIVT no controle da EP, ficou demonstrado que o modelo experimental foi

bem sucedido, desenvolvendo quadro típico de EPS.

Com base principalmente nos resultados de desempenho (GPD, CMD e CA), que são os mais importantes do ponto de vista econômico em um sistema de produção de suínos, tanto a leucomicina quanto o AIVT mostraram-se eficientes no controle da EPS, com melhora significativa dos índices produtivos avaliados de animais medicados em relação a animais inoculados e não medicados. Além de reduzir significativamente a extensão e grau de infecção de animais experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*. A utilização do AIVT na ração apresentou resultados semelhantes aos da tiamulina, que é comprovadamente eficiente no controle da EP em suínos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clin. Microbial. Rev.**, v. 15, nº 1, p. 58-65, 2002.

BANE, D.P.; NEUMANN, E.; GEBHART, C.J. et al. Porcine proliferative enteropathy: a case-control study in swine herds in the United States. **J. Swine Health Prod.**, v.9, n.4, p.155-158, 2001.

BIESTER, HE; SCHWARTE, LH. Intestinal adenoma in swine. **Am. J. Pathol.**, v. 7, p. 175-185, 1931.

BOESEN, H.T.; JENSEN, T.K.; SCHMIDT, A.J. et al. The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. **Vet. Microbiol.**, v.103, p.35-45, 2004.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. et al. Rapid and simple method for

- purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 495-503, 1990.
- CHANG, W.L.; WU, C. F.; WU, Y. et al. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in swine herds in Taiwan. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 103-104, 1997.
- CHIRIBOGA, A. E. C. N.; GUIMARAES, W. V.; VANETTI, M. C.D. et al. Detection of *Lawsonia intracellularis* in faeces of swine from the main production regions in Brazil. **Can. J. Microbiol.**, v. 45, p. 230-234, 1999.
- COLLINS, A.M.; DIJK, M.V.; VU, N.Q. et al. Immunity to *Lawsonia intracellularis*. In: Allen D. Lemna Conference, 28, 2001, Minneapolis. **Anais...Saint Paul: Veterinary Outreach Programs/UMN**, 2001. p. 115-120.
- COLLINS, A. M. ; LOVE, R. J. ; JASNI, S. et al. Attempted infection of mice, rats and chickens by porcine strains of *Lawsonia intracellularis*. **Aust. Vet. J.**, v. 77, n. 2, p. 120-122, 1999.
- COLLINS, A.M.; LOVE, R.J.; POZO, J. et al. Studies on the *ex vivo* survival of *Lawsonia intracellularis*. **Swine Health Prod.**, v. 8, p. 211-215, 2000.
- COOPER, DM; GEBHART, CJ. Comparative aspects of proliferative enteritis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 212, p. 1446-1451, 1998.
- COOPER, DM; SWANSON, DL; BARNES, SM; et al. Comparison of the 16S ribosomal DNA sequence from the intracellular agent of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, n. 3, p. 635-639, 1997a.
- COOPER, DM; SWANSON, DL; GEBHART, C. J. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer, and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. **Vet. Microbiol.**, v. 54, p. 47-62, 1997b.
- DUHAMEL, G. E.; WHEELDON, E. B. Intestinal adenomatosis in a foal. **Vet. Pathol.**, v. 19, p. 447-450, 1982.
- ELWELL, M. R.; CHAPMAN, A. L.; FRENKEL, J. K. Duodenal hyperplasia in a guinea pig. **Vet. Pathol.**, v. 18, n. 1, p. 136-139, 1981.
- ERICKSEN; LANDSVERK, K. T.; BRATBERG, B. Morphology and immunoperoxidase studies of intestinal adenomatosis in the blue fox, *Alopex lagopus*. **J. Comp. Pathol.**, v. 102, p. 265-278, 1990.
- FITZWATER, W. D. House sparrows. Prevention and control of wildlife damage, 1994. Disponível em: <http://hgic.clemson.edu/PDF/PCWDHOUS E SPARROWS.pdf>
- FOX, J. G.; DEWHIRST, F. E.; FRASER, G. J. et al. Intracellular *campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 5, p. 1229-1237, 1994.
- FOX, J. G.; LAWSON, G. H. K. *Campylobacter*-like omega intracellular antigen in proliferative colitis in ferrets. **Lab. Anim. Sci.**, v. 38, p. 34-36, 1988.
- GEBHART, C.; GUEDES, R. M. C. *Lawsonia intracellularis*. In: **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, J.G. et al. Ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 363-372, 2004.

- GUEDES, R. M. C. Enteropatia proliferativa suína (ileíte). **Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 42, p. 45-56, 2003.
- GUEDES, R. M. C. Porcine proliferative enteropathy: diagnosis, immune response and pathogenesis. St. Paul: University of Minnesota, 2002. 261 p. (**PhD Thesis**).
- GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Comparison of intestinal mucosal homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. **Vet. Microbiol.**, v. 93, p. 159-166, 2003a.
- GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. **Vet. Microbiol.**, v. 91, p. 135-145, 2003b.
- GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 15, n. 5, p. 438-446, 2003c.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; ARMBRUSTER, G.A. et al. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative enteropathy. **Can. J. Vet. Res.**, v. 66, p. 258-263, 2002a.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; WINKELMAN, N.A. et al. Comparison of different methods for diagnosis of Porcine Proliferative Enteropathy. **Can. J. Vet. Res.**, v. 66, p. 99-107, 2002b.
- HERBST, W.; HERTRAMPF, B.; SCHMITT, T. et al. Diagnosis of *Lawsonia intracellularis* using the polymerase chain reaction (PCR) in pigs with and without diarrhea and other animal species. **Dtsch. Tierarzti. Wochenschr.**, v. 110, n. 9, p. 361-364, 2003.
- HIGHLIGHTS of NAHMS Swine 2000: Part II. Information sheet, Veterinary Services, United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). [Citado abril de 2002]. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Swine/Swine2000/Swine2highlights.PDF>.
- HOTCHKISS, C. H. E.; SHAMES, B.; PERKINS, S. E. et al. Proliferative enteropathy of rabbits: The intracellular *Campylobacter*-like organism is closely related to *Lawsonia intracellularis*. **Lab. Anim. Sci.**, v. 46, p. 623-627, 1996.
- HUERTA, B.; ARENAS, A.; CARRASCO, L. et al. Comparison of diagnostic techniques for porcine proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis* infection). **J. Compar. Pathol.**, v. 129, p. 179-185, 2003.
- JENSEN, TK; MOLLER, K; SESER, TD et al. Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy. **Eur. J. Vet. Pathol.**, v. 3, p. 115-123, 1997.
- JOHNSON, E. A.; JACOBY, R. O. Transmissible ileal hyperplasia of hamsters. **Am. J. Pathol.**, v. 91, n. 3, p. 451-459, 1978.
- JONES, G. F.; WARD, G. E.; MURTAUGH, G.; et al. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, *Ileal symbiont intracellularis*, in feces by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 10, p. 2611-2615, 1993.

- JUBB, K.; KENNEDY, P.; PALMER, N. Infectious and parasitic diseases of the gastrointestinal tract. In: **Pathology of domestic animals**. Jubb, K.; Kennedy, P.; Palmer, N. Ed. San Diego : Academic Press, v. 2, p. 228-233, 1993.
- KLEIN, E. C. ; GEBHART, C. J.; DUHAMEL, G. E. Fatal outbreaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. **J. Med. Primatol.**, v. 28, p. 11-18, 1999.
- KROLL, J. J.; ROOF, M. B.; McORIST, S. Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 65, n. 5, p. 559-565, 2004.
- KYRIAKIS, S.C.; ALEXOPAULOS, C.; SAOULIDIS, K. et al. The effect of josamycine on the control of ileitis in weaned piglets under field conditions. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.25, p.279-284, 2002.
- KYRIAKIS, S.C.; TSINAS, A.; LEKKAS, S. et al. Clinical evaluation of in-feed zinc bacitracin for the control of porcine intestinal adenomatosis in growing / fattening pigs. **Vet. Rec.**, v.138, p.489-492, 1996.
- LAWSON, G.H.K.; GEBHART, C. J. Proliferative enteropathy: review. **J. Comp. Pathol.**, v. 122, p. 77-100, 2000.
- LAWSON, G. H. K.; MACKIE, R. A.; SMITH, D. G. E. et al. Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont intracellularis depends on host-cell function and actin polymerization. **Vet. Microbiol.**, v. 45, p. 339-350, 1995.
- LAWSON, GHK; McORIST, S. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. **J. Comp. Pathol.**, v. 108, p. 41-46, 1993.
- LAWSON, G. H. K.; McORIST, S.; JASNI, S. et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 5, p. 1136-1142, 1993.
- LEBLANC, B.; FOX, J. G.; LE NET, J. L. et al. Hyperplastic gastritis with intraepithelial *Campylobacter*-like organism in a beagle dog. **Vet. Pathol.**, v. 30, p. 391-194, 1993.
- LEE, S.W.; KIM, T.J.; PARK, S.Y. et al. Prevalence of porcine proliferative enteropathy and its control with tilosin in Korea. **J. Vet. Sci.**, v.2, n.3, p.209-212, 2001.
- LEMARCHAND, T. X.; TULLY, T. N.; SHANE, S. M. et al. Intracellular *Campylobacter*-like organisms associated with rectal prolapse and proliferative enteroproctitis in emus (*Dromaius novaehollandiae*). **Vet. Pathol.**, v. 34, p. 152-156, 1997.
- LINDECORONA, R. H.; JENSEN, T. K.; ANDERSEN, P. H. et al. Application of a 5' nuclease assay for detection of *Lawsonia intracellularis* in fecal samples from pigs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 984-987, 2002.
- LUNA, L. G. Routine Staining Procedures. In: Luna, L. G. (eds). **Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw- Hill Book Co, cap. 4, p. 32-46, 1968.
- MARTIN, S. W.; DEEK, A. H.; WILLENBERG, P. **Veterinary epidemiology: principals and methods**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 356, 1987.

- McCLUSKEY, J.; HANNIGAN, J.; HARRIS, J. D. et al. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection in vitro and in vivo. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 6, p. 2899-2907, 2002.
- McORIST, S., BOID, R., LAWSON, G. H. K. et al. Monoclonal antibodies to intracellular *Campylobacter*-like organisms of the porcine proliferative enteropathies. **Vet. Rec.**, v. 121, p. 421-422, 1987.
- McORIST, S.; GEBHART, C. J.; BOID, R. et al. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov, sp nov, the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, n.4, p. 520-525, 1995a.
- McORIST, S.; JASNI, S.; MACKIE, RA et al. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure culture of *Ileal symbiont intracellularis*. **Inf. Imm.**, v. 61, p. 4286-4292, 1993.
- McORIST, S.; KELLER, L.; McORIST, A. L. Search for *Lawsonia intracellularis* and *Bilophia warsworthia* in malabsorption – disease chickens. **Can. J. Vet. Res.**, v. 67, p. 232-234, 2003.
- McORIST, S.; MACKIE, R.A.; LAWSON, G.H.K. Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.5, p.1314-1317, 1995b.
- McORIST, S.; MACKIE, R. A. ; LAWSON, G. H. K. et al. In vitro interactions of *Lawsonia intracellularis* with cultured enterocytes. **Vet. Microbiol.**, v. 54, p. 385-392, 1997a.
- McORIST, S.; MORGAN, J. An evaluation of chlortetracycline feed additive for control of porcine proliferative enteropathy (ileitis). **Anais: 15th IPVS Congress**, 1998. p.111.
- McORIST, S.; MORGAN, J.; VEENHUIZEN, M.F. et al. Oral administration of tilosin phosphate for treatment and prevention of porcine proliferative enteropathy. **Am. J. Vet. Res.**, v.58, n.2, p.136-139, 1997b.
- McORIST, S.; ROBERTS, L. ; JASNI, S. et al. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic mechanisms. **J. Comp. Path.**, v. 115, p. 35-45, 1996a.
- McORIST, S.; SHEARN, M.F.H.; MORGAN, J. Control of porcine proliferative enteropathy by oral administration of chlortetracycline. **Vet. Rec.**, v.144, p.48-49, 1999.
- McORIST, S.; SMITH, S.H. Field evaluation of the ileitis vaccine in Australia. **Anais: 19^h IPVS Congress**, 2006. v.2, p.196.
- McORIST, S.; SMITH, S. H.; GREEN, L. E. Estimate of direct financial losses due to porcine proliferative enteropathy. **Vet. Rec.**, v. 140, p. 579-581, 1997c.
- McORIST, S.; SMITH, S.H.; SHEARN, M.F.H. et al. Treatment and prevention of porcine proliferative enteropathy with oral tiamulin. **Vet. Rec.**, v. 139, p. 615-618, 1996b.
- McORIST, S.; WAGER, A.M.; KRATZER, D. et al. Therapeutic efficacy of water-soluble lincomycin-spectinomycin powder against porcine proliferative enteropathy in a European field study. **Vet. Rec.**, v.146, p.61-65, 2000.
- MICHALSKI, C. W.; MOLA, F. F.; KUMMEL, K. et al. Human inflammatory bowel disease does not associate with

- Lawsonia intracellularis* infection. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 1-7, 2006.
- MORÉS, N.; NOGUEIRA, RHG; NEVES, OS et al. (1985) Diagnóstico clínico e anatomohistopatológico de casos espontâneos de enterite proliferativa hemorrágica dos suínos (EPH). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 37, n. 1, p. 29-37, 1985.
- OLSEN, S.C.; THOEN, C.O.; CHEVILLE, N.F. Brucella. In: **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, J.G. et al. Ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 309-320, 2004.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 37, p. 572-592, 1997.
- ROWLAND, A. C.; LAWSON, G. H. K. Intestinal adenomatosis in the pig: immunofluorescent and electron microscopic studies. **Res. Vet. Sci.**, v. 17, p. 323-330, 1974.
- ROWLAND, A. C.; ROWNTREE, P. G. M. A haemorrhagic bowel syndrome associated with intestinal adenomatosis in the pig. **Vet. Rec.**, v. 91, p. 235-241, 1972.
- SCHWARTZ, K.; KNITTEL, J; WALTER, D. et al. Effect of oral tiamulin on the development of porcine proliferative enteropathy in a pure-culture challenge model. **Swine Health Prod.**, v.7, n.1, p.5-11, 1999.
- SEGALES, J.; FERNANDES SALGUERO, J.M.; FRUCTUOSO, G. et al. Granulomatous enteritis and lymphadenitis in iberian pigs naturally infected with *Lawsonia intracellularis*. **Vet. Pathol.**, v. 38, p.343-346, 2001.
- SEIDLER, U.; BACHMANN, O.; JACOB, P. et al. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporte in normal and cystic fibrosis intestine. **J. Pancreas**, v. 2, n. 4, p. 247-256, 2001.
- SMITH, S. H.; McORIST, S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. **Res. Vet. Sc.**, v. 62, p. 6-10, 1997.
- SMITH, D. G. E.; MITCHELL, S. C.; NASH, T. et al. Gamma interferon influences intestinal epithelial hyperplasia caused by *Lawsonia intracellularis* infection in mice. **Inf. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 6737-6743, 2000.
- STEGE, H.; JENSEN, T. K.; MOLLER, K. et al. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 279-292, 2000.
- TASKER, J.B.; WINKELMAN, N.L.; KIRWAN, P. Use of aivlosin in feed for control of ileitis in USA and Europe. **Anais: 18th IPVS Congress**, 2004. p.256.
- TOMANOVÁ, K.; LITERÁK, I.; KLIMES, J. et al. *Lawsonia intracellularis* in wild mammals in the Slovak Carpathians. **J. Wild. Dis.**, v. 39, n. 2, p. 407-411, 2003.
- TSINAS, A.C.; KYRIAKIS, S.C.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E. et al. Use of tiamulin for the control of proliferative enteropathy (PE) in growing / fattening pigs. **Anais: 15th IPVS Congress**, 1998a. p.110.
- TSINAS, A.C.; KYRIAKIS, S.C.; LEKKAS, S. et al. Control of proliferative enteropathy in growing / fattening pigs using growth promoters. **J. Vet. Med. B**, v. 45, p. 115-127, 1998b.
- VANDENBERGHE, J.; VERHEYEN, A.; LAUWERS, S. et al. Spontaneous adenocarcinoma of the ascending colon in Wistar rats: the intracytoplasmic presence

of a *Campylobacter*-like bacterium. **J. Comp. Pathol.**, v. 95, p. 45-55, 1985.

VEENHUIZEN, M.F.; MOWREY, D.H.; MOORE, G.M. et al. Evaluating a natural outbreak of porcine proliferative enteropathy and treatment with tylosin in the grow-finish phase. **Swine Health Prod.**, v.6, p.67-72, 1998.

WALTER, D.; KNITTEL, J.; SCHWARTZ, K. et al. Treatment and control of porcine proliferative enteropathy using different tiamulin delivery methods. **J. Swine Health Prod.**, v.9, n.3, p.109-115, 2001.

WARD, GE; WINKELMAN, NL. Recognizing the three forms of proliferative enteritis in swine. **Vet. Med.**, v. 85, p. 197-203, 1990.

WILDE, J.; LONDEN, J.; YOLKEN, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.1300-1307, 1990.

WILSON, JB; HONOUR, S; PAULING, GE et al. Surveillance for porcine proliferative enteropathy in Alberta by using routine diagnostic laboratory data. **Can. Vet. J.**, v. 43, p. 604-606, 2002.

WINKELMAN, N.L.; CRANE, J.P.; ELFRING, G.D. Lincomycin-medicated feed for the control of porcine proliferative enteropathy (ileitis) in swine. **J. Swine Health Prod.**, v.10, n.3, p.107-111, 2002.

WINKELMAN, NL; DEE, SD. Ileitis: an update. **Comp. Cont. Educ.**, v. 19, p. 519-525, 1996.

WINKELMAN, N.L.; TASKER, J.B. Efficacy of Aivlosin for therapy of porcine proliferative enteropathy (PPE). **Anais: 17th IPVS Congress**, 2002. p.145.

YAMAGUCHI, T. Y.; TAKAHASHI, Y.; MIYASHITA, M. et al. A field safety and efficacy trial of enterisol ileitis[®] vaccine in Japan. **Anais: 19th IPVS Congress**, 2006. v.2, p.199.

YEH, J. Y.; KIM, T. J.; PARK, S. Y. et al. Isolation of *Lawsonia intracellularis* in Korea and reproduction of proliferative enteropathy in pigs and hamsters. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 68, n. 5, p. 499-501, 2006.