

Aline de Marco Viott

“Prevalência de enteropatógenos em suínos de recria/terminação em Minas Gerais e desenvolvimento de modelo experimental murino de enteropatia proliferativa”

Tese apresentada no curso de Doutorado em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Ciência Animal na área de Patologia Veterinária, sob a orientação do Profº Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2010

Tese defendida em 29 de janeiro de 2010, e avaliada pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes
(Orientador)

Dr. José Lúcio dos Santos

Profa. Zélia Inês Portela Lobato

Prof. Marcos Bryan Heinemann

Profa. Andrea Micke Moreno

Dedicado á Benicia Fátima Viott e
a Everton Poletto...*"you make me happy
when skies are gray"*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos espíritos de luz que me acompanharam durante toda minha jornada de vida e trabalho. Fonte de paz e conforto nas horas de dificuldade. Agradeço a minha mãe, por fazer dos meus sonhos, seus principais objetivos, não medindo esforços para que eles se tornassem realidade. Sem sua dedicação e amor incondicional eu sei que não chegaria até aqui. Ao Everton pelo apoio, paciência e amor "... você é algo assim, é tudo pra mim...é mais do que eu sonhava". Ao seu Walter, dona Regina, Eveline, Ilizandro e "mãezinha" Maria Helita pelo apoio e carinho. Vocês dão um brilho especial a minha vida!

Agradeço ao meu orientador Profº Roberto Guedes pela oportunidade oferecida. Muito obrigada pela amizade, atenção e dedicação oferecidas durante os quatro anos de doutorado. A profª Roselene Ecco pela amizade e pelo carinho durante a minha vivência em Belo Horizonte. Aos demais professores do laboratório de patologia veterinária, Rogéria Serakides, Ernane F. Nascimento e Renato Lima Santos pela ótima convivência e pelos conhecimentos transmitidos. Um agradecimento especial ao profº Andrey Pereira Lage, muito obrigada pela ajuda.

Aos amigos e técnicos do laboratório e da escola de veterinária, cúmplices das dificuldades diárias, muito obrigada pela ajuda, pelos momentos agradáveis, pelo ombro amigo e pelas piadas nas horas de tristeza. Um agradecimento especial para a Tatiane A. Paixão, Alcina V. Carvalho Neta, Erica Costa, Adriana, Eduardo Couland, Juliana Oliveira, Mirella C. Costa, Fabio Vanucci, Silvia França, Núbia Macedo, Jankerle Boeloni e Marina Rios vocês são muito especiais para mim.

A minha família Belo Horizontina, Joana (Jô), Catarina (Cati), Moises (Mosega), e Lilian. A nossa convivência diária tornou meus dias mais fáceis, as dificuldades menores e o meu coração maior. Muito obrigada!

Aos veterinários e técnicos que auxiliaram nas coletas, meu muito obrigada.

A universidade federal de Minas Gerais –UFMG e a escola de veterinária muito obrigada por me acolher durante os quatro anos de doutorado. Agradeço ao CNPq e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	11
	ABSTRACT.....	11
	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.	Capítulo 1 - Agentes enteropatogênicos causadores de diarreia em suínos de recria e terminação	
	–	
	Revisão	
	de	
	Literatura.....	12
1.1	INTRODUÇÃO.....	12
1.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.2.1	Diarreia em suínos de recria e terminação.....	12
2.	Capítulo 2 - Prevalência de agentes enteropatogênicos envolvidos com diarreia em suínos de recria e terminação no estado de Minas Gerais.....	25
2.1	RESUMO.....	25
2.2	INTRODUÇÃO.....	26
2.3	MATERIAL E METODOS.....	27
2.3.1	Granjas, animais e coleta de fezes.....	27
2.3.2	Metodologia empregada no Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	27
2.3.3	Metodologia empregada no isolamento de colônias Lactose positiva sugestivas de <i>Escherichia coli</i>	28
2.3.4	Detecção de <i>Lawsonia intracellularis</i> , <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> e <i>Brachyspira pilosicoli</i> pela PCR Multiplex.....	29
2.3.5	Detecção de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	30
2.3.6	Exame parasitológico para <i>Trichuris suis</i>	31
2.3.7	Avaliação histológica.....	31
2.3.8	Imuno-histoquímica.....	31
2.3.9	Análise estatística.....	32
2.4	RESULTADOS.....	33
2.4.1	<i>Salmonella</i> spp.....	33
2.4.2	<i>Lawsonia intracellularis</i> , <i>Brachyspira pilosicoli</i> e <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	34
2.4.3	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) enterotoxigênica.....	35
2.4.4	<i>Trichuris suis</i>	36
2.4.5	Infecções Mistas.....	38
2.4.6	Histopatologia e Imuno-histoquímica.....	38
2.5	DISCUSSÃO.....	41
2.6	CONCLUSÃO.....	44
3.	Capítulo 3 - Desenvolvimento de modelo experimental murino para enteropatia proliferativa (<i>Lawsonia intracellularis</i>), utilizando homogeneizado de mucosa intestinal e cultura pura.....	44
3.1	RESUMO.....	44
3.2	INTRODUÇÃO.....	44
3.3	MATERIAL E METODOS.....	46
3.3.1	Camundongos.....	46
3.3.2	Inoculos.....	46
3.3.3	Quantificação do inóculo.....	47
3.3.4	Bioensaio em Hamster.....	47
3.3.5	Delineamento experimental.....	47
3.3.6	Histologia e Imuno-histoquímica.....	47
3.3.7	Detecção de <i>L. intracellularis</i> nas fezes dos camundongos.....	48
3.3.8	Análise Estatística.....	48

3.4	RESULTADOS.....	48
3.4.1	Histopatologia e IHQ.....	49
3.4.2	Resultados Nested PCR.....	51
3.4.3	Resultados da Análise Estatística.....	51
3.5	DISCUSSÃO.....	56
3.6	CONCLUSÃO.....	57
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
5.	ANEXOS.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de propriedades coletadas de cada região relacionada com o número de matrizes.....	33
Tabela 2 -	Distribuição da prevalência encontrada de sorotipos não patogênicos de <i>Salmonella</i> <i>diarrea</i> no estado de Minas Gerais de acordo com o tamanho do rebanho e região considerando positividade da granja dentre as 46 avaliadas.....	34
Tabela 3 -	Distribuição da prevalência encontrada no estado de Minas Gerais de acordo com o tamanho do rebanho, região e enteropatógeno; <i>Lawsonia intracellularis</i> , <i>Brachyspira pilosicoli</i> , <i>E. coli</i> enterotoxigênica, <i>Salmonella</i> <i>diarrea</i> sorotipo Typhimurium e infecção mista considerando positividade da granja dentre as 46 avaliadas.....	37
Tabela 4 -	Distribuição das amostras positivas para <i>E. coli</i> enterotoxigênica de acordo com os genótipos observados, região e tamanho das granjas.....	38
Tabela 5 -	Resultados individuais das lesões histopatológicas, marcação imunistoquímica e resultados da PCR do pool de fezes das diferentes linhagens de camundongos inoculadas com homogeneizado de mucosa e cultura pura, contendo <i>L. intracellularis</i> , nos dias 7, 14, 21 e 28 pós inoculação (dpi).....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características das <i>Brachyspiras</i> spp. Intestinais dos suínos.....	17
Quadro 2 -	Primers para fatores de virulência de <i>Escherichia coli</i>	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Idade de maior ocorrência das principais diarreias dos suínos nas fases de recria e terminação. * EPH- Enteropatia proliferativa hemorrágica, forma aguda da infecção por <i>L. intracellularis</i> , até 360 dias de idade. Fonte: modificado de Barcellos (2001).....	14
Figura 2 -	Suíno, intestino delgado, íleo, macroscopia da forma aguda de infecção por <i>Lawsonia intracellularis</i> . Observa-se espessamento e engrossamento da serosa intestinal com áreas multifocais a coalescentes de hemorragia (seta). Fonte: Prof. Roberto Guedes.....	15
Figura 3 -	Suíno, intestino delgado, íleo, macroscopia da forma crônica de infecção por <i>Lawsonia intracellularis</i> . Observa-se espessamento da mucosa intestinal (seta). Fonte: Prof. Roberto Guedes.....	15

Figura 4 -	Suíno, intestino delgado. Detecção imuno-histoquímica de <i>Lawsonia intracellularis</i> , observa-se marcação no ápice dos enterócitos da cripta intestinal (seta) e em macrófagos na lâmina própria (asterisco) (IHQ 40X). Fonte: Prof. Roberto Guedes.....	16
Figura 5 -	Suíno colón. Lesão microscópica de colite espiroquetar. Cólon observa-se inúmeras bactérias (<i>B. pilosicoli</i>) aderidas aos enterócitos (seta), “falso bordo em escova” (HE, 40X). Fonte: Prof. Roberto Guedes.....	18
Figura 6 -	A) Suíno de terminação com diarreia, em uma granja com 101-500 matrizes da região sul e sudoeste de Minas Gerais. B) Presença de fezes diarréicas no piso da baia da granja da figura A. Nessa propriedade foram identificadas amostras de fezes positivas para <i>L. intracellularis</i> e casos de coinfeção de <i>L. intracellularis</i> com <i>E. coli</i> enterotoxigênica e PCV-2.....	33
Figura 7 -	Gel de agarose a 1%. A) Teste de sensibilidade analítica da <i>B. pilosicoli</i> . Kb marcador de pares de base (100pb). Observa-se a detecção da bactéria até a concentração de 10^3 bact/ml. B e C) Resultado do teste de sensibilidade analítica da <i>L. intracellularis</i> e da <i>B. hyodysenteriae</i> , respectivamente. As bactérias apresentaram sensibilidade de detecção de 10^4 bact/ml. Kb marcador de pares de base (100pb). D) Teste de sensibilidade analítica da PCR multiplex para <i>B. pilosicoli</i> , <i>L. intracellularis</i> e <i>B. hyodysenteriae</i> , observa-se que quando as três bactérias são adicionadas a PCR a sensibilidade analítica é 10^4 bact/ml. Kb marcador de pares de base (100pb).....	35
Figura 8 -	Gel de agarose a 1%. PCR Multiplex Gel de agarose a 1% mostrando o tamanho dos produtos da PCR de algumas amostras coletadas a campo, <i>B. pilosicoli</i> 823 pb; <i>L. intracellularis</i> 655 pb; <i>B. hyodysenteriae</i> 354 pb; Kb, marcador de pares de base (100pb), C+, controle positivo e C-, controle negativo. Linhas 1, 2, 11, infecção mista por <i>B. pilosicoli</i> e <i>L. intracellularis</i> ; 3, <i>B. pilosicoli</i> ; 4, 7, 9, 10, <i>L. intracellularis</i> ; 5, 6, 8, amostras negativas.....	36
Figura 9 -	Gel de poliacrilamida a 6%. PCR multiplex dos fatores de virulência para <i>E. coli</i> enterotoxigenica. Produtos da PCR de algumas amostras coletadas a campo (linhas 5 a 8). Kb marcador de pares de base (100pb); controle 1 (C1) [STx2e (733 pb) - F18 (313 pb) - StaP (158 pb) -Stb (113 pb)];controle 2 (C2) [K88 (499 pb)- LT (272 pb) -Stb (113pb)]; controle 3 (C3) [987p (409 pb) e-StaP (158 pb)]; controle 4 (C4) [F41 (612 pb)- K99 (230 bp)- StaP (158 pb)]; controle negativo C-; 5, 8 <i>E. coli</i> não enterotoxigênica; 6,7, amostras positivas para <i>E. coli</i> enterotoxigênica, fimbria F18 (313 pb) e toxinas termo estáveis StaP (158 pb) e Stb (113 pb).....	36
Figura 10 -	Lesão histológica de enteropatia proliferativa (<i>L. intracellularis</i>). A) Ceco. Observa-se proliferação difusa das criptas intestinais (setas), com espessamento da mucosa, HE, 4X. B) Nas criptas observa-se grande quantidade de enterócitos jovens (seta) com ausência de células caliciformes e restos celulares no lúmen (cabeça de seta), HE, 40X. C) Observa-se marcação positiva (vermelho) para o antígeno da <i>L. intracellularis</i> , no ápice do citoplasma dos enterócitos das criptas intestinais (setas), IHQ, 20X.....	39
Figura 11 -	Lesões histológicas de salmonelose (<i>S. enterica</i> sorotipo Typhimurium). A) Cólon necrose da mucosa intestinal com a formação de uma membrana fibrino necrótica (cabeça de seta) sobre a área de lesão, HE, 20X. B) Observa-se com maior detalhe os restos celulares composto em sua maioria por neutrófilos degenerados entremeados à fibrina (asterisco), HE, 40X.....	40

Figura 12 -	Lesão histológica de colite espiroquetar (<i>B. pilosicoli</i>). A) Observa-se grande quantidade de bactérias aderidas perpendicularmente a mucosa, formando um “falso bordo em escova” (seta), HE, 20X. B) Há marcação imuno-histoquímica positiva (vermelho) nas bactérias aderidas a mucosa intestinal (seta), IHQ, 40X.....	40
Figura 13 -	Lesões histológicas de circovirose (PCV2). A) Enterite granulomatosa difusa acentuada, há grande quantidade de macrófagos, macrófagos epitelióides e células gigantes (seta) na lâmina própria, HE, 20X. B) Observam-se as células do infiltrado granulomatoso em maior detalhe, notar a grande quantidade de células gigantes (setas), HE, 40X. C) Marcação imuno-histoquímica positiva para PCV-2, no interior dos macrófagos (cabeça de seta) e células gigantes na lâmina própria (seta), IHQ.....	41
Figura 14 -	Inoculação intragástrica, utilizando agulha de gavagem, de um camundongo da linhagem Swiss com homogeneizado de mucosa contendo <i>Lawsonia intracellularis</i>	47
Figura 15 -	Lesão macroscópica de <i>L. intracellularis</i> (Enteropatia Proliferativa) em um camundongo da linhagem DB-A 14 dias após a inoculação. Observa-se espessamento da alça intestinal (íleo) com rugosidade acentuada na serosa (setas).....	49
Figura 16 -	Enteropatia proliferativa. A) Camundongo Swiss, íleo, 7 dias pós inoculação. Observa-se proliferação multifocal leve multifocal das criptas intestinais com ausência de células caliciformes e grande quantidade de enterócitos jovens (seta), HE, 4X. B) Camundongo, Swiss, íleo, 14 dias pós inoculação. Há hiperplasia difusa acentuada das criptas intestinais (setas) com ausência de células caliciformes, espessamento da mucosa e enterócitos jovens, HE, 20X. C) Camundongo, Swiss, ceco, 7 dias pós inoculação. Observa-se marcação imuno-histoquímica focal leve (seta), IHQ, 40X. D) Camundongo, Swiss, íleo, 14 dias pós inoculação. Há marcação difusa acentuada para o antígeno de <i>Lawsonia intracellulares</i> , nas criptas (seta) e na superfície da mucosa intestinal, IHQ, 4X.....	50
Figura 17 -	Enteropatia proliferativa. A) Camundongo C-57 Black 6, íleo, 14 dias pós inoculação. Há hiperplasia focal leve das criptas intestinais (seta) com ausência de células caliciformes e grande quantidade de enterócitos jovens, HE, 4X. B) Camundongo, C-57 BLACK 6, íleo, 14 dias pós inoculação. Há marcação imuno-histoquímica leve para o antígeno da <i>Lawsonia intracellularis</i> , IHQ, 40X.....	51
Figura 18 -	Enteropatia proliferativa. A) Camundongo DB-A, íleo, 14 dias pós inoculação. Observa-se espessamento difuso acentuado da mucosa intestinal com hiperplasia das criptas intestinais (seta), HE, 4X. B) Lesão histológica de enteropatia proliferativa em um camundongo, DB-A, íleo, 21 dias pós inoculação. Há hiperplasia difusa moderada das criptas intestinais (setas), HE, 20X. C) Camundongo, DB-A, ceco, 14 dias pós inoculação. Observa-se marcação imunoistoquímica difusa acentuada, no ápice das células das criptas intestinais (seta), IHQ, 4X. D) Camundongo, DB-A, íleo, 21 dias pós inoculação. Há marcação imunoistoquímica multifocal moderada, no ápice das células da cripta intestinal (seta), IHQ, 40X.....	52
Figura 19 -	Enteropatia proliferativa. Camundongo, Swiss, íleo, 7 dias pós inoculação com cultura pura de <i>L. intracellularis</i> . Observa-se marcação imuno-histoquímica multifocal acentuada no ápice das vilosidades intestinais (enterócitos maduros) (setas), IHQ, 40X.....	54

- Figura 20 - Enteropatia proliferativa. A) Camundongo DB-A, ceco, 28 dias pós inoculação. Observa-se hiperplasia difusa acentuada das criptas intestinais próximas as placa de Peyer (seta), HE, 20X. B) Camundongo, DB-A, ileo, 28 dias pós inoculação. Há marcação imuno-histoquímica multifocal leve nos enterócitos que recobrem a placa de Peyer (setas), IHQ, 20X..... 54
- Figura 21 - A) Gel de agarose a 1%, *Nested* PCR, 7 dias após a inoculação. Da esquerda para direita: Kb, marcador de peso molecular; C-, controle negativo; C+, controle positivo *Lawsonia intracellularis* (218 pb); 1, controle negativo Swiss; 2, Swiss inoculado com homogeneizado de mucosa; 3, Swiss inoculado com cultura pura; 4, controle negativo BALB/C; 5, BALB/C inoculado com homogeneizado de mucosa; 6, BALB/C inoculado com cultura pura; 7, controle negativo C-57 BLACK 6; 8, C-57 BLACK 6 inoculado com homogeneizado de mucosa; 9, C-57 BLACK 6 inoculado com cultura pura; 10, controle negativo DB-A; 11, DB-A inoculado com homogeneizado de mucosa; 12, DB-A inoculado com cultura pura. Observe as bandas positivas nas linhas 3, 9, 11 e 12. B) Gel de agarose, *Nested* PCR, 14 dias após a inoculação. Numeração idêntica à figura 21A. Observe as bandas positivas nas linhas 2, 3, 5, 6, 9, 11 e 12..... 55
- Figura 22 - A) Gel de agarose a 1%, *Nested* PCR, 21 dias após a inoculação. Da esquerda para direita: Kb, marcador de peso molecular; C-, controle negativo; C+, controle positivo *Lawsonia intracellularis* (218 pb); 1, controle negativo Swiss; 2, Swiss inoculado com homogeneizado de mucosa; 3, Swiss inoculado com cultura pura; 4, controle negativo BALB/C; 5, BALB/C inoculado com homogeneizado de mucosa; 6, BALB/C inoculado com cultura pura; 7, controle negativo C-57 BLACK 6; 8, C-57 BLACK 6 inoculado com homogeneizado de mucosa; 9, C-57 BLACK 6 inoculado com cultura pura; 10, controle negativo DB-A; 11, DB-A inoculado com homogeneizado de mucosa; 12, DB-A inoculado com cultura pura. Observe as bandas positivas nas linhas 11 e 12. B) Gel de agarose, *Nested* PCR, 28 dias após a inoculação..... 55

RESUMO

A prevalência de enteropatógenos em suínos de recria e terminação, bem como a susceptibilidade de quatro diferentes linhagens de camundongos (Swiss, BALB/c, C-57 BLACK 6 e DB-A) a infecção por *Lawsonia intracellularis* foram investigadas. Quarenta e seis rebanhos foram selecionados nas quatro maiores regiões produtoras de suínos no estado de Minas Gerais. Das 46 propriedades analisadas constatou-se que a prevalência geral dos rebanhos com *L. intracellularis*, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *E. coli* enterotoxigênica foi 19,56%, 6,52%, 10,87%, respectivamente. Infecções mistas foram diagnosticadas em 30,43% dos rebanhos analisados, e a coinfeção com *L. intracellularis* e a *S. enterica* sorotipo Typhimurium foi a mais frequente (10,87%). *Brachyspira pilosicoli* foi diagnosticada em somente dois rebanhos, sempre associada com infecções mistas. *Brachyspira. hyodysenteriae* e *Trichuris suis* não foram identificados em nenhuma amostra analisada. Cento e sessenta camundongos (n = 40, por linhagem) foram inoculados por via gástrica com cultura pura e homogeneizado de mucosa contendo *L. intracellularis*. Dois animais da linhagem DB-A exibiram lesões macroscópicas 14 dias pós-inoculação. Todas as linhagens de camundongos avaliadas apresentavam lesões histológicas de enteropatia proliferativa e IHQ positiva, com variações na intensidade das lesões. As lesões mais graves foram observadas em camundongos DB-A e Swiss inoculados com cultura pura. A eliminação nas fezes de *L. intracellularis* foi observada, por Nested PCR, em todas as linhagens com algumas variações.

Palavras-chave: suíno, recria e terminação; prevalência; enteropatia proliferativa; *Lawsonia intracellularis*; modelo experimental; camundongos.

ABSTRACT

The prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Salmonella spp.*, enterotoxigenic *E. coli*, *Trichuris suis* and the occurrence of mixed infections was investigated, as well as the susceptibility of four different mice strains (Swiss, BALB / c, C-57 BLACK 6 and DB-A) to *L. intracellularis* infection. Forty-six herds were selected in the four main swine production regions in the state of Minas Gerais. The overall herd prevalence of *L. intracellularis*, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and enterotoxigenic *E. coli* were 19,56%, 6,52%, 10,87% respectively. Mixed infection was diagnosed in 30,43% of herds, and *L. intracellularis* and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium are the main pathogens association (10,87%). *Brachyspira pilosicoli* was diagnosed only in two herds, always associated with mixed infections. *B. hyodysenteriae* and *Trichuris suis* were not identified in any samples analyzed. One hundred sixty mice (n = 40 per strain) were intragastrically inoculated with pure culture or mucosa homogenate containing *L. intracellularis*. Two DB-A mice exhibited gross lesions at 14 days after inoculation. All mice strains studied showed histological lesions of proliferative enteropathy and positive IHC, varying according to the intensity of the lesion. The most severe lesions were observed in DB-A and Swiss mice inoculated with pure culture. The elimination in feces of *L. intracellularis* was observed, by Nested PCR, in all lines with some variations.

Keywords: growing and finishing pig, prevalence, proliferative enteropathy, *Lawsonia intracellularis*, epidemiology; mice.

INTRODUÇÃO GERAL

No primeiro capítulo desta tese faz-se uma revisão de literatura abrangendo os principais agentes causadores de diarreia em suínos de recria e terminação. Devido aos dados epidemiológicos escassos desses enteropatógenos no Brasil, no segundo capítulo, realizou-se um estudo epidemiológico desses

agentes no rebanho suíno do estado de Minas Gerais, o quarto maior produtor suinícola do Brasil. Para isso foram analisadas granjas de ciclo completo com diarreia ou com histórico de diarreia em quatro regiões diferentes no estado.

Com a padronização de novas técnicas no laboratório de Patologia Molecular da UFMG, realizou-se a pesquisa de sete agentes

enteropatogênicos incluindo cinco bactérias (*Salmonella* spp., *L. intracellularis*, *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* e *E. coli* enterotoxigênica), um parasita (*T. suis*) e um vírus (PCV2). Assim sendo, acredita-se que o desenvolvimento de técnicas laboratoriais e estudos sobre prevalência e epidemiologia dos patógenos causadores de doenças em suínos no estado de Minas Gerais e, conseqüentemente, no Brasil sejam imperativos para o contínuo sucesso e crescimento da suinocultura estadual e nacional.

A *Lawsonia intracellularis* é uma bactéria de extrema importância no nosso sistema de produção (Moreno et al., 2002). Consequentemente aprofundamos nosso estudo nesse agente, analisando, no terceiro capítulo, a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos a infecção por *L. intracellularis* utilizando-se homogeneizado de mucosa intestinal e cultura pura. A epidemiologia da enteropatia proliferativa, doença causada pela *L. intracellularis*, é pouco conhecida. Os principais objetivos deste estudo foram (1) o de avaliar o papel de espécimes de roedores na disseminação da doença, já que esses animais, na grande maioria das granjas, co-habitam as instalações com os suínos; (2) e desenvolver um possível modelo experimental animal que facilite o estudo da patogenia da *L. intracellularis*, que ainda é pouco conhecida.

1. Capítulo 1:

Agentes enteropatogênicos causadores de diarreia em suínos de recria e terminação – Revisão de Literatura

1.1 INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas entéricas em suínos têm importância crescente e são frequentemente observadas em diferentes faixas etárias, provocando um grande impacto para indústria de suínos em todo o mundo (Jacobson et al., 2005). Estas infecções são responsáveis por aproximadamente 30% das perdas econômicas na suinocultura moderna (Burch, 2000). Além disso, algumas etiologias podem

ser potencialmente patogênicas para os humanos, representando um risco para saúde pública (Weiss et al., 1999).

As infecções entéricas podem levar a altas taxas de mortalidade e morbidade em qualquer faixa etária, entretanto, as maiores perdas são observadas nas fases de recria e terminação onde frequentemente cursam com seqüelas no trato gastrointestinal (McOrist e Gebhart, 1999). Estas lesões podem ser permanentes ou transitórias, resultando em expressivo atraso no crescimento, na redução da eficiência alimentar e no custo com tratamentos e alimentação adicionais, respondendo por 60% dos gastos com antimicrobianos na suinocultura moderna (Jacobson et al., 2005; Pearce, 1999).

As principais bactérias associadas à patogênese das enterites nas fases finais de produção são a *Salmonella* spp. (Schwartz, 2000), *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* (Hampson e Trott, 1999) e a *Lawsonia intracellularis* (McOrist e Gebhart, 1999). Alguns trabalhos vêm demonstrando a importância da *Escherichia coli* enteropatogênica (Bertschinger & Fairbrother, 1999, Jacobson et al., 2003) em animais terminados e citações mais antigas levantam a importância do parasita *Trichuris suis* nas fases de recria e terminação (Batte et al., 1977). Recentemente, a ocorrência de infecções entéricas mistas vêm sendo avaliada principalmente nos rebanhos de terminação com baixo desempenho. O objetivo desse capítulo é realizar uma revisão de literatura atualizada sobre os principais enteropatógenos causadores de diarreia em suínos de recria e terminação.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Diarreia em suínos de recria e terminação

Nas fases de recria e terminação espera-se que os suínos tenham um bom crescimento, representado por adequado ganho de peso diário e boa conversão alimentar. Além disso, devem chegar ao abate dentro do tempo programado, atendendo as necessidades da indústria em peso, qualidade de carcaça e pouca variação no desenvolvimento dos animais de um

mesmo lote. Portanto, a eficiência produtiva dessa fase é medida por parâmetros como, taxa de mortalidade, ganho de peso dos animais, uniformidade do rebanho e ocorrência de doenças (Almeida, 2008). Dentre as doenças que afetam o rebanho suíno destacam-se as infecções entéricas, que diminuem sensivelmente os índices zootécnicos do plantel, principalmente quando presente nas fases finais de produção (Almeida 2009).

As afecções entéricas são um problema comum nos sistemas de criação de suínos em todo o mundo. Essas doenças têm um grande impacto, pois causam perdas por mortalidade, reduzem a conversão alimentar, acarretando perda de peso e refugos, aumentando o custo da produção em função da aquisição de medicamentos (Baccaro et al., 2003; Jacobson et al., 2005). Procurando identificar os fatores que contribuem para a falta de uniformidade de suínos na terminação, Almeida (2008)

O conhecimento da patogenia e dos agentes responsáveis é uma importante ferramenta para o diagnóstico das doenças (Zlotowski et al., 2008). A enterite proliferativa suína (EPS) causada por *Lawsonia intracellularis*, espiroquetose intestinal suína causada por *Brachyspira pilosicoli*, disenteria suína causada pela *Brachyspira hyodysenteriae*,

1.2.1.1 *Lawsonia intracellularis*

A *L. intracellularis* é uma bactéria Gram-negativa curva, intracelular obrigatória que causa a enteropatia proliferativa (EP). A EP afeta principalmente suínos (Guedes, 2002; Lindecrona et al., 2002) mas, já foi diagnosticada em hamster (Johnson e Jacoby, 1978), 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

demonstrou que entre as variáveis estudadas (sexo, peso a entrada do crescimento, doenças em geral), os animais que tiveram episódios de diarreia na fase de terminação apresentaram 4,5 vezes mais chances de ter baixo peso ao abate.

Na fase de crescimento a diarreia em suínos tem uma determinação complexa (multifatorial), dependendo da interação de agentes infecciosos com a qualidade do ambiente, grau de imunidade de rebanho e outras variáveis relacionadas à população de micro-organismos intestinais e composição da alimentação (Barcellos et al., 2003). As causas são muitas e exigem avaliações aprofundadas em cada sistema de criação, para identificá-las e tomar medidas corretivas (Almeida, 2008). A medida de controle mais usualmente adotada é a utilização de agentes antimicrobianos na ração de forma preventiva ou terapêutica o que requer uma precisa detecção e identificação dos patógenos envolvidos (Zlotowski et al., 2008). salmonelose suína causada pela *Salmonella* spp., a colibacilose causada pela *Escherichia coli* enteropatogênica e a tricuriase causada pelo *Trichuris suis*, são as principais doenças que causam diarreia em suínos no período de recria e terminação (Figura 1) (Batte et al., 1977; Barcellos 2001; Stege et al., 2000; Baccaro et al., 2003, Suh e Song, 2005).

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).

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). A 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) sendo que a bactéria pode sobreviver por até 2 semanas à temperatura ambiente (Collins et al., 2000).

Existe pouco conhecimento 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 dos 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 et al. (2002) identificaram o gene *IsaA* que é expresso durante a infecção, com possível importância na adesão e entrada da bactéria nas células epiteliais imaturas. Esse gene seria responsável pela síntese de algumas proteínas de superfície que se ligariam a receptores específicos presentes na superfície apical de enterócitos (McCluskey et al., 2002). 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 a evasão do vacúolo endocítico e da digestão lisossômica, possibilitando a multiplicação no citoplasma do enterócito infectado (Guedes et al., 2003c).

A doença no suíno possui formas clínicas, 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 baixo ganho de peso (Ward e Winkelman, 1990).

Os sinais clínicos começam a ser observados de sete a dez dias após a infecção (Lawson e Gebhart, 2000; Guedes, 2002). As bactérias colonizam, predominantemente, 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).

Macroscopicamente na 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 (Figura 2). Animais com a forma crônica apresentam edema de mesentério próximo à

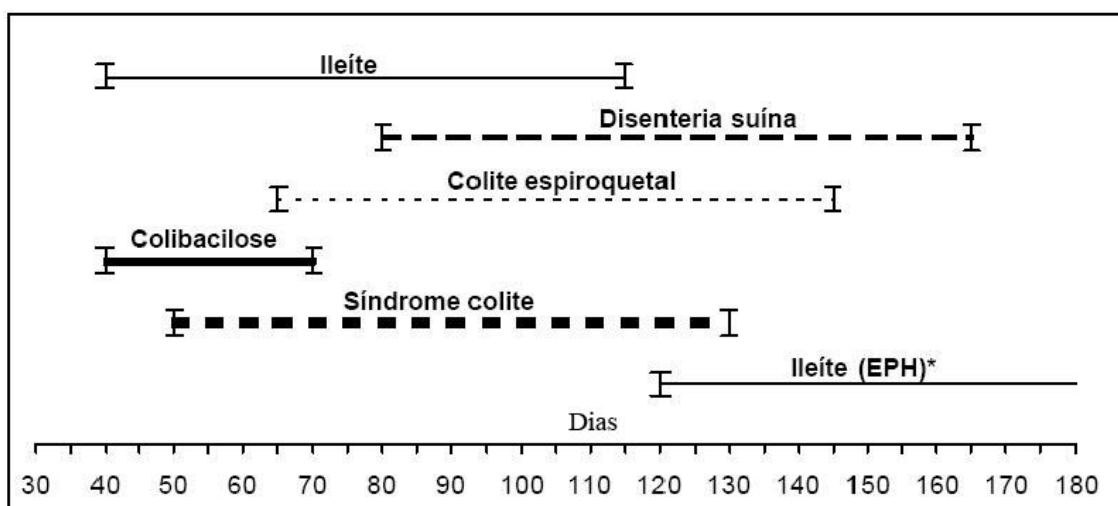


Figura 1 - Idade de maior ocorrência das principais diarreias dos suínos nas fases de recria e terminação.

* EPH- Enteropatia proliferativa hemorrágica, forma aguda da infecção por *L. intracellularis*, até 360 dias de idade. Fonte: modificado de Barcellos (2001).

inserção com a alça intestinal lesada, serosa intestinal apresenta aspecto cerebróide, parede intestinal espessada e a mucosa com pregas bem evidentes (Figura 3). Tanto na forma aguda quanto na forma crônica, o íleo é mais

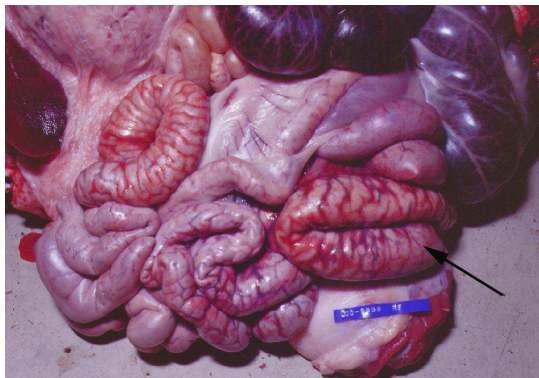


Figura 2 – Suíno, intestino delgado, íleo, macroscopia da forma aguda de infecção por *Lawsonia intracellularis*. Observa-se espessamento e engrossamento da serosa intestinal com áreas multifocais a coalescentes de hemorragia (seta). Fonte: Prof. Roberto Guedes.



Figura 3 - Suíno, intestino delgado, íleo, macroscopia da forma crônica de infecção por *Lawsonia intracellularis*. Observa-se espessamento da mucosa intestinal (seta). Fonte: Prof. Roberto Guedes.

frequentemente afetado, mas lesões podem ser encontradas em qualquer segmento intestinal, do duodeno ao reto com distribuição focal ou multifocal (Lawson e Gebhart, 2000).

As duas formas da doença, aguda e crônica, têm basicamente as mesmas características histopatológicas. As criptas de Lieberkühn alongadas e alargadas com um número aumentado de células epiteliais imaturas com elevado índice mitótico. Observa-se uma proliferação das células epiteliais dessas criptas no intestino delgado e glândulas mucosas do intestino grosso com a presença de um micro-organismo 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 às observadas em animais com a forma crônica (Ward e Winkelman, 1990; Guedes, 2002).

O diagnóstico *ante-mortem* pode ser feito pela de sorologia através de amostras de sangue ou pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando-se as fezes (Guedes et al., 2002a). Já o diagnóstico *post-mortem* pode ser feito através de exames anatomopatológicos pelo ensaio de PCR de mucosa intestinal em animais com sinais clínicos da doença (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 imuno-histoquímica (IHQ) (Jensen et al, 1997) usando anticorpo monoclonal ou policlonal específico contra *Lawsonia intracellularis* (Figura 4) (McOrist et al, 1987; Guedes e Gebhart 2003c) facilitam o diagnóstico histopatológico, possibilitando a visualização da bactéria na porção apical de enterócitos imaturos.

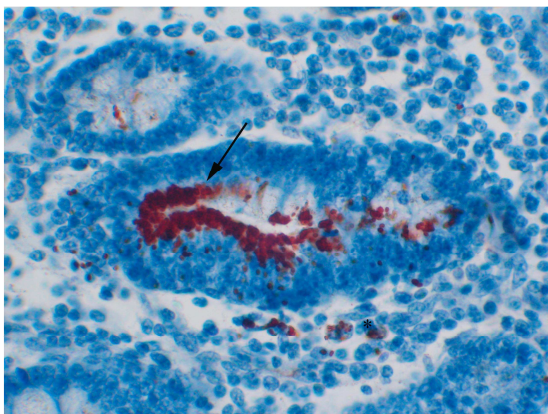


Figura 4 – Suíno, intestino delgado. Detecção imuno-histoquímica de *Lawsonia intracellularis*, observa-se marcação no ápice dos enterócitos da cripta intestinal (seta) e em macrófagos na lâmina própria (asterisco) (IHQ 40X). Fonte: Prof. Roberto Guedes.

A *L. intracellularis* tem distribuição mundial tendo sido diagnosticada na América do Norte, América do Sul, Europa, Ásia, África e Austrália (Lawson & Gebhart 2000). A prevalência da *L. intracellularis*, na literatura, utilizando a técnica da PCR varia de 15 a 93,7% sendo o principal agente tanto em infecções clínicas como em subclínicas (Moller et al., 1998; Jacobson et al., 2005; Suh e Song 2005; La et al., 2006; Biski et al. 2007). Estima-se que 20 a 50% das propriedades produtoras de suínos no mundo inteiro estejam infectadas pela *L. intracellularis* (Kroll et al., 2005). Muitos fatores contribuem para essa alta prevalência de *L. intracellularis* nas granjas incluindo idade, linhagem, dieta, estado sanitário do rebanho, uso de antibióticos, vacinas, desinfetantes, manejo e sistemas de produção além é claro da alta capacidade de transmissão e sobrevivência da *L. intracellularis* no meio ambiente (Lawson e Gebhart 2000).

Estudos de frequência da *L. intracellularis*, no Brasil, identificaram positividade em 30% das granjas das principais regiões produtoras do país. As amostras positivas provinham principalmente de animais com mais de 180 dias de idade. Acredita-se que essa faixa etária esteja mais susceptível a infecção em função do baixo uso de antibióticos e promotores de crescimento como também por

um alto número de fatores de risco associados a essa faixa etária como transporte e repopulação (Moreno et al., 2002). Baccaro et al. (2003) observaram que 13% de 541 amostras de fezes analisadas foram positivas pela técnica da PCR. Já em um estudo realizado em Santa Catarina observou-se que somente 7,5% dos 386 animais em fase de terminação e 0,6% de 330 animais em fase de creche foram positivos para *Lawsonia intracellularis* (Menin et al., 2008).

1.2.1.2 *Brachyspira pilosicoli*

Um patógeno emergente, a *Brachyspira pilosicoli*, vem sendo diagnosticado nos sistemas de produção atual (Barcellos et al., 2000). Até o final da década de 70, todas as espiroquetas intestinais β hemolíticas (EIBH) presentes no intestino dos suínos eram consideradas não patogênicas. Posteriormente, Taylor et al. (1980) sugeriram que EIBH poderiam estar associadas com diarreias não fatais em suínos na fase de crescimento. Na década de 90, Duhamel et al. (1996) determinaram que as EIBH associadas com uma determinada forma de infecção intestinal em suínos, denominada colite espiroquetar, eram diferentes das outras espécies do gênero, mas apresentavam algumas características fenotípicas em comum com espécies apatogênicas, chamadas “*Serpulina (S.) innocens*” e “*S. murdochii*”. Os autores propuseram o nome *Serpulina pilosicoli* para descrever a espiroqueta fracamente beta hemolítica patogênica. Essa nova espiroqueta tinha a capacidade de aderir às células epiteliais do intestino grosso, sendo que a colonização pela massa bacteriana era capaz de reduzir a eficiência da absorção e causar diarreia mucóide, característica da colite espiroquetar (Duhamel et al., 1996). Por fim, foram realizados estudos moleculares usando o sequenciamento do RNA ribossomal 16S e os resultados permitiram o reposicionamento das amostras de “*S. pilosicoli*” no gênero *Brachyspira*, levando a unificação dos gêneros *Serpulina* e *Brachyspira* (Barcellos 2000)

Foram identificadas até o momento, nos suínos, sete espécies de *Brachyspira* sp. (Sobestiansky et al., 2001; Rasback et al., 2007), mas destas, somente a *Brachyspira hyodysenteriae* e a *Brachyspira pilosicoli* são

realmente importantes na suinocultura comercial (Quadro 1) (Thomson et al., 1998). Recentemente, uma nova espécie de *Brachyspira*, a *B. suanatina*, foi identificada em patos Mallard e sua inoculação experimental em suínos desmamados demonstrou lesões intensas (Rasback et al., 2007; Jansson et al., 2009).

A *Brachyspira pilosicoli* é uma espiroqueta Gram negativo, anaeróbia, flagelada, que produz fraca hemólise em ágar sangue (Guedes, 2005). A *B. pilosicoli* é um possível agente zoonótico associado com doenças colônicas em humanos, macacos, aves domésticas e selvagens, ratos, cães e suínos (Boye et al., 2001). Com relação à infecção em humanos, a colonização do trato intestinal geralmente tem sido descrita em países africanos e entre aborígenes australianos (Lee et al., 1993). Para a sociedade ocidental, a doença se limita exclusivamente a grupos de indivíduos imunodeprimidos e homossexuais (Trott et al. 1995). Já a infecção dos leitões ocorre mais frequentemente na fase imediatamente posterior a transferência dos animais entre creche e recria. Os fatores predisponentes capazes de explicar esse aumento de ocorrência seriam o estresse que se segue a movimentação entre a creche e recria, alojamento em ambiente pior que o da creche e mistura de animais infectados (excretadores sadios) e não infectados (sem defesa imunitária). A infecção dos animais ocorre principalmente por contaminação com matéria fecal. Foi sugerido que um período de 21 dias seja requerido para a eliminação da *B. pilosicoli*

e até 50% dos leitões expostos à infecção podem ser afetados (Barcellos, 2000).

A patogenia da infecção relaciona-se principalmente com a aderência da bactéria ao epitélio do intestino grosso (Barcellos 2000). A colonização bacteriana maciça do epitélio interfere com a absorção intestinal e causa uma diarreia mucóide (Duhamel et al. 1996). Até o momento, é desconhecida a forma precisa dessa ligação, a quimiotaxia das espiroquetas para a mucina da superfície das células epiteliais do intestino parece ser um ponto importante na patogenia da doença. As espiroquetas possuem um movimento espiralado que ajuda na penetração e movimentação através do muco até a superfície do epitélio. O envelope externo das espiroquetas contém lipossacarídeos semirrugosos que são sorologicamente heterogêneos entre as diferentes cepas. Estudos comparativos com células cultivadas e em modelos animais sugerem que a união das células epiteliais envolve a relação entre moléculas específicas nas espiroquetas (adesinas) e receptores na célula do hospedeiro (Muniappa et al., 1996; Duhamel 2006). Outro mecanismo de patogenicidade descrito é a capacidade de ligação da bactéria com o receptor glicose-galactose da célula alvo, essa proteína bacteriana é codificada pelo gene *mglB*. Esse gene determina a síntese de um produto de expressão que interfere diretamente com a capacidade da *B. pilosicoli* em causar infecção intestinal (Zhang et al., 1998).

Quadro 1 - Características das *Brachyspiras* spp. intestinais dos suínos.

Espiroqueta	Origem	Relação com o Hospedeiro	Localização no intestino grosso
<i>B. hyodysenteriae</i>	Fezes e conteúdo do cólon de suínos com a disenteria suína	Patógeno	Muco sobre o epitélio, espaços intraepiteliais
<i>B. pilosicoli</i>	Fezes de suínos, outros animais e seres humanos com diarreia	Patógeno	Aderida ao epitélio intestinal
<i>B. innocens</i>	Fezes de suínos hígidos	Comensal	Superfície das células epiteliais.
<i>B. intermedia</i>	Fezes de suínos e aves híginas e com diarreia	Provável patógeno	Desconhecido
<i>B. murdochii</i>	Fezes de suínos hígidos	Comensal	Desconhecido
<i>B. alvinipulli</i>	Fezes de aves com diarreia	Patógeno	Aderido ao epitélio intestinal
<i>B. suanatina</i>	Fezes de suíno com diarreia e de patos Mallard hígidos	Patógeno	Aderido ao epitélio das criptas do ceco

Fonte: modificado de Barcellos (2000).

A colite espiroquetal apresenta-se como uma forma mais branda da disenteria suína, geralmente auto limitante. A mortalidade, praticamente inexistente e os prejuízos da infecção resultam de uma redução no ganho de peso diário e piora na conversão alimentar (Girard et al., 1995; Thomson et al., 1998). A diarreia começa 10 a 14 dias após a infecção, isso ocorre geralmente 2 a 3 semanas após a entrada dos leitões na fase de crescimento. Leitões muito jovens, com 4 semanas de idade, ou mais maduros, com até 20 semanas de idade, podem mostrar sinais de diarreia. Os sintomas podem persistir, mas é raro a observação de sinais clínicos em leitões com mais de 20 semanas (Johnston et al., 1999). As fezes são moles com consistência e aspecto semelhante a “cimento fresco”. A temperatura corporal pode subir até 40-41°C (Duhamel 2001).

As alterações mais específicas para a infecção pela *B. pilosicoli* são limitadas ao intestino grosso, que se encontra geralmente flácido e com a parede engrossada, em casos iniciais, com edema no mesentério. O conteúdo do intestino é fluido, mas pode se tornar mais denso próximo ao reto (Taylor e Trott 1997). Ocasionalmente, os danos à mucosa se caracterizam por erosões focais coalescentes, com aderência de partículas de alimento, dando ao mesmo uma aparência de calçamento com paralelepípedos (Johnston et al., 1999). Em casos avançados, a mucosa frequentemente encontra-se congestionada com áreas multifocais de hemorragia e aumento da produção de muco (Duhamel 2001).

O principal achado histológico da colite espiroquetal é a colonização da superfície do ceco e do cólon por um grande número de espiroquetas, unidas por uma extremidade ao epitélio formando uma figura definida como “falsa borda em escova” (Figura 5). As espiroquetas também podem ser encontradas dentro das criptas, assim como entre as células epiteliais descamadas e em multiplicação ativa dentro de macrófagos (Sobestiansky et al., 2001). Neef et al. (1994) observaram engrossamento da lâmina própria em cortes do ceco, associado a um incremento na profundidade das criptas. Acompanhando essas alterações puderam ser evidenciadas lesões inflamatórias e danos às células epiteliais, como

infiltração neutrofílica da lâmina própria, hemorragia, hiperemia e dilatação das criptas.

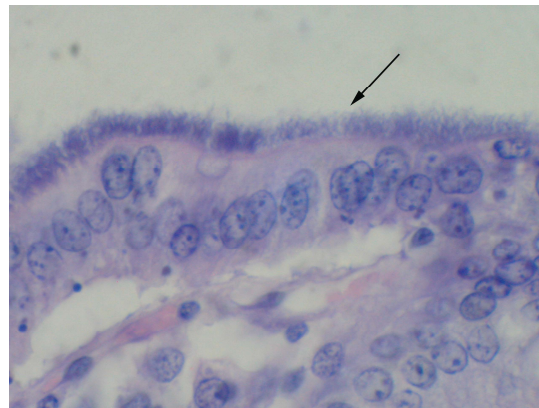


Figura 5 – Suíno cólon. Lesão microscópica de colite espiroquetal. Cólon observa-se inúmeras bactérias (*B. pilosicoli*) aderidas aos enterócitos (seta), “falso bordo em escova” (HE, 40X). Fonte: Prof. Roberto Guedes.

O diagnóstico presuntivo pode ser feito por microscopia de esfregaço das fezes coradas. Entretanto, a técnica considerada como a mais eficiente (“padrão ouro”) para o diagnóstico laboratorial das infecções intestinais por espiroquetas em suínos é o isolamento bacteriano, por detectar pequenas quantidades de bactérias nas fezes (Barcellos, 2000; Komarek et al., 2009). A colonização da mucosa, por parte das espiroquetas, pode ser evidenciada por exames histopatológicos de rotina, mas a confirmação da infecção deve ser feita pela coloração pela prata (Harrisson e Gosser, 1979) ou por técnicas mais precisas como a imunistoquímica utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais específicos (Thomas e Selwood, 1992; Joens et al., 1993). Técnicas baseadas na análise do ácido nucléico vieram a facilitar e dinamizar o diagnóstico das infecções por *Brachyspira* spp principalmente no diagnóstico *ante morte*. Ensaio de PCR que amplificaram segmentos dos genes ribossomais 16S ou 23S (16S rRNA e 23S rRNA) ou do gene codificador da NAD oxidase vem sendo amplamente utilizada no diagnóstico da colite espiroquetal (Elder et al., 1994; La et al., 2006; Phillips et al., 2009). O RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) possibilita um diagnóstico rápido e específico capaz de discriminar as espiroquetas patogênicas e não

patogênicas presentes no intestino dos suínos e de aves (Barcellos *et al.*, 2000).

A colite espiroquetel vem sendo diagnosticada na maioria dos países produtores de suínos no mundo. Está disseminada nos Estados Unidos da América, onde o agente tem sido isolado de praticamente todos os estados e cidades com produção significativa de suínos (Duhamel, 1998). Achados clínicos e laboratoriais indicam que espiroquetas patogênicas intestinais estão presentes em 76,5% das granjas suínas do Rio Grande do Sul, sugerindo que esses patógenos podem ter uma importante relação com as causas de diarreia em suínos dessa região (Barcellos *et al.*, 2000). Já em Santa Catarina, a *B. pilosicoli* foi identificada em 8,8% das 716 amostras de fezes provenientes de suínos de creche e terminação (Menin *et al.*, 2008). Na Europa, estudos epidemiológicos sobre a prevalência da infecção com *B. pilosicoli* em suínos também têm sido publicados. Uma investigação realizada entre 1992 e 1996 na Grã-Bretanha revelou que em 32,9% das granjas de suínos a *B. pilosicoli* era o único patógeno isolado de animais com colite em fase de crescimento (Thomson *et al.*, 1998). Outros 18,9% tinham infecções mistas com *B. pilosicoli* e *Y. pseudotuberculosis* (9,4%), com *L. intracellularis* (7,1%) e com *B. hyodysenteriae* (2,4%).

1.2.1.3 *Brachyspira hyodysenteriae*

A *B. hyodysenteriae* é o agente causal da disenteria suína. É uma enfermidade economicamente importante que afeta suínos de crescimento e terminação, entre 15 e 70 Kg de peso vivo (Guedes 2005). A *B. hyodysenteriae* é uma espiroqueta anaeróbia, flagelada, Gram negativo, produz β hemólise em ágar sangue bovíino, é sensível ao calor e ao pH ácido não sobrevivendo muito tempo fora do hospedeiro quando exposta ao ar e a luz solar (Sobestiansky *et al.*, 2001). No ambiente, quando protegida principalmente por fezes, pode sobreviver por até 112 dias (Boye *et al.*, 2001).

Suínos de todas as idades podem se infectar, mas a doença é mais comum em animais de recria e terminação, particularmente no período logo após a saída da creche. A

espiroqueta já foi recuperada de emas, ratos, gaivotas e patos Mallard (Hampson *et al.*, 2006). Camundongos são frequentemente usados como modelos experimentais e podem também se infectar naturalmente eliminando a *B. hyodysenteriae* por mais de 120 dias (Hampson *et al.*, 2004; Sobestiansky e Barcellos, 2007). A transmissão ocorre primariamente pela ingestão de material fecal proveniente de suínos com sinais clínicos ou assintomáticos. A disseminação da doença pode ocorrer por meio da água, particularmente lâmina d'água, fômites como botas e roupas sujas de fezes contaminadas e de alimentos contaminados (Komarek *et al.*, 2009). Movimentação e mistura de animais, superpopulação em baias, mudanças de rações e retirada de medicação, fornecimento de rações ricas em carboidratos ou ricas em energia e pouca fibra, rações deficientes de vitamina E e selênio, entre outros, provocam sintomatologia mais grave com maior índice de perdas (Guedes, 2005). A morbidade pode chegar a 90% e a mortalidade varia de 5 a 15% podendo chegar a 30%. No entanto, a morbidade e a mortalidade são diretamente influenciadas por condições estressantes presentes na granja, como alimentação, tamanho do lote, fluxo de produção e peso dos animais (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

A patogênese da disenteria suína é complexa e ainda não está completamente entendida. Várias bactérias da microbiota intestinal, além da influência da dieta sobre a densidade e composição dessa microbiota, parecem exercer um sinergismo com a *B. hyodysenteriae* favorecendo a colonização do intestino grosso (Nibbelink *et al.*, 1990). A *B. hyodysenteriae* ingerida é protegida da acidez estomacal pelo muco das fezes diarreicas, e, após atingir o intestino grosso, invade as criptas da mucosa, nas quais se multiplica. Apesar do agente ser visto, ocasionalmente, dentro de células epiteliais e na lâmina própria das áreas afetadas, acredita-se que as lesões sejam produzidas pela ação da hemolisina liberada durante a sua multiplicação e por lipooligossacarídeos de superfície de outras bactérias Gram negativas. Essas substâncias tóxicas rompem as junções celulares e permitem a penetração de espiroquetas e outros agentes secundários na lâmina própria (Sobestiansky e Barcellos, 2007). As proteínas de membrana

externa da *B. hyodysenteriae* incluem as proteínas variáveis de superfície (Vsp) e lipoproteínas como a SmpA e a BmpB que parecem estar envolvidas na evasão do sistema imune (Trott et al., 2001).

A diarreia da disenteria suína ocorre por má absorção em consequência de uma falência dos canais transportadores de íons epiteliais, que normalmente transportam íons sódio e cloreto do lúmen intestinal para o sangue. Nos animais infectados os níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e guanosina monofosfato cíclica (cGMP), na mucosa do colon são normais, mas a sua resposta aos estímulos está marcadamente reduzida (Argenzio, 1980).

Os sinais clínicos são de diarreia mucosa com sangue, ocasionalmente com fibrina, associada a anorexia e morte em poucos dias após o início dos sinais clínicos em animais não tratados (Guedes, 2005). Geralmente um surto de disenteria suína começa atingindo somente alguns animais num lote. Esses casos isolados podem repetir-se por algum tempo, constituindo a única manifestação clínica da doença, encobrindo assim seu caráter infeccioso. Com o aumento da pressão de infecção o número de infectados aumenta de forma progressiva, com diferentes graus de severidade (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

Na forma aguda a *B. hyodysenteriae* causa uma colite severa que cursa com diarreia sanguinolenta, que se não tratada pode levar os suínos a morte em até 24 horas. Os suínos ainda podem apresentar anorexia, sede intensa, flancos do abdômen retraídos, emagrecimento e a temperatura corporal pode atingir 40°C. Posteriormente as fezes muco sanguinolentas adquirem coloração marrom-chocolate e podem conter fragmentos de material brancento muco fibrinoso. Na sua forma crônica, a *B. hyodysenteriae* causa diarreia não sanguinolenta, depressão e diminuição do ganho de peso diário. A forma super aguda, em que morrem animais em poucas horas sem ocorrer diarreia, é rara (Sobestiansky, 1999).

Os animais mortos apresentam emaciação acentuada e o períneo encontra-se sujo de fezes. A desidratação é evidente. As lesões macroscópicas se limitam ao intestino

grosso, com linha de demarcação quase sempre evidente na junção íleo-cecal. A alteração macroscópica básica é uma enterite muco-hemorrágica ou fibrino-hemorrágica. O conteúdo é fluido, contendo muco e sangue e, algumas vezes, membranas fibrino necróticas. A mucosa apresenta-se edematosa, avermelhada e recoberta por quantidades variáveis de fibrina e muco. Pode haver aumento dos linfonodos mesentéricos (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

As lesões histológicas significativas são somente encontradas no ceco, cólon e reto (Sobestiansky e Barcellos, 2007). As lesões agudas típicas incluem espessamento da mucosa e da submucosa devido à congestão vascular e ao extravasamento de fluidos e leucócitos. Há hiperplasia das células caliciformes e das células epiteliais na base das criptas que podem se apresentar alongadas e hipercoreadas. As espiroquetas podem ser observadas no interior das células caliciformes e entre os enterócitos. Como consequência da perda de conectividade dos enterócitos, ocorre necrose e desprendimento do epitélio. Há um aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria com acúmulo excessivo de neutrófilos, principalmente ao redor de capilares sanguíneos próximos ao lúmen intestinal. Ocorre hemorragia ao redor das áreas de ulceração que normalmente são invadidas por colônias de bactérias secundárias. Nas lesões crônicas evidencia-se o acúmulo de grandes quantidades de fibrina, muco e restos celulares sobre a mucosa intestinal e também no interior das criptas. A hemorragia e o edema são menos pronunciados. A necrose superficial pode ser intensa, mas ulcerações profundas não ocorrem (Fellström et al., 1996; Sobestiansky et al., 2001).

Os dados clínicos, as alterações macroscópicas e os achados histológicos são importantes para o estabelecimento do diagnóstico. Esfregaços da mucosa ou de fezes observados em microscópio de campo escuro, de contraste de fase ou corados pela Safranina indicam um aumento no número de espiroquetas. A confirmação do diagnóstico pode ser feita pelo isolamento e identificação bioquímica da *B. hyodysenteriae* ou por técnicas moleculares nas amostras de fezes ou da mucosa afetada. Alguns testes sorológicos como aglutinação microscópica, imunofluorescência

indireta, hemólise passiva, ELISA e imunodifusão podem ser feitos, mas somente permitem identificação de positividade de rebanho, além de serem sorotipo específico.

A doença é relatada em todo mundo e no Rio Grande do Sul tem sido reportada em 3,2% das infecções em criações comerciais (Barcellos et al., 2000). Os EUA reportaram uma diminuição da incidência da disenteria suína nos últimos anos caindo de 33% para 11%. Recentes mudanças na estrutura e manejo da indústria de produção de carne suína, incluindo a adoção de práticas produtivas mais intensivas, tem levado a um decréscimo na prevalência da infecção por *B. hyodysenteriae* na maioria dos países produtores de suínos. Entretanto a disenteria suína ainda é uma doença relativamente comum e importante na Europa. Na união européia a *B. hyodysenteriae* foi identificada como o agente causal de diarreia em 6 propriedades (7%), das 85 analisadas (Thomson et al., 1998). Na Suécia de 72 granjas com problemas de diarreia 14% estavam infectadas pela *B. hyodysenteriae* (Møller et al., 1998).

1.2.1.4 *Salmonella* spp.

A salmonelose é das doenças septicêmicas e entéricas de maior importância econômica da suinocultura mundial (Reed et al., 1986). A *Salmonella* spp. é um bacilo Gram negativo, aeróbio facultativo, móvel (com exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum) com múltiplos flagelos, cresce bem em meios de cultivo convencionais e não fermentam a lactose ou o fazem lentamente (Clarke e Gyles, 1993). A temperatura ótima para crescimento é 37°C (Franco e Landgraf, 1996), porém desenvolvem-se numa faixa de crescimento de 7°C a 45°C, são resistentes a dessecação e ao congelamento, possuindo a capacidade de sobreviver no ambiente por anos (Wilcock e Schwartz, 1993). No entanto, são sensíveis à luz solar e à maioria dos desinfetantes como fenóis, clorados e iodados (Sobestiansky et al., 1999).

A classificação e a nomenclatura das salmonelas sofreram várias modificações nos últimos anos e ainda não estão totalmente definidas. A classificação atual, que é baseada em características bioquímicas, divide o gênero da *Salmonella* em duas espécies, *Salmonella*

enterica e *Salmonella bongori* (Campos, 1999). Um esquema de identificação denominado Kauffmann e White, divide o gênero em sorovares, tendo como base a composição de seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar) (Campos, 1999) e é amplamente utilizado para classificar as salmonelas.

O suíno pode ser infectado por uma variedade de sorotipos de *Salmonella enterica*. Os três sorotipos de maior importância na saúde animal são a *S. enterica* sorotipo Choleraesuis, *S. enterica* sorotipo Typhimurium e *S. enterica* sorotipo Typhimurium (Guedes 2005). A doença se manifesta principalmente em animais de crescimento, entre 8 e 16 semanas, causando enterite em caso de infecção por *S. typhimurium* e septicemia em casos de infecção por *S. choleraesuis* (Reed et al., 1986). No entanto, as síndromes clínicas em suínos, causadas por sorotipos adaptados, não são o principal motivo de preocupação na infecção por salmonelas nesta espécie (Van Der Gaag et al., 2003), mas as questões relevantes à segurança dos alimentos e presença de *Salmonella* spp (sorotipos não-adaptados) em produtos cárneos de origem suína (Davies e Nichols, 2001).

A *S. choleraesuis* há alguns anos era o sorotipo mais frequentemente isolado de animais com salmonelose clínica, estando associado a quadros de septicemia fatal. Este sorotipo já foi encontrado em 96% dos isolados de suínos clinicamente recuperados e sadios de plantéis afetados (Morehouse 1972). Hoje a *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium é a mais presente das salmonelas em suínos, sendo o sorotipo mais isolado dos casos de infecção alimentar em humanos (Nadvorny et al., 2004).

A infecção por salmonelas ocorre pela via fecal-oral. A transmissão nasal (nariz-nariz) e por aerossol já foi confirmada para a *S. typhimurium* (Oliveira et al., 2007). As fontes relevantes de disseminação do micro-organismo para os suínos são o contato com as fezes de animais infectados, a inadequada limpeza e desinfecção das baias, a introdução de animais portadores assintomáticos e alimentos contaminados por *Salmonella* sp. na granja e componentes de ração animal contaminados contendo subprodutos de leite e carne (Linton, 1979; Hirsh, 1990; Sobestiansky et al., 1999). No entanto, é importante enfatizar que

ingredientes de origem vegetal também podem ser fonte de contaminação para os alimentos (Schwartz, 2000).

De maneira geral, após a chegada da bactéria no intestino há uma invasão de células M e de enterócitos por meio de um rearranjo do citoesqueleto dessas células, induzido por proteínas efetoras secretadas pela *Salmonella* sp. Durante esse processo há uma atração de neutrófilos para o local, mediada pela IL-8, seguida da infiltração dessas células na lâmina própria. Uma hora após infecção, as *Salmonellas* alcançam a porção basal da célula e são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos. Enquanto em macrófagos há aparentemente indução de apoptose, os neutrófilos parecem sofrer uma maior atração para o sítio da infecção, ocorrendo uma massiva resposta inflamatória local. A liberação de proteases e outros mediadores das células inflamatórias resultam em necrose da mucosa levando a diarreia e excreção da bactéria no ambiente (Santos et al., 2003). Posteriormente, as salmonelas migram para o sistema retículo endotelial pelas vias linfáticas e sanguínea e são eliminadas quando o animal é submetido a fatores estressantes (Ekperigin e Nagajara, 1998; Ohl e Miller, 2001).

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium esta associada com enterocolites prolongadas e usualmente fatais em criações intensivas de suínos (Reed et al., 1986). A doença dissemina-se rapidamente no rebanho. O sinal clínico inicial da enterocolite é diarreia aquosa, amarelada, inicialmente sem sangue e muco. O sangue pode aparecer esporadicamente nas fezes, mas não com a mesma intensidade que ocorre em disenterias hemorrágicas. Em alguns casos, moldes de fibrina podem ser observados entremeados as fezes, principalmente nos casos mais graves. Os suínos afetados apresentam-se febris, alimentam-se menos e apresentam desidratação em decorrência da severidade e duração da diarreia. A mortalidade é baixa, ocorrendo somente após muitos dias de diarreia (Kich 2007).

Macroscopicamente, observam-se na mucosa do ceco e cólon, áreas de tecido necrosado de tamanhos variados. O conteúdo é líquido e fétido, contendo grumos de tecido necrótico e fibrina, os linfonodos mesentéricos

estão aumentados (Sobestiansky et al., 2001). Em processos crônicos, a necrose difusa da fase aguda se regenera, com exceção das áreas de trombose e causa isquemia, que provoca a formação das úlceras. Lesões agudas ou crônicas podem estar localizadas tanto no intestino delgado quanto grosso (Guedes, 2005). Os animais afetados apresentam histologicamente maior frequência enterite necrótica, focal ou difusa e colite, com grande quantidade de neutrófilos na lâmina própria. No lúmen intestinal, próximo à mucosa, observam-se placas diftéricas composta por restos de células, fibrina e colônias bacterianas (Kich, 2007).

O diagnóstico baseia-se no isolamento da *Salmonella* spp. através de exames bacteriológicos. Segundo Oliveira (2000), a técnica microbiológica convencional pode incluir um passo de pré-enriquecimento ou começar diretamente no enriquecimento seletivo seguido de posterior plaqueamento. No animal vivo, o exame pode ser realizado a partir de suabes retais individuais ou “pool” de fezes frescas em rebanhos. Por ocasião da necropsia, o material a ser coletado inclui fezes, de preferência do íleo. A presença de colonização superficial do epitélio e invasão da lâmina própria por *Salmonella* sp. pode ser evidenciada através da técnica de imuno-histoquímica com o uso de anticorpos policlonais. O exame sorológico pelo teste de ELISA pode ser utilizado, porém o estado de portador assintomático apresenta resultado positivo dependendo dos sorovares presentes na granja e do antígeno que compõem o Kit. Amostras de fezes utilizadas para ensaios de PCR têm utilidade limitada, devido à baixa sensibilidade da técnica neste tipo de material e à impossibilidade de diferenciação entre cepas patogênicas e não patogênicas de *Salmonella* (Côté et al., 2004; Guedes 2005; Kich et al., 2007).

A prevalência nos suínos de abate dos sorotipos Typhimurium, Agona, Derby, Bredney e Panamá é maior que 50% e os sorotipos mais frequentes são *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium é a segunda mais importante nas infecções alimentares em humanos. Isto enfatiza a necessidade e importância de implementar programas de controle, tanto nas unidades produtoras como no

transporte, abate e interior dos abatedouros. No estado de São Paulo acredita-se que a prevalência seja de 4,8% do rebanho (Baccaro *et al*, 2003). Em Santa Catarina a frequência de *Salmonella* sp. foi de 7,3% na creche e 10,9% na terminação, de um total de 330 e 386 amostras analisadas, respectivamente (Menin *et al.*, 2008).

Estudos de prevalência na Coreia do Sul identificaram que 51,1% das granjas eram positivas para *Salmonella* sp. (Suh e Song, 2005). Essa alta prevalência também já foi identificada na Finlândia (54,83%) (Biksi *et al.*, 2007) e na Dinamarca onde 19 (24,1%) das 79 granjas analisadas eram positivas para o agente (Stege *et al.*, 2000).

1.2.1.5 *Escherichia coli* enterotoxigênica

A *Escherichia* (*E.*) *coli* é um bastonete fermentativo, Gram-negativo, que cresce rapidamente em meios de cultivo simples incluindo agar MacConkey, onde forma grandes colônias rosadas. A *E. coli* é um dos agentes etiológicos mais frequentemente isolados em casos de diarreia no homem e em diferentes espécies animais (Holland, 1990; Nataro e Kaper, 1998). A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastro-intestinal são comensais (Nataro e Kaper, 1998).

Numerosas fimbrias são expressas pelas *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) que causam diarreia em suínos, essas fimbrias incluem: F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F7 (F41) e F18. As ETEC são classificadas baseadas na sua estabilidade termal. Elas são divididas em toxinas termo labéis (LT-I e LT-II), termo estáveis (STa, STb) e shiga toxina (Stx2e). Para que a ETEC seja capaz de realizar infecção as cepas devem possuir esses fatores de virulência (fimbria e toxina) (Dubreull, 2008). As fimbrias são consideradas fatores de virulência, pois permitem a aderência dessas bactérias a receptores específicos localizados na superfície dos enterócitos (Macedo *et al.*, 2007). Cepas toxigênicas de *E. coli* causam diarreia aquosa profusa e/ou lesões vasculares sistêmicas devido à liberação de enterotoxinas (Francis, 2002). Após a adesão as ETEC produzem toxinas que induzem a hipersecreção pelas células do intestino (LT e ST) ou que interferem com a síntese protéica das células (Stx2e)

(Holland, 1990). A colonização bacteriana e o quadro clínico da infecção são específicos com a idade e linhagem do animal, ou seja, leitões lactentes são infectados mais frequentemente por cepas possuidoras de determinadas fimbrias como 987P e F41 e, suínos de creche tem a tendência de se infectar por cepas com a fimbria F18. Isso ocorre porque os enterócitos possuem receptores específicos para as fimbrias e estes mudam de acordo com a faixa etária do animal (Francis *et al*, 1998).

Na forma clínica, a doença afeta principalmente leitões logo após o nascimento (Mores e Moreno, 2007), mas, Stege *et al.* (2000) identificaram cepas de ETEC em suínos de recria com ou sem sintomas de diarreia, o que indica a presença desse agente nas fases finais da cadeia produtiva. Meni *et al.* (2008) identificaram em Santa Catarina que a ETEC foi o agente bacteriano mais frequentemente isolado de quadros clínicos de diarreia nas fases de maternidade, creche e terminação sendo que nessa última, foi diagnosticada em 26,9% das 386 amostras analisadas. A partir da análise fenotípica das cepas isoladas de *E. coli*, observou-se que o sorotipo fimbrial mais prevalente na fase de terminação foi a cepa F4 (K88) com 5,4% de frequência. Estes dados descrevem um intervalo além do relatado por outros autores que julgam os animais suscetíveis somente até a fase de creche (até os 60-65 dias de idade) (Mcorist e Gebhart, 1999).

A presença de *E. coli* enteropatogênica tem maior importância clínica nas fases da maternidade e creche. Quando na recria e terminação, não cursa com diarreia, mas pode causar um desequilíbrio na flora intestinal predispondo infecções entéricas (Thonson *et al.*, 1998; Jacobson *et al.*, 2003). Jacobson *et al.* (2003) identificaram cepas de ETEC em quatro de seis rebanhos de baixo desempenho. Todas as granjas possuíam casos ou histórico de diarreia pós-desmame, portanto, a presença de ETEC em animais de terminação pode indicar uma alta pressão de infecção de agentes causadores de diarreia na creche e maternidade ou que a diarreia pós desmame predispõe surtos de doenças entéricas nas fases de recria e terminação. Recentemente, Pittman (2010) reportou um surto de diarreia, em suínos de 11 semanas de idade, onde o único agente observado foi a *E. coli* F18 que produzia toxina

Shiga semelhante. Este autor sugere a introdução das cepas de *E. coli* enterotoxigenicas F18 no diagnostica diferencial das diarreias em suínos de recria e terminação.

As duas formas mais frequentemente utilizadas para a detecção dos fatores de virulência em *E. coli* em animais são a imunofluorescência indireta em esfregaço de mucosa, ou em cortes de congelação de intestino corados com anticorpos específicos para antígenos fimbriais (Mullaney et al., 1991), e a detecção de genes de virulência pela PCR. A técnica da PCR multiplex permite a pesquisa de diferentes alvos de amplificação de DNA, utilizando-se diferentes *primers* em uma mesma reação, o que reduz sensivelmente os custos do teste (Macedo et al., 2007).

São poucos os estudos brasileiros sobre a prevalência e importância de diferentes cepas patogênicas de *E. coli* na terminação (Menin et al., 2008). No Reino Unido de 85 granjas, a ETEC (K88) foi identificada como agente causador primário de diarreia em uma única granja, em contrapartida as ETEC foram diagnosticadas em infecções mistas em 5 granjas atuando simultaneamente com a *L. intracellularis*, *B. pilosicoli* e *Yersinia pseudotuberculosis* (Thomson et al., 1998). Na Dinamarca, a ETEC estava presente em 84 das 720 amostras de fezes de suínos da terminação totalizando 8 das 72 granjas avaliadas (Møller et al., 1998). Posteriormente, Stege et al. (2000) observaram um aumento na prevalência de ETEC, pois dentre 79 propriedades estudadas 19 (24,1%) foram positivas.

1.2.1.6 *Trichuris suis*

O *Trichuris* sp. é um parasita gastrointestinal de distribuição mundial e pode ser encontrado em uma grande variedade de hospedeiros. A tricuriase humana tem distribuição mundial, e estimativas apontam que mais de 1 bilhão de pessoas são afetadas no mundo todo. Suínos são considerados os hospedeiros naturais do *Trichuris suis* apesar do parasita ser encontrado em primatas e humanos (Stewart e Hoyt, 2005). Os sinais clínicos incluem anemia, hipalbuminemia, anorexia, desidratação e diarreia mucosa sanguinolenta (Batte et al., 1977).

As fêmeas adultas medem de 6 a 8 cm e os machos possuem metade desse tamanho. O *Trichuris* sp. possui uma morfologia única, a porção do esôfago anterior está aderida a mucosa do ceco e/ou colón, possui 0,5mm de diâmetro, e estende-se até o terço médio do helminto. O terço posterior do parasita é mais espesso com aproximadamente 0,65 mm de diâmetro e projeta-se para o lúmen intestinal. Os ovos se apresentam, ao exame microscópico, como bipolares, de parede espessa, coloração amarela a marrom, e tamanho de 60 por 25 micrômetros, contendo uma célula no seu interior (Sobestiansky et al., 2001).

Após eliminação nas fezes, os ovos tornam-se infectantes depois de 3 a 4 semanas e podem permanecer no ambiente por até seis anos (Burden et al., 1987). A partir do momento que a L1 atinge o ceco e o colón, ela penetra nas células da cripta e migra pela lâmina própria até atingir a submucosa onde o parasita se adere até a fase adulta. O período pré patente é de 6 a 7 semanas. A infecção por *Trichuris suis* causa destruição dos enterócitos, ulceração da mucosa e destruição dos capilares sanguíneos causando hipoxia tecidual (Mansfield e Urban, 1996).

Este parasita é implicado como causa de proliferação bacteriana no colón. A lesão primária causada pelo *T. suis* pré-dispõem à adesão e proliferação das bactérias *B. hyodysenteriae*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. typhisuis* e a *L. intracellularis* que podem causar doenças entéricas primárias no colón de suínos em crescimento (Masnfield e Urban; Sobestiansky et al., 2001). A sobreposição das manifestações clínicas e patofisiológicas dos agentes causais de colite e do *T. suis* podem causar dúvidas quanto a primasia do agente implicado nas diarreias mucohemorrágicas (Masnfield e Urban 1996). Quando associado a agentes bacterianos secundários, os sinais clínicos tendem a ser mais acentuados levando rapidamente a morte (Batte et al., 1977; Sobestiansky et al., 2001).

Macroscopicamente, ocorre edema de parede intestinal, que apresenta nódulos contendo exsudato e restos de parasitas. A mucosa do intestino pode apresentar uma membrana fibrinonecrotica e áreas de hemorragia (Stewart e Hoyt, 2005). O

diagnóstico é feito preferencialmente mediante a necropsia. O quadro clínico e o exame coprológico também são importantes. Os ovos do parasita podem ser escassos nas fezes o que muitas vezes dificulta o diagnóstico (Sobestiansky et al., 2001).

O *T. suis* é comumente encontrado em suínos. Estudos de prevalência identificaram ovos de *T. suis* em 20% dos rebanhos ingleses e em 23% dos rebanhos dinamarqueses (Kringel e Roepstorff 2006). No Brasil, de 72 granjas foram coletadas 1.795 amostras fecais, das quais 15,82% apresentaram resultados positivos para parasitas, indicando a ocorrência dos gêneros *Oesophagostomum*, *Hyostrongylus*, *Trichuris* e *Ascaris*. Neste trabalho observou-se que as percentagens de infectados por *Trichuris* na idade de seis semanas a seis meses (5,94%) foram estatisticamente superiores às taxas de infecções nos animais com mais de 6 meses (0,8%) (Lignon et al., 1981), indicando que as fases de creche, recria e terminação são as mais afetadas por esse parasita.

1.2.1.7 Infecções mistas

Os riscos de diarreia aumentam quando os suínos são infectados por dois ou mais patógenos, simultaneamente (Stege et al., 2000, Suh e Song., 2005), pois os sinais clínicos e a lesão intestinal tendem a ser mais intensos (Jacobson et al., 2003). As infecções entéricas assim como as infecções mistas representam um grande desafio para a suinocultura atual, pois exigem formas eficientes de controle e tratamento. Rebanhos com baixo desempenho frequentemente apresentam diarreia e as infecções mistas nestes casos são comuns. Em 58% dos casos de diarreia em suínos de recria e terminação de rebanhos de baixa *performance* apresentavam co-infecção por *B. pilosicoli* e *L. intracellularis*, sugerindo uma forte associação entre esses dois agentes (Jacobson et al., 2003; Jacobson et al., 2005).

A *L. intracellularis* é o agente entérico mais prevalente em suínos de terminação (Jacobson et al., 2003; Thomson et al., 1998). Interessante que na maioria dos casos de diarreia as infecções são combinadas com outras bactérias como a *B. hyodysenteriae* e *Salmonella* spp (Mooller et al., 1998; Suh e

Song 2005; Jacobson et al., 2005) indicando uma clara interação da *L. intracellularis* com outros agentes causadores de diarreia em suínos. Estima-se que a ocorrência de infecções mistas nos rebanhos brasileiros seja de 4,8%, sendo que a coinfecção por *L. intracellularis* e *B. pilosicoli* seja a mais prevalente, totalizando 3%, seguida da associação de *L. intracellularis* e *Salmonella* sp, 1% (Bacarro et al., 2003).

Suh e Song (2005) analisando 462 amostras de fezes de suínos observaram a ocorrência de infecções mistas, onde 3% das amostras foram simultaneamente infectados com *Salmonella* sp. e *B. hyodysenteriae*, 2.2% com *L. intracellularis* e *Salmonella enterica* spp e 1.3% com *L. intracellularis* e *B. hyodysenteriae*.

2. Capítulo 2:

Prevalência de agentes enteropatogênicos envolvidos com diarreia em suínos de recria e terminação no estado de Minas Gerais

2.1 RESUMO

Diarreia em suínos, nas fases de recria e terminação, é um problema importante em muitos rebanhos. A prevalência da *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Salmonella* spp., *E. coli* enterotoxigênica, *Trichuris suis* e a ocorrência de infecções mistas foram investigadas. Quarenta e seis rebanhos com diarreia ou com histórico de diarreia foram selecionados em quatro regiões produtoras de suínos no estado de Minas Gerais. Das propriedades analisadas constatou-se que a prevalência geral dos rebanhos com *L. intracellularis*, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *E. coli* enterotoxigênica foi 19,56% (IC 8,1-31,02%), 6,52% (IC 0-13,65%), 10,87% (IC 1,87-19,87%), respectivamente. Infecções mistas foram diagnosticadas em 30,43% (IC 17,13-43,73%) dos rebanhos analisados, e a coinfecção com *L. intracellularis* e a *S. enterica* sorotipo Typhimurium foi a mais frequente (10,87%) (IC 1,87-19,87%). *Brachyspira pilosicoli* foi diagnosticada em somente dois rebanhos, sempre associada com infecções mistas. *Brachyspira. hyodysenteriae* e *Trichuris suis* não foram identificados em

nenhuma amostra analisada. Esses dados contribuem para o estabelecimento de programas de prevenção e controle dos enteropatógenos em rebanhos de recria e terminação no estado de Minas Gerais.

Palavras-chave: suíno, enteropatógenos, recria e terminação, epidemiologia, Minas Gerais.

2.2 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor de suínos do mundo atrás apenas da China, União Européia e Estados Unidos. Em 2008, o Brasil exportou 606,51 mil toneladas, aumento significativo em relação as 529,41 mil toneladas de 2007, atingindo a cifra recorde de US\$ 1,48 bilhão em exportações de carne suína, 20% a mais do que em 2007 (US\$ 1,23 bilhão) (ABIEPCS, 2008). Essa expansão da produção nacional voltou-se para a potencialização da suinocultura em algumas regiões brasileiras, principalmente a região Sudeste e Centro-Oeste (Fávero, 2003), incluindo o estado de Minas Gerais. Hoje Minas Gerais ocupa a quarta posição em produção de suínos no Brasil e a produção vem aumentando gradativamente ano a ano (ABIEPCS, 2008).

No ano de 2006, foram recadastradas 1.493 granjas que comercializam suínos, situadas em 374 municípios mineiros, somando 203.640 matrizes e 2.320.582 suínos (Garcia, 2006). Em 2008 a produção estadual atingiu 348 mil toneladas, um aumento de 3,77% comparado ao ano anterior. Só a região de Uberlândia teve um aumento de mais de 500% no seu efetivo suíno. Atualmente, a região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba possui 64.780 matrizes sendo a região com maior produção no estado, seguida pela Zona da Mata com 56.661 matrizes e região Metropolitana de Belo Horizonte com 25.044 matrizes (Garcia, 2006).

O crescimento da produção de suínos no estado vem sendo acompanhado detalhadamente pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Em 2006, o IMA efetuou o georreferenciamento de 88% das granjas, abrangendo 94% das matrizes suínas cadastradas. Do total de granjas cadastradas, 1.186 são de ciclo completo (79,4%), 264 são unidades de recria e terminação (17,7%) e 41

são unidades de produção de leitões (2,7%) (IMA, 2009).

A receita das exportações mineiras de carne suína, no período de janeiro a julho de 2009, aumentou quase 67%. O valor alcançado com a comercialização do produto no exterior foi de US\$ 61,4 milhões, na comparação com a cifra de US\$ 36,8 milhões do mesmo período de 2008 (IMA 2009). Com base na análise dos problemas e potencialidades dos grandes produtores nacionais, fica claro que Minas Gerais apresenta amplas possibilidades de se firmar como um grande fornecedor de carne suína para o Brasil e o mundo.

Em decorrência dessa importante participação na economia, os patógenos e as doenças que afetam o rebanho suínico estadual e nacional devem ser avaliados. Dentre as doenças de maior importância na suinocultura podemos citar as diarreias, principalmente as que ocorrem nas fases de recria e terminação, pois cursam com perdas econômicas significativas, principalmente relacionadas ao uso de medicamentos e perda de peso dos animais.

Estudos recentes internacionais têm demonstrado que a *Lawsonia intracellularis* causadora da enteropatia proliferativa, *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium* causadora da salmonelose suína, *Brachyspira pilosicoli* causadora da espiroquetose intestinal, *Brachyspira hyodysenteriae* causadora da disenteria suína e o *Trichuris suis* causador da tricuriase são os patógenos mais frequentes durante as fases de recria e terminação (Steghe et al., 2000; Baccaro et al., 2003, Suh e Song, 2005; Haugegaard, 2009). Steghe et al. (2000) observaram que amostras de *E. coli* enterotoxigênica podem ser detectadas em suínos de 30 a 50Kg com ou sem sinal de diarreia, o que colocou essa bactéria em evidência na fase de recria como causadora de diarreia (Pittman 2010).

Os riscos de diarreia aumentam quando os suínos são infectados por dois ou mais patógenos simultaneamente (Steghe et al., 2000, Suh e Song., 2005), pois os sinais clínicos e as lesões intestinais tendem a ser mais intensos (Jacobson et al., 2003). As infecções entéricas por um único patógeno assim como as infecções entéricas mistas representam um grande desafio

para a suinocultura atual, pois exigem formas eficientes de controle e tratamento. Apesar dos relatos sobre a importância de patógenos entéricos em animais de recria e terminação serem frequentes na literatura internacional (Thomson et al., 1998; Stege et al., 2000; Jacobson et al., 2005; Suh e Song 2005; La et al., 2006), sua relevância e frequência na suinocultura brasileira são pouco conhecidos.

A principal justificativa pela falta de informações sobre a frequência destes agentes causadores de problemas entéricos é a dificuldade de isolamento e detecção destes patógenos. *L. intracellularis* é uma bactéria intracelular obrigatória que não permite isolamento para comprovação de diagnóstico. As duas *Brachyspiras*, por serem anaeróbias restritas, são de difícil isolamento, não sendo cultivadas rotineiramente no Brasil atualmente. Desta forma, para o diagnóstico destes enteropatógenos têm-se utilizado técnicas moleculares em amostras fecais ou intestinais, como a PCR e a PCR-duplex (Baccaro et al., 2003). Já a *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium tem de ser necessariamente isolada, uma vez que o teste da PCR não diferencia cepas patogênicas de não patogênicas.

O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência dos enteropatógenos *L. intracellularis*, *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae*, *S. enterica*, *E. coli* enterotoxigênica, *T. suis* e a ocorrência de infecções mistas bacterianas em suínos, provenientes de propriedades com diarreia ou com histórico de diarreia, do estado de Minas Gerais, Brasil.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Granjas, animais e coleta de fezes

A amostragem foi realizada em dois níveis: propriedades e animais. Para a determinação do número de rebanhos a serem estudados foi utilizada amostragem simples empregando a prevalência crítica (50%); devido à ausência de dados prévios no estado; com intervalo de confiança de 95% e erro de 15% (Noordhuizen et al., 1997). A partir da lista conjunta de propriedades cedida pela professora Simone Koprowsky Garcia (Garcia, 2006) e

pelo órgão governamental de defesa sanitário, Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), que totalizaram 256 granjas de ciclo completo no estado, foram avaliadas 46 granjas de ciclo completo de suínos divididas em dois níveis; mais de 500 matrizes (>500) e entre 101 a 500 matrizes (101-500). Foram coletada fezes de uma média de 11 animais por propriedade (total 512 amostras) no período de janeiro de 2008 a fevereiro de 2010. As granjas foram selecionadas a partir de quatro diferentes regiões geográficas do estado de Minas Gerais, Brasil: regiões sul e sudoeste (SSO), metropolitana de Belo Horizonte (MBH), Zona da Mata (ZM) e Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (TAP). Essas regiões foram escolhidas para a amostragem por serem as quatro maiores áreas produtoras de suínos no estado.

Os animais amostrados tinham entre 60 e 140 dias, idade correspondente às fases de recria e terminação e estavam recebendo ração medicada. (promotores de crescimento). As fezes eram coletadas diretamente do reto, identificadas e enviadas sob refrigeração ao Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.3.2 Metodologia empregada no isolamento de *Salmonella spp.*

2.3.2.1 Pré-enriquecimento das amostras

Alíquotas de 1 grama de fezes foram homogenizadas com 4 ml de solução salina fosfatada tamponada (PBS) por 60 segundos sob agitação constante. Posteriormente, 1 ml dessa solução foi transferido para um tubo de hemólise com 9 ml de Água Peptonada Tamponada¹ estéril a 1% e incubadas em estufa a 37°C por 18-24 horas, sob condições normais de aeração (Bessa et al., 2004).

2.3.2.2 Enriquecimento seletivo

Alíquotas de 100µL, provenientes do pré-enriquecimento, foram transferidas para 9,9

¹ DB DIFCO™, Buffered Peptone Water, cat nº 218105, Interlab, São Paulo, SP, Brasil.

ml de caldo Rappaport-Vassiliades² e incubadas em estufa a 42°C por 24 horas, sob condições de aeração normais (Clarke & Gyles, 1993).

2.3.2.3 Isolamento em meio sólido

Uma alçada do caldo de enriquecimento de cada amostra foi semeada nos meios seletivos Ágar verde brilhante³ (AVB) e Ágar Xilose-Lisina-Tergitol 4⁴ (XLT-4). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 a 48 horas, sob condições normais de aeração (Davies & Nichols, 2001; Bessa et al., 2004).

2.3.2.4 Identificação dos isolados

As colônias suspeitas de *Salmonella* sp. foram identificadas pelas características morfológicas e bioquímicas. Para as provas bioquímicas foram utilizados os meios Triple Sugar Iron agar⁵ (TSI), caldo lisina⁶ e caldo uréia⁷. Os meios foram semeados e incubados em estufas por 18-24 horas a 37°C, sob condições normais de aeração (Clarke & Gyles, 1993; Bessa et al., 2004).

2.3.2.5 Confirmação sorológica dos resultados

A confirmação definitiva dos isolados identificados pelas provas bioquímicas como sendo *Salmonella* sp. foi feita pela aglutinação em lâmina, utilizando o Soro Salmonella Polivalente Somático⁸. O teste foi realizado a partir de culturas de 18 horas a 37°C, sob condições normais de aeração, crescidas em

Ágar Infusão Cérebro e Coração⁹ (BHI). Coletou-se com a alça de platina uma colônia bacteriana suspeita de *Salmonella* sp., e, sobre uma lâmina de vidro e homogenizou-se-a em uma gota de solução salina a 0,85%. Foi adicionada a esta solução inicial, uma gota de soro que foi homogeneizada com movimentos rotatórios delicados para a observação da aglutinação.

2.3.2.6 Sorotipificação de *Salmonella* sp.

Após a identificação, confirmação bioquímica e sorológica dos isolados, estes foram repicados em placas de Ágar MacConkey¹⁰ e incubados na estufa por 24 horas a 37°C sob condições normais de aeração. Em seguida tocou-se uma colônia, de cada placa, com agulha de inoculação e semeou-se em profundidade em microtubos contendo 4 ml de ágar de manutenção. Estes microtubos foram então identificados e incubados por 18 horas sob as mesmas condições de temperatura e de aeração (Oliveira, 2000; Bessa et al., 2004). Os microtubos contendo os isolados foram embalados e enviados ao setor de Enterobactérias do departamento de bacteriologia do instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, para sorotipificação.

2.3.3 Metodologia empregada no isolamento de colônias Lactose positiva sugestivas de *Escherichia coli*

Alíquotas de 1 grama de fezes homogeneizadas em 4 ml de PBS estéril foram plaqueadas em ágar MacConkey e incubados em estufa por 24 horas a 37°C sob condições normais de aeração. Posteriormente, as colônias lactose positiva com características morfológicas de *Escherichia coli* foram selecionadas com o auxílio de uma alça descartável. Essas colônias foram congeladas em uma solução com 70% de caldo BHI e 30% de Glicerol¹¹ a -80°C para posterior genotipagem dos fatores de patogenicidade.

² DB DIFCO™, Rappaport-Vassiliades R10 Broth, cat n° 218581, Interlab, São Paulo, SP, Brasil.

³ DB DIFCO™, Brilliant Green Agar, cat n° 228530, Interlab, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ DB DIFCO™, XLT4 Agar base, cat n° 223420, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

⁵ DB DIFCO™, Triple sugar iron agar, cat n° 226540, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

⁶ DB DIFCO™, Lysine Broth, cat n° 211759, Interlab, São Paulo, SP, Brasil.

⁷ DB DIFCO™, Urea Broth, cat n° 227210, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

⁸ PROBAC do Brasil, Soro polivalente somático Anti “o”, Higienópolis, SP, Brasil.

⁹ DB BACTO™, Brain Heart Infusion, cat n° 237500, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

¹⁰ DB DIFCO™, Agar MacConkey, cat n° 212123, Interlab, São Paulo, SP, Brasil

¹¹ Ultra Pure Glycerol, Lab Synth, Diadema, SP, Brasil.

2.3.4 Detecção de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* pela PCR Multiplex

A técnica de PCR multiplex utilizada para o diagnóstico de *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* foi feita de acordo com o protocolo descrito por La et al., (2006) sendo descrito aqui brevemente.

2.3.4.1 Controle positivo

Os controles positivos de *B. pilosicoli* (cepa P51 - NCTC 12874) e *B. hyodysenteriae* (cepa B204T - ATCC 31212) foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Veterinária e Ciências Biomédicas da Universidade de Minnesota, EUA. As bactérias chegaram ao laboratório em meio de congelamento contendo sangue e soro fetal bovino (SFB). Após o descongelamento alíquotas de cada amostra foram semeadas até o esgotamento em placas de ágar sangue ovino a 5%. Foram feitos de 2 a 3 cortes no ágar, com o auxílio de uma alça estéril, para facilitar o crescimento das colônias de *Brachyspira* sp.. As placas foram posteriormente incubadas em cubas de anaerobiose, juntamente com uma placa de Anaerobac¹² para o estabelecimento da anaerobiose, por 72 horas a 37°C.

Após crescimento, as placas foram lavadas com 1 ml de PBS estéril. Desse lavado, 250 µL foram acondicionados em microtubos de 1,5 ml contendo 500 µL de SFB para posterior congelamento a -80°C. Esse material foi utilizado como controle positivo da reação da PCR durante todo o experimento.

O controle positivo de *L. intracellularis* foi obtido a partir do pool de segmentos intestinais de suínos com lesões típicas de enteropatia proliferativa, confirmada por IHQ, que foram congelados e mantidos a -80°C. A mucosa foi raspada utilizando-se lâminas de vidro e o material obtido a partir da mucosa lesada foi homogeneizado em solução de Sacarose, fosfato e glutamato (SPG) na

¹² PROBAC do Brasil, Anaerobac, Higienópolis, SP, Brasil.

proporção de 1:1 em homogenizador 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 como *Salmonella* sp e *T. suis*. Esse material foi utilizado como controle positivo durante todo o experimento.

2.3.4.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído de todas as amostras de fezes utilizando-se o QIAamp DNA Stool Mini Kit¹³ de acordo com instruções do fabricante.

2.3.4.3 Pares de Primers do PCR multiplex

Os pares de primers utilizados na PCR foram respectivamente: H1 (FWH) (5'-ACTAAAGATCCTGATGTATTTG-3') e H2 (REV) (5'-CTAATAAACGTCCTGCTGC-3') que tem como alvo a amplificação de um fragmento de 354 pb no gene *nox* da *Brachyspira hyodysenteriae*; P1 (FWH) (5'-AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC-3') e P2 (REV) (5'-GCACCTATGTTAAACGTCCTTG-3') amplificando uma região de 823 pb do segmento 16S do rRNA da *B. pilosicoli*; e os primers Lint-146F (5'-GATAATCTACCTTCGAGACGG-3') e Lint-745R (5'-TGACCTCAGTGTCAGTTATCGT-3') que amplificam um segmento de 655 pb do gene 16S do rRNA da *L. intracellularis*.

2.3.4.4 PCR Multiplex

Todos os testes da PCR foram executados em um volume de 25 µl por microtubo. O mix da PCR consistia de: 1X de tampão para PCR (contendo 1,5 mmol⁻¹ de MgCl₂), 1,25 U de Taq DNA polymerase¹⁴, 0,1 mmol⁻¹ de cada dNTP¹⁵, 0,2 µmol⁻¹ de cada par de primer (H1 e H2, P1 e P2, Lint-146F e Lint-745R) e 2,5 µl da amostra de DNA (*template*).

¹³ QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN, cat n° 51504, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁴ Cenbiot, Taq. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹⁵ INVITROGEN, dNTP set, Carlsbad, CA, EUA.

As condições da PCR envolveram um passo inicial de 5 min a 95°C para a ativação da Taq DNA polimerase, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 58°C por 90s e extensão a 68°C por 120s. O último passo consistiu de extensão final a 68°C por 10 min. Os produtos da PCR (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X, e marcados com Brometo de Etídio e revelados sob luz ultra violeta.

2.3.4.5 Teste de sensibilidade analítica do PCR multiplex

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

Os controles positivos, *L. intracellularis*, *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*, todos com 10⁹ bactérias por ml, foram submetidos a diluições seriadas de 10¹ até 10⁶ bactérias por ml. O PCR de cada uma das amostras nas suas diferentes diluições foi feito e posteriormente, essas diluições de bactérias, foram misturadas a fezes, sabidamente negativas para cada um dos agentes testados, na proporção de 0,2 gramas de fezes e 200 µL de cada diluição. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex por aproximadamente 60s e desse homogeneizado foram retiradas 0,2 gramas para a realização da PCR multiplex. Após a análise inicial de cada uma das bactérias nas suas respectivas diluições com e sem fezes, realizamos um *mix* das três bactérias em cada uma das diluições, somente com as três bactérias reunidas e, posteriormente, das três

bactérias acrescidas das fezes. Para a realização desse *mix* pesou-se 0,6 gramas de fezes e esta foi acrescida de 200 µL de *L. intracellularis*, 200 µL *B. pilosicoli* e 200 µL *B. hyodysenteriae*. Essa mistura foi realizada em um microtubo de 2 ml que posteriormente foi homogeneizado em um vórtex por 60 s. Pesou-se 0,2 gramas desse homogeneizado para a realização da PCR multiplex de cada uma das diluições analisadas.

2.3.5 Detecção de *Escherichia coli* enterotoxigênica

O método empregado para a detecção de *E. coli* enterotoxigênica é o mesmo descrito por Macedo et al. (2007). Como controle positivo para os fatores de virulência da técnica da PCR multiplex foram utilizadas quatro amostras referência de *E. coli*, gentilmente cedidas pelo Veterinary Diagnoses Laboratory da University of Minnesota (EUA): 2568 (Stb, StaP, F18 e Stx2e) (Cepa 31385-97), 2569 (Stb, LT e K88) (Cepa 45556-97), 2570 (987P e StaP) (Cepa C3-98) e 2571 (StaP, K99 e F41) (Cepa C5-98).

2.3.5.1 Extração de DNA

As amostras de colônia lactose positiva foram descongeladas e plaqueadas em ágar MacConkey. As colônias isoladas foram coletadas usando alça de platina e ressuspensa em microtubo contendo 500µl de solução tampão fosfato (PBS), pH 7,2, estéril. Após homogeneização em vortex, as amostras foram centrifugadas a 7.000xg por 10min sob refrigeração, para sedimentação de bactérias. Ao sedimento, foi adicionado 270µl de solução de lise (Tris HCl 1,0M, pH 8,0; EDTA 0,5M; NaCl 4,5M; SDS 10%; qsp água destilada), 200µl de High TE (Tris HCl 1,0M, pH 8,0; EDTA 0,5M; qsp água destilada) e 5µl de proteinase K (20mg/ml). Após vigorosa agitação por 20 a 30s (vortex), a mistura foi incubada a 55°C por, no mínimo, três horas. O lisado, contendo o DNA bacteriano total, foi submetido ao método de extração de DNA fenol-clorofórmio, descrito por Sambrook et al. (1989). O DNA total extraído foi dosado por espectrofotometria para quantificação do DNA total da amostra.

2.3.5.2 Primers do PCR multiplex

Os primers utilizados para os diferentes genes de fatores de virulência estão descritos no Quadro 2.

2.3.5.3 PCR multiplex para fator de patogenicidade da *Escherichia coli*

Todos os testes da PCR foram executados em um volume de 10µl, contendo 10ng de DNA bacteriano, 0,2µM de cada dNTP1, 1,5µM de MgCl₂, 0,5µM de cada primer e uma unidade de Taq DNA polimerase¹⁶. Água ultra pura estéril¹⁷ foi usada como controle negativo da PCR e algumas amostras negativas foram submetidas a mais de uma PCR, desta vez usando os primers separadamente, para comprovação da ausência dos genes nessas amostras. O programa de amplificação utilizado foi de 25 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min e 70°C por 2min; extensão final no último ciclo por 10min a 72°C e, finalmente, 4°C. Os produtos da amplificação foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) e corados pela prata.

2.3.6 Exame parasitológico para *Trichuris suis*

Para a detecção dos ovos de *T. suis* nas fezes dos suínos, as amostras foram individualmente examinadas pela técnica de flotação, Willis-Mollay modificado (Hoffmann, 1987). Dois gramas de fezes foram pesados, diluídos e homogeneizados em uma solução hipersaturada de NaCl. Posteriormente, essa solução foi filtrada por duas gases sobrepostas e o filtrado obtido foi colocado em um tubo Falcon de 15 ml até a formação de um menisco. Sobre o menisco acrescentou-se uma lâminula de vidro por 15 min, com cuidado para não formar bolhas. Posteriormente, essa lâminula foi virada sobre uma lâmina de vidro e analisada ao microscópico. A intensidade da infecção foi avaliada de acordo com o número de ovos de parasitas observados; onde, 0 ausente, 1-5 leve, 5-10 moderada e mais de 10 acentuada.

¹⁶ Cenbiot, Taq. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹⁷ Ultra Pura Water, INVITROGEN, São Paulo, SP, Brasil.

2.3.7 Avaliação histológica

Em algumas amostras providas de campo amostras teciduais de intestino foram remetidas junto com as fezes. Essas amostras teciduais foram fixadas em formol tamponado 10%, processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e corados pela técnica histológica de Hematoxilina e Eosina (HE) (Luna, 1968). As lesões histológicas, quando presentes, eram classificadas de acordo com sua intensidade como ausente, leve, moderada ou acentuada (AFIP, 2010).

2.3.8 Imuno-histoquímica

2.3.8.1 *Lawsonia intracellularis*

Fragmentos de intestino; duodeno, jejuno, íleo, colon e ceco foram fixados em formol tamponado 10% e processados para inclusão em parafina. Lâminas silanizadas com secções de 3 µm de cada tecido foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) utilizando a Streptavidina¹⁸ marcada e anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis* na diluição de 1:30.000 (Guedes e Gebhart, 2003). O protocolo da técnica encontra-se detalhado no ANEXO 1.

A marcação positiva foi detectada utilizando-se 3-amino-9-etilcarbazol¹⁹ (AEC). A marcação pela IHQ foi graduada de ausente a acentuada, sendo zero nenhuma marcação para *L. intracellularis*, leve foco único ou múltiplos de marcação antigênica (cerca de 25% das criptas), moderada quando a maioria da mucosa apresenta marcação (26 a 75% das criptas) e acentuada quando quase a totalidade da mucosa intestinal apresenta marcação antigênica (acima de 80% das criptas) (Guedes, 2002).

2.3.8.2 *Brachyspira* sp.

Lâminas silanizadas contendo secções de 3 µm de espessura de vários segmentos do intestino grosso foram submetidas à técnica de IHQ para a identificação de antígenos de bactérias do gênero *Brachyspira* sp.. Foi utilizada a técnica da Streptavidina marcada e anticorpo policlonal

¹⁸ Dako LSAB+ System –HRP Biotinnylated, cat n° K0690, INVITROGEN, Carpinteria, USA.

¹⁹ Dako, Corporation, AEC Substrate-Chromogen, cat n°. K3464, INVITROGEN, Carpinteria, USA.

Quadro 2 – Sequencia alvo de amplificação e tamanho dos produtos amplificados (Produto pb) pelos primers para genes de fatores de virulência de *Escherichia coli*.

Seqüência de <i>primer</i>		Fator	Produto pb
Stb:	Forward 5' – TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT – 3' Reverse 5' – CTC CAG CAG TAC CAT CTC TA– 3'	enterotoxina B	113
StaP:	Forward 5' – CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT –3' Reverse 5' – TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG– 3'	enterotoxina A	158
K99:	Forward 5' – AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA – 3' Reverse 5' – AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT - 3'	fímbria de adesão (bovino e suíno)	230
LT:	Forward 5' – GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT – 3' Reverse 5' – TGG TCT CGG TCA GAT ATG T– 3'	enterotoxina termo-lábil	272
F18:	Forward 5' – TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA – 3' Reverse 5' – ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG – 3'	fímbria de adesão (homem, bovino e suíno)	313
987P:	Forward 5' – GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC – 3' Reverse 5' – AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC –3'	fímbria de adesão (suíno)	409
K88:	Forward 5' – GTA TCT GTC CGA GAA TAT CA - 3' Reverse 5' – GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG – 3'	fímbria de adesão (suíno)	499
F41:	Forward 5' – AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG – 3' Reverse 5' – CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC – 3'	fímbria de adesão (bovino, suíno e ovino)	612
Stx2e	Forward 5' – AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT – 3' Reverse 5' – TCT GAC ATT CTG GTT GAC TC – 3'	Shiga like toxina II (homem, bovino e suíno)	733

Fonte: Modificado de Macedo et al., 2007.

específico para o gênero *Brachyspira* sp. na diluição de 1:75. A marcação positiva foi detectada utilizando-se AEC. A técnica aplicada está descrita com maiores detalhes no ANEXO 2.

A marcação pela IHQ foi graduada em escala de ausente, leve, moderada e acentuada, sendo ausente nenhuma marcação, leve foco isolado ou múltiplos de marcação antigênica, (cerca de 25% do corte), moderada quando a maioria da mucosa apresenta marcação (26 a 75% do corte) e acentuada onde quase a totalidade da mucosa intestinal apresenta marcação antigênica (acima de 80% da mucosa). O anticorpo policlonal para *Bachyspira* sp. foi gentilmente cedido pelo professor David Barcellos da UFRGs, Porto Alegre, Brasil.

2.3.8.3 *Circovírus suíno tipo II (PCV 2)*

Quando eram observadas lesões histológicas sugestivas de infecção por PCV-2 empregava-se a IHQ, utilizando-se um anticorpo policlonal, anti-PCV-2, na diluição de 1:800 (Ciacci-Zanella et al., 2006) de Iowa State University (ANEXO 3).

2.3.9 **Análise estatística**

Para análise estatística, que avaliou a associação entre a presença de patógenos e o tamanho da granja, utilizou-se o teste exato de

Fischer, através do programa SAS²⁰. A prevalência foi calculada de acordo com Noordhuizen et al. (1997) e o intervalo de confiança foi calculado através do programa SAS.

2.4 RESULTADOS

O estudo analisou 46 granjas produtoras de suínos de ciclo completo. Dessas, 31 tinham 101-500 matrizes e 15 tinham mais de 500 matrizes. A amostragem de granjas por estrato e região está demonstrada na Tabela 1. Um total de 512 amostras de fezes foram coletadas e examinadas (Figura 6). A análise estatística pelo teste exato de Fisher não mostrou associação significativa entre a presença de patógenos e o tamanho da granja.

Tabela 1 – Número de propriedades coletadas de cada região relacionada com o número de matrizes.

Número de Matrizes	Região*				Total
	ZM	TMAP	MBH	SSO	
101-500	11	5	8	7	31
>500	7	5	2	1	15
Total	18	10	10	8	46

Zona da Mata (ZM), Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (TMAP), Área Metropolitana de Belo Horizonte (MBH), Sul e Sudoeste (SSO).



Figura 6 – A) Suíno de terminação com diarreia, em uma granja com 101-500 matrizes da região sul e sudoeste de Minas Gerais. B) Presença de fezes diarréicas no piso da baía da granja da figura A. Nessa propriedade foram identificadas amostras de fezes positivas para *L. intracellularis* e casos de coinfeção de *L. intracellularis* com *E. coli* enterotoxigênica e PCV-2.

2.4.1 *Salmonella* spp.

O único sorotipo de *Salmonella enterica* potencialmente patogênico encontrado, foi o Typhimurium. O número de granjas e amostras positivas para *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium foi de 6,52%, com um intervalo de confiança (IC) de 0% a 13,65%, e 31 amostras (6,05%) respectivamente. Uma propriedade com 101-500 matrizes e duas propriedades com mais de 500 matrizes foram positivas para *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. Este sorotipo foi mais prevalente na região MBH seguida pela região da ZM. Nenhuma granja ou amostra positiva para *Salmonella* spp. foi observada na região SSO e TMAP (Tabela 3).

²⁰ SAS Institute, Cary, North Caroline, USA 1999

Sorotipos de *Salmonella enterica* não patogênicos para os suínos foram detectados em sete rebanhos (15,2%). *Salmonella enterica* sorotipo Agona foi observada em duas amostras (0,4%) de um rebanho (2,17%) entre 101 e 500 matrizes na região MBH. A *Salmonella enterica* sorotipo Panama foi diagnosticada em três propriedades (6,52%) e 13 amostras (2,54%). Todas as granjas estavam localizadas na região da ZM, duas delas possuíam 101-500 matrizes e uma tinha mais de 500 matrizes. A *Salmonella enterica* sorotipo Schwarzengrund foi observada em somente um rebanho (2,17%) da região MBH com mais de 500 matrizes, totalizando duas amostras (0,4%). Duas propriedades da região metropolitana (4,34%), uma com 101-500 matrizes e outra com mais de 500 matrizes, apresentaram amostras de *Salmonella enterica* não-tipáveis, sendo que somente uma amostra em cada granja foi detectada (0,4%) (Tabela 2).

2.4.2 *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira hyodysenteriae*

O teste de sensibilidade analítica da PCR multiplex evidenciou que o limite de detecção obtido para a *B. pilosicoli*, tanto na forma de cultura pura como misturada às fezes, foi de 10^3 bactérias por grama de fezes (Figura 7A). Para a *B. hyodysenteriae* e para a *L. intracellularis* o limite de detecção ficou em 10^4 bactérias (Figura 7B e C), tanto na PCR com culturas puras como naquele realizado junto com as fezes. Quando as três bactérias foram misturadas, com e sem fezes, a sensibilidade analítica obtida foi de 10^4 bactérias por grama de fezes (Figura 7D).

Tabela 2 - Distribuição da prevalência encontrada de sorotipos não patogênicos de *Salmonella enterica* no estado de Minas Gerais de acordo com o tamanho do rebanho e região considerando positividade da granja dentre as 46 avaliadas.

Granjas						
PATOGENO	101-500		>500		Total	Prevalência
Região*	nº	%	nº	%	nº	%
S. enterica Agona	1	2,17	0	0	1	2,17
<i>MBH</i>	1	2,17	0	0	1	2,17
S. enterica Panama	2	4,34	1	2,17	3	6,52
<i>ZM</i>	2	4,34	1	2,17	3	6,52
S. enterica Schwarzengroud	0	0	1	2,17	1	2,17
<i>MBH</i>	0	0	1	2,17	1	2,17
S. enterica Não tipável	1	2,17	1	2,17	2	4,34
<i>MBH</i>	1	2,17	1	2,17	2	4,34

* Área Metropolitana de Belo Horizonte (MBH), Zona da Mata (ZM).

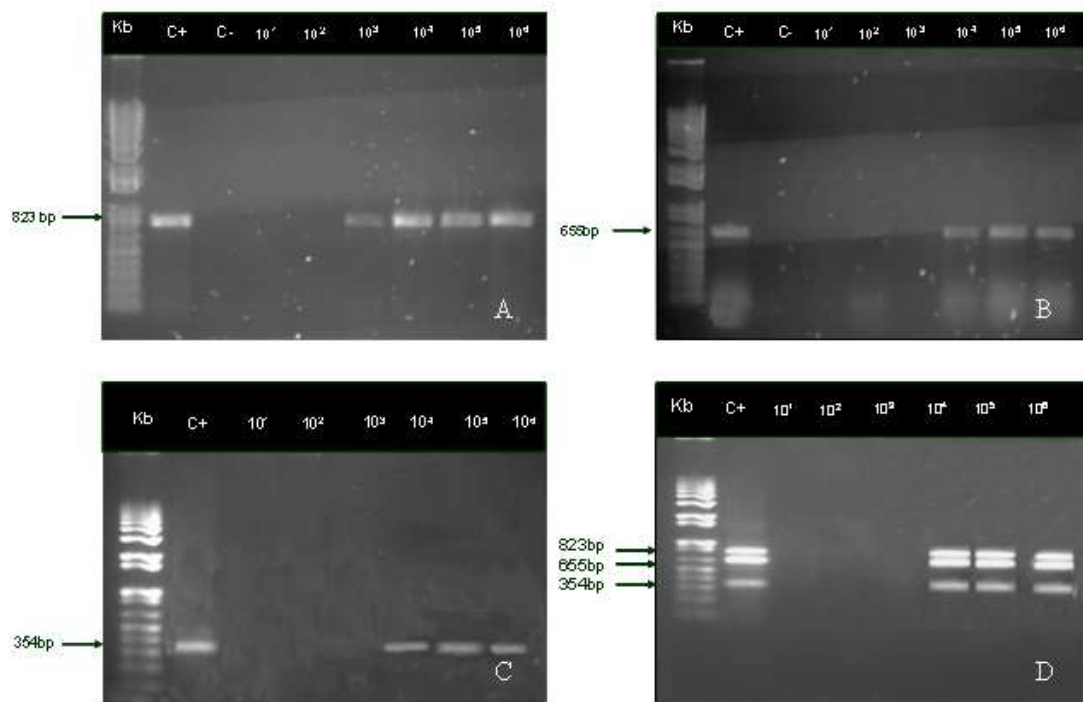


Figura 7 – Gel de agarose a 1%. A) Teste de sensibilidade analítica da *B. pilosicoli*. Kb marcador de pares de base (100pb). Observa-se a detecção da bactéria até a concentração de 10^3 bact/ml. B e C) Resultado do teste de sensibilidade analítica da *L. intracellularis* e da *B. hyodysenteriae*, respectivamente. As bactérias apresentaram sensibilidade de detecção de 10^4 bact/ml. Kb marcador de pares de base (100pb). D) Teste de sensibilidade analítica da PCR multiplex para *B. pilosicoli*, *L. intracellularis* e *B. hyodysenteriae*, observa-se que quando as três bactérias são adicionadas a PCR a sensibilidade analítica é 10^4 bact/ml. Kb marcador de pares de base (100pb)

A *B. hyodysenteriae* e a *B. pilosicoli* não foram detectadas em nenhuma das 46 propriedades analisadas. A *B. pilosicoli* foi diagnosticada somente em casos de infecção mista associada a *L. intracellularis* (Figura 8) e a *S. enterica* sorotipo Thyphimurium. A *L. intracellularis* foi o enteropatógeno mais prevalente em nosso estudo, 19,56% (IC 8,10-31,02%). A *L. intracellularis* foi diagnosticado em 9 rebanhos e foi detectada em 59 amostras (11,52%) das 512 avaliadas. Esta bactéria foi mais prevalente na ZM (8,69%), seguido pelo TMHP (6,52%), e MBH e SSO (2,18%). Dessas 9 granjas, 5 possuíam 101-500 matrizes e quatro mais de 500 (Tabela 3).

2.4.3 *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigênica

O número de amostras e granjas positivas foi de 26 (5,49%) e 5 (10,87%) (IC 1,87-19,87%), respectivamente. Das 512 amostras de fezes coletadas, 473 amostras apresentaram crescimento de colônias lactose positiva em ágar MacConkey. A bactéria *E. coli* enterotoxigênica foi mais prevalente na ZM (6,52%), seguido pelo TMAP e SSO (2,18%). Duas granjas com 101-500 matrizes e três com mais de 500 matrizes apresentaram propriedades positivas para *E. coli* enterotoxigênica (Tabela 3).

O genótipo enterotoxigênico mais observado foi o perfil STAP-Stb-F18 com 8/26 (30,76%) amostras positivas (Figura 9), seguido pelo genótipo STAP-Stb-987P com 6/26 (23,07%) amostras positivas. Outros perfis genéticos encontrados foram: LT-K88, STAP-Stb-K99, Stb-987P-K99, STAP-987P todos com

duas amostras de cada um e K99-LT, Stx2e-987P, LT-K88-Stx2e e 987P-LT, todos com uma amostra positiva detectada (Tabela 4).

2.4.4 *Trichuris suis*

Ovos de *T. suis* não foram diagnosticados em nenhuma das 46 propriedades avaliadas.

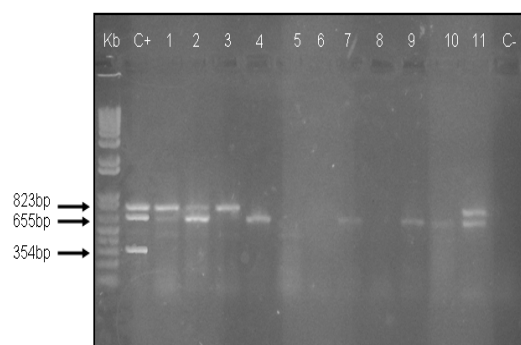


Figura 8 – Gel de agarose a 1%. PCR Multiplex Gel de agarose a 1% mostrando o tamanho dos produtos da PCR de algumas amostras coletadas a campo, *B pilosicoli* 823 pb; *L. intracellularis* 655 pb; *B. hyodysenteriae* 354 pb; Kb, marcador de pares de base (100pb), C+, controle positivo e C-, controle negativo. Linhas 1, 2, 11, infecção mista por *B. pilosicoli* e *L. intracellularis*; 3, *B. pilosicoli*; 4, 7, 9, 10, *L. intracellularis*; 5, 6, 8, amostras negativas.

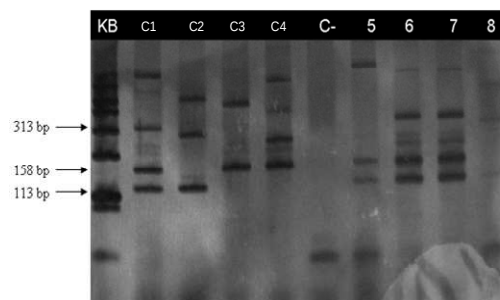


Figura 9 – Gel de poliácridamida a 6%. PCR multiplex dos fatores de virulência para *E. coli* enterotoxigenica. Produtos da PCR de algumas amostras coletadas a campo (linhas 5 a 8). Kb marcador de pares de base (100pb); controle 1 (C1) [STx2e (733 pb) - F18 (313 pb) - StaP (158 pb) -Stb (113 pb)];controle 2 (C2) [K88 (499 pb)- LT (272 pb) - Stb (113pb)]; controle 3 (C3) [987p (409 pb) e-StaP (158 pb)]; controle 4 (C4) [F41 (612 pb)-K99 (230 pb)- StaP (158 pb)]; controle negativo C-; 5, 8 *E. coli* não enterotoxigênica; 6,7, amostras positivas para *E. coli* enterotoxigênica, fimbria F18 (313 pb) e toxinas termo estáveis StaP (158 pb) e Stb (113 pb).

Tabela 3 - Distribuição da prevalência encontrada no estado de Minas Gerais de acordo com o tamanho do rebanho, região e enteropatógeno; *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira pilosicoli*, *E. coli* enterotoxigênica, *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e infecção mista considerando positividade da granja dentre as 46 avaliadas.

PATÓGENO	Granja				Total	Prevalence	IC(95%)	
	101-500		>500				IL(%)	SL(%)
	nº	%	nº	%				
<i>Região</i>					nº	%		
<i>L. intracellularis</i>	5	10,87	4	8,69	9	19,56	8,10	31,02
TMHP ^a	1	2,18	2	4,34	3	6,52		
MBH ^b	1	2,18	0	0	1	2,18		
ZM ^c	2	4,34	2	4,34	4	8,69		
SSW ^d	1	2,18	0	0	1	2,18		
<i>E. coli</i>	2	4,36	3	6,52	5	10,87	1,87	19,87
TMHP ^a	0	0	1	2,18	1	2,18		
ZM ^c	2	4,34	1	2,18	3	6,52		
SSW ^d	0	0	1	2,18	1	2,18		
<i>S. typhimurium</i>	1	2,18	2	4,34	3	6,52	0	13,65
MBH ^b	1	2,18	1	2,18	2	4,34		
ZM ^c	0	0	1	2,18	1	2,18		
<i>S.typhimurium/L.intracellularis</i>	4	8,69	1	2,18	5	10,87	1,87	19,87
TMHP ^a	2	4,34	0	0	2	4,34		
MBH ^b	1	2,18	1	2,18	2	4,34		
ZM ^c	1	2,18	0	0	1	2,18		
<i>L.intracellularis/E. coli</i>	1	2,18	2	4,34	3	6,52	0	13,65
TMHP ^a	0	0	1	2,18	1	2,18		
ZM ^c	0	0	1	2,18	1	2,18		
SSW ^d	1	2,18	0	0	1	2,18		
<i>L.intracellularis/E.coli/S.typhimurium</i>	4	8,69	0	0	4	8,69	0,55	16,83
TMHP ^a	1	2,18	0	0	1	2,18		
MBH ^b	1	2,18	0	0	1	2,18		
ZM ^c	2	4,34	0	0	2	4,34		
<i>B.pilosicoli/L.intracellularis</i>	1	2,18	0	0	1	2,18	0	6,4
MBH ^b	1	2,18	0	0	1	2,18		
<i>B.pilosicoli/L.intracellularis/S.typhimurium</i>	0	0	1	2,18	1	2,18	0	6,4
MBH ^b	0	0	1	2,18	1	2,18		

^a Zona da Mata (ZM), Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (TMAP), Área Metropolitana de Belo Horizonte (MBH), Sul e Sudoeste (SSO), Intervalo de confiança (IC), Limite Inferior (LI), Limite Superior (LS).

Tabela 4 – Distribuição das amostras positivas para *E. coli* enterotoxigênica de acordo com os genótipos observados, região e tamanho das granjas.

Região*	ZM		TMAP		SSO		MBH		Total
Genótipo	101-500	>500	101-500	>500	101-500	>500	101-500	>500	
StaP-Stb-F18	1	3	3		1				8
StaP-Stb-987p		2					4		6
K99-LT	1								1
K88-LT	1					1			2
STx2e-987p	1								1
LT-K88-STx2e	1								1
StaP-Stb-K99				2					2
987p-StaP				1				1	2
987p-LT					1				1
Stb-987p-K99					2				2
Total	5	5	3	3	4	1	-	5	26

* Zona da Mata (ZM), Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (TMAP), Sul e Sudoeste (SSO), Área Metropolitana de Belo Horizonte (MBH).

2.4.5 Infecções Mistas

A prevalência de infecções mistas no estado de Minas Gerais foi alta 30,43%. A infecção mista foi diagnosticada em 14 granjas e foi detectada em 67 (13,08%) amostras. Houve uma maior frequência de infecção múltipla em rebanhos com 101-500 matrizes, 10 no total, em comparação com rebanhos de mais de 500 matrizes, quatro apenas. Nove rebanhos foram positivos para dois agentes (19,56%) e 5 rebanhos foram positivos para três agentes bacterianos (10,87%).

A região MBH teve a maior ocorrência de infecção mista, cinco rebanhos. A coinfeção mais observada foi a da infecção por *L. intracellularis* e *S. enterica* sorotipo Typhimurium, esta compreendeu 5 granjas (10,87% IC 1,87-19,87%) e 28 amostras (5,47%), seguida por *L. intracellularis* associada com *E. coli* enterotoxigênica e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium presente em 4 propriedades (8,69%) e 20 amostras (3,9%) (Tabela 3). A detecção simultânea de *E. coli* enterotoxigênicas e *L. intracellularis* foi diagnosticada em três rebanhos (6,52%) e 12 amostras (2,34%). *B. pilosicoli* tinha detecção concomitante com *L. intracellularis* em um rebanho (2,18%) correspondente a quatro amostras (0,78%) (Fig. 1), e com *L. intracellularis* mais subespécies *Salmonella*

enterica *Salmonella* Typhimurium, um rebanho (2,18%) e três amostras (0,58%) (Tabela 3).

2.4.6 Histopatologia e Imuno-histoquímica

Foram recebidas amostras para histopatologia de somente 13 granjas das 26 granjas, totalizando 28,26% das granjas estudadas. Das 19 amostras que foram processadas, foi possível estabelecer o diagnóstico histológico em 17 casos. Nove amostras provenientes de 5 granjas da região MBH apresentaram lesões histológicas consistentes com infecção por *L. intracellularis*. Microscopicamente, observou-se proliferação multifocal a focalmente extensa das criptas do íleo e do ceco. Havia um grande número de enterócitos jovens com aumento do número de figuras de mitose e ausência de células caliciformes. No interior de algumas criptas havia restos celulares (Figura 10A e 10B). Essa lesão variou de moderada a acentuada nos tecidos corados por HE.

Duas amostras provenientes de duas granjas, uma da região MBH (101-500 matrizes) e a outra da ZM (>500 matrizes), apresentaram lesões sugestivas de infecção por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. Havia necrose da mucosa do íleo, mas essa lesão era mais evidenciada no colon e no ceco, sendo que

nesses segmentos a necrose se estendia até a lâmina própria. Sobre essas áreas havia grande quantidade de restos celulares e fibrina formando uma membrana fibrinonecrótica, com colônias bacterianas basofílicas aderidas (Figura 11A e 11B). Na lâmina própria observou-se grande quantidade de neutrófilos e macrófagos. No ceco de um suíno proveniente de uma granja com 101-500 matrizes da região MBH, havia grande quantidade de bactérias aderidas intimamente na mucosa formando uma lesão denominada de “falso bordo em escova” (Figura 12A), lesão característica de *B. pilosicoli*.

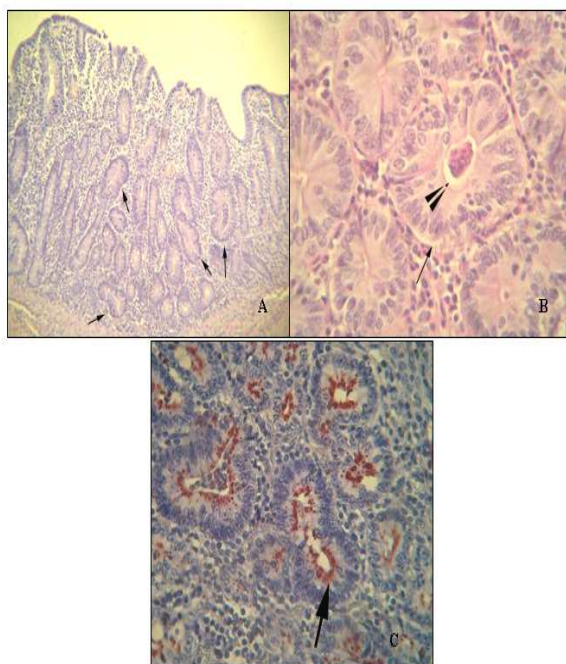


Figura 10 - Lesão histológica de enteropatia proliferativa (*L. intracellularis*). A) Ceco. Observa-se proliferação difusa das criptas intestinais (setas), com espessamento da mucosa, HE, 4X. B) Nas criptas observa-se grande quantidade de enterócitos jovens (seta) com ausência de células caliciformes e restos celulares no lúmen (cabeça de seta), HE, 40X. C) Observa-se marcação positiva (vermelho) para o antígeno da *L. intracellularis*, no ápice do citoplasma dos enterócitos das criptas intestinais (setas), IHQ, 20X.

A marcação de IHQ para *L. intracellularis* evidenciou que o antígeno

concentrava-se no ápice das células epiteliais e apresentava-se disposto paralelamente nas criptas intestinais afetadas (Figura 10C). Marcação positiva também era observada nos enterócitos maduros da mucosa intestinal. A marcação foi leve em três animais, moderada em quatro e acentuada em dois casos. A detecção do antígeno de *Brachyspira* sp. foi evidente nos focos de lesão, onde as bactérias em grande quantidade se alinhavam perpendicularmente a mucosa do intestino (Figura 12B).

Em quatro amostras de tecido intestinal, vindas de três granjas da região MBH (2 com 101-500 matrizes e 1 com >500 matrizes), e em uma amostra vinda de uma granja da região SSO de Minas (101-500 matrizes), observou-se lesões características de circovírus suíno tipo II (PCV-2). Havia enterite granulomatosa caracterizada por macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas na lâmina própria e em alguns casos corpúsculos de inclusão basofílicos intracitoplasmáticos (Figura 13A e 13B). Nas placas de Peyer de todos os quatro animais verificou-se depleção linfóide em áreas interfoliculares e nos centros foliculares e, esporadicamente, presença de células sinciciais dentro de folículos linfóides. Infiltração por histiócitos nas áreas interfoliculares e inclusões intracitoplasmáticas em macrófagos também foram observadas. A marcação IHQ revelou antígenos de PCV-2 no citoplasma de macrófagos, macrófagos epitelióides e células gigantes (Figura 13C). Essa marcação era leve em um animal, moderada em três e acentuada em um suíno.

Das granjas analisadas, positivas para PCV-2 e com síndrome da refugagem, observou-se que em três casos o vírus estava associado a um patógeno entérico. Duas propriedades com 101-500 matrizes uma da região SSO e outra da região MBH apresentavam coinfeção simultânea de PCV-2 com *L. intracellularis*. Em outra granja da região MBH com 101-500 matrizes o PCV-2 estava associado a *S. thymurium*. Na granja com >500 matrizes localizada na região MBH nenhum enteropatógeno associado foi encontrado.

Em duas amostras processadas em HE não foi possível estabelecer o diagnóstico. Essas

amostras de tecidos foram oriundas de uma granja da região da ZM com 101-500 matrizes. As lesões histológicas foram inespecíficas e consistiam de restos celulares no interior das criptas com focos multifocais leves de neutrófilos na lâmina própria. As fezes não

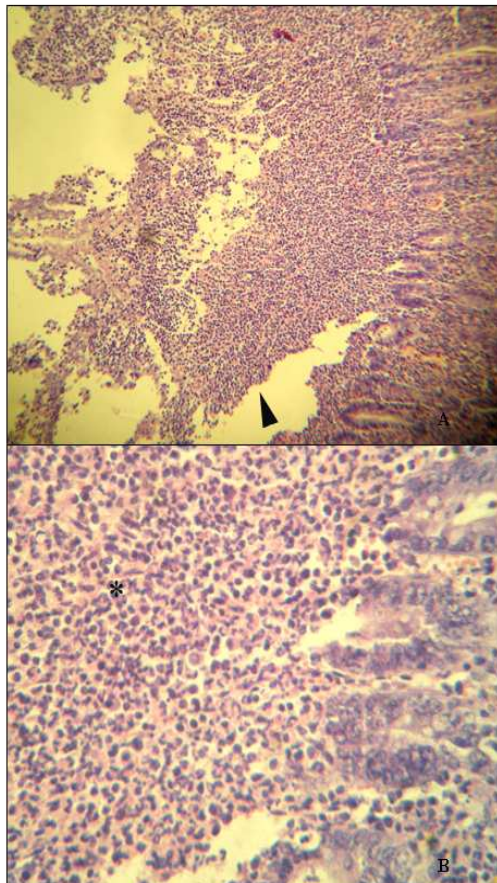


Figura 11 - Lesões histológicas de salmonelose (*S. enterica* sorotipo Typhimurium). A) Cólon necrose da mucosa intestinal com a formação de uma membrana fibrino necrótica (cabeça de seta) sobre a área de lesão, HE, 20X. B) Observa-se com maior detalhe os restos celulares composto em sua maioria por neutrófilos degenerados entremeados à fibrina (asterisco), HE, 40X.

foram positivas para nenhum dos agentes avaliados. Todos os demais diagnósticos histológicos foram comprovados através da PCR e dos exames microbiológicos.

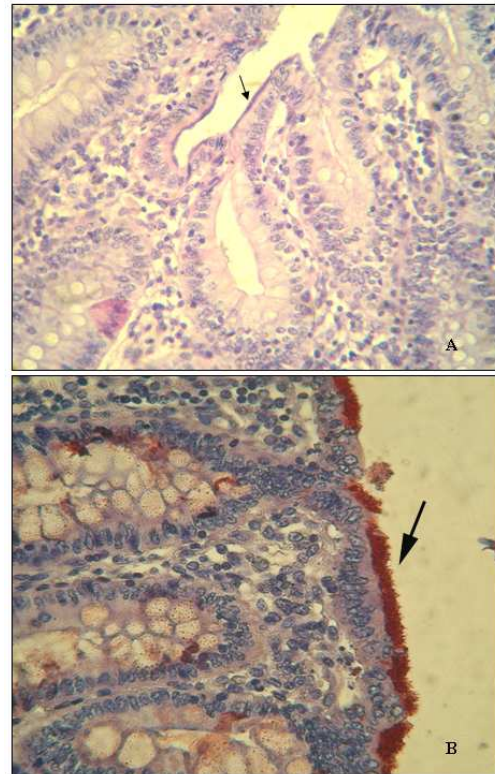


Figura 12 - Lesão histológica de colite espiroquetar (*B. pilosicoli*). A) Observa-se grande quantidade de bactérias aderidas perpendicularmente a mucosa, formando um “falso bordo em escova” (seta), HE, 20X. B) Há marcação imuno-histoquímica positiva (vermelho) nas bactérias aderidas a mucosa intestinal (seta), IHQ, 40X.

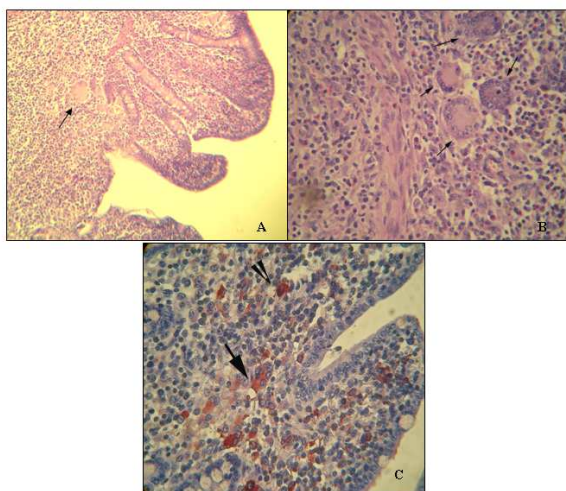


Figura 13 - Lesões histológicas de circovirose (PCV2). A) Enterite granulomatosa difusa acentuada, há grande quantidade de macrófagos, macrófagos epitelióides e células gigantes (seta) na lâmina própria, HE, 20X. B) Observam-se as células do infiltrado granulomatoso em maior detalhe, notar a grande quantidade de células gigantes (setas), HE, 40X. C) Marcação imuno-histoquímica positiva para PCV-2, no interior dos macrófagos (cabeça de seta) e células gigantes na lâmina própria (seta), IHQ, 40X.

2.5 DISCUSSÃO

A situação sanitária global do rebanho suíno brasileiro é boa quando comparada à situação dos maiores países produtores de suínos. A evidência disso está nos índices produtivos alcançados pelos nossos rebanhos tecnificados, que são iguais ou superiores à de outros países onde a suinocultura é desenvolvida (ABIEPCS, 2008; Mores, 1994). Infelizmente, no Brasil, com exceção das Granjas de Reprodutores Suídeos (GRSC) e de algumas das doenças listadas pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), os estudos epidemiológicos para muitas das doenças de ocorrência enzoótica, ainda são escassos.

As doenças entéricas têm sido identificadas com alta frequência na suinocultura tecnificada, não só no Brasil, mas em todo mundo, representando importante fator

de desuniformidade e desequilíbrio nos indicadores de produtividade desta atividade. Estas patologias são muito prevalentes na suinocultura devido ao confinamento total, sendo que diagnóstico e controle são um constante desafio, devido à participação de vários fatores de vários fatores infecciosos e não infecciosos, na etiopatogenia, agindo de maneira sinérgica ou somatória contribuindo para instalação do quadro patológico e aumentando seu impacto (Mores, 1994).

Geralmente, os estudos sobre doenças entéricas se concentraram em um patógeno específico (Fellström et al., 1996), diminuindo as chances de um diagnóstico correto dos problemas sanitários que afetam o rebanho. Têm-se relatos que os surtos de *L. intracellularis* e *Brachyspira* spp. ocorrem mais frequentemente em grandes unidades de produção (Holyoake et al., 1994), isto é, parece existir uma associação entre o tamanho do rebanho e a presença do patógeno. No entanto, os resultados deste estudo não demonstraram essa relação, já que não houve diferença estatística entre a presença dos enteropatógenos e o tamanho das granjas avaliadas.

A prevalência de rebanhos infectados por *L. intracellularis* foi de 19,56% (8,10 – 31,02%). Esse resultado está de acordo com o relatado em outros países, onde a prevalência de *L. intracellularis* variou de 15% a 93,7% (Thomson et al., 1998; Stege et al., 2000; Jensen et al., 2006; Biksi et al., 2007). Esse resultado de prevalência também concorda com outros estudos brasileiros. Moreno et al. (2002) e Bacarro et al. (2003) relataram 15% de amostras fecais positivas (146/971 em idades variando de 35 a 180 dias de idade) e 30% de granjas infectadas (203 granjas provenientes de sete regiões produtoras de suínos no Brasil) por *L. intracellularis*, respectivamente. A diferença entre as prevalências observadas pode ser explicada por variações regionais, diferenças no sistema de criação de suínos, uso de antibióticos, população amostrada (doentes ou animais saudáveis) e técnicas de diagnóstico utilizadas.

Utilizando diferentes técnicas de detecção (isolamento bacteriano e PCR), a

prevalência de *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae* já foi estimada em várias regiões do globo. Em um estudo dinamarquês, a *B. pilosicoli* foi isolada de 19% de 79 rebanhos avaliados e a *B. hyodysenteriae* estava presente em 2,5% dessas granjas (Stege et al, 2000). Em uma pesquisa realizada no Reino Unido entre 1992 e 1996, envolvendo 85 propriedades de suínos, a *B. pilosicoli* foi identificada em 21 granjas (25%) e a *B. hyodysenteriae* em 6 (7%) (Thomson et al., 1998). Um estudo recente da Suécia revelou a presença de *B. pilosicoli* em 34 rebanhos de 105 estudados e a ausência de *B. hyodysenteriae* nos rebanhos avaliados. Nesse mesmo trabalho, a presença da *B. pilosicoli* estava significativamente associada com rebanhos de terminação de baixo desempenho (Jacobson et al., 2005). Em nosso estudo nenhuma amostra positiva de *B. hyodysenteriae* foi detectada e a presença de *B. pilosicoli* estava sempre associada a outros agentes entéricos (infecções mistas) e em poucas propriedades. Esta baixa prevalência pode ser explicada pelo uso de aditivos na alimentação. Têm-se relatos de que a ocorrência de *Brachyspira* sp. pode ser subestimada devido ao uso de promotores de crescimento na ração (Hampson, 2000) o que pode explicar o resultado observado. Dessa forma, podemos inferir que os altos valores de prevalência observados na Europa, estão diretamente relacionados com a não utilização de promotores de crescimento e antibióticos na alimentação dos suínos. Em um estudo realizado no Brasil por Barcellos et al. (2003), 38 propriedades foram examinadas (22 com rações medicadas e 16 com ração não medicada), *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* foram detectadas respectivamente em 0% e 6,25% das granjas medicadas e de 31,8% e 45,5% em granjas não medicadas.

Sabe-se, que o isolamento bacteriano para *Brachyspira* sp. apresenta uma maior sensibilidade de diagnóstico do que a técnica da PCR (Komarek et al., 2009), o que também pode explicar os baixos valores observados nesse estudo. Além disso, variações relacionadas às técnicas da PCR podem ser observadas, o que pode interferir nos resultados dos exames. Demonstrou-se que mudanças, como a utilização de *pool* de amostras ou simplesmente a troca de protocolos de extração de DNA pode interferir negativamente com a sensibilidade do teste (Chiriboga et al., 1999),

resultando em falsos negativos. O limite de detecção da PCR multiplex quando se associava as três bactérias foi de 10^4 bactérias por grama de fezes. Estes níveis de detecção são consistentes com outros já relatados anteriormente (Jones et al., 1993; Møller et al., 1998; La et al., 2003). A inibição da PCR, por sais biliares presentes nas fezes, também é um problema para o diagnóstico de amostras fecais preparadas diretamente para PCR. Portanto a inibição pode ser um problema na detecção de amostras positivas tanto de portadores clínicos como subclínicos (Jacobson et al., 2004). Mas, acredita-se que o *kit* de extração utilizado em nosso estudo tenha eliminado essa variante.

A prevalência total de *S. enterica* sorotipo Typhimurium (6,52%) e dos demais sorotipos de *S. enterica* (15,2%) encontrados foi elevada quando comparada à resultados de outros países como a Dinamarca (10,1%) e Reino Unido (13%) (Thomson et al., 1998; Stege et al, 2000). Essa variação na prevalência pode ser causada por diferenças de manejo principalmente no que se diz respeito a programas de limpeza e desinfecção das instalações, presença de portadores assintomáticos, qualidade da matéria prima para rações, qualidade da água, além da presença de possíveis vetores nas granjas como roedores e pássaros que podem afetar o grau de transmissão (Hampson, 2000). A *Salmonella* spp. foi diagnosticada na ZM e região MBH. Acredita-se que a maior densidade de suínos nessas áreas associado a presença de instalações mais antigas tenha contribuído para o surgimento de tais valores. A *S. enterica* sorotipo Typhimurium pode causar diarreia em suínos, mas, o mais importante é que a *Salmonella* spp. é um agente zoonótico (Weneger e Bager, 1997; Stege et al., 2000).

A *Salmonella* spp. tem um papel importante na contaminação da carne suína e seus derivados o que pode causar graves doenças no homem (Weiss et al., 1999). Em estudos realizados pelo setor de Medicina Veterinária da UFRGS, no Rio Grande do Sul encontrou-se 55,6% dos suínos portadores de *Salmonella* sp. em amostras de fezes e linfonodos mesentéricos colhidos ao abate (Bessa et al., 2004). Estudos posteriores demonstraram que 88% das amostras de massa de embutidos (Castagna et al., 2004) e 50% de

cortes de pernil produzidos em frigoríficos onde a prevalência de animais portadores era elevada, tinham a presença de *Salmonella* sp. (Bandeira et al., 2003). Devido à importância sanitária desse agente, nos últimos anos a Europa vem implementando programas de redução na carga infectante de *Salmonella* sp. nos rebanhos suínos, e têm alcançado grande êxito principalmente na Dinamarca (Schuwart, 2006).

E. coli patogênica foi previamente identificada em 49 de 54 rebanhos de suínos de baixo desempenho (Jacobson et al., 2003). Møller et al. (1998) observaram que de 72 granjas, 76,8% estavam infectadas por *E. coli* hemolítica. Stege et al. (2000) demonstraram que 24,1% dos rebanhos dinamarqueses eram positivos para *E. coli* patogênica. Apesar de todos esses resultados, a importância da presença de *E. coli* enteropatogênica em rebanhos de recria e terminação ainda não está bem esclarecida. Recentemente Pitman (2010), descreveu uma apresentação atípica de enterite provocada pela *E. coli* enterotoxigênica F18 e Stx2e, em suínos de onze semanas de idade.

A *E. coli* enterotoxigênica está associada a danos nas vilosidades intestinais, perda do epitélio das vilosidades e diarreia em leitões lactentes ou recém desmamados (Macedo et al., 2007). Entretanto, em suínos de recria e terminação este patógeno entérico pode alterar o equilíbrio ecológico da microbiota intestinal mudando as condições do ambiente intestinal, que pode favorecer algumas bactérias (Jacobson et al., 2003). Normalmente, os rebanhos positivos para *E. coli* enterotoxigênica possuem histórico de diarreia pós-desmame, isso pode ser um indicativo de alta pressão de infecção de enteropatógenos nas granjas avaliadas, ou que a diarreia pós-desmame podem predispor a outras doenças entéricas (Møller et al. 1998, Thomson et al., 1998; Stege et al., 2000; Jacobson et al., 2005). Das 512 amostras testadas, 39 não apresentaram crescimento de colônias Lactose +, acredita-se que o uso excessivo de antibióticos na fase de recria e terminação, pode ter inibido o crescimento dessas bactérias em ágar MacConkey.

Interações entre patógenos entéricos são comuns e normalmente ocorrem em rebanhos que têm ou tinham histórico de

diarreia grave, com morte de suínos, que nesses casos, apresentam lesões intestinais acentuadas (Jacobson et al., 2005; Suh e Song, 2005). As infecções mistas foram observadas em 30,43% das granjas estudadas, e a principal associação observada foi de *S. typhimurium* com *L.intracellularis* e *S. typhimurium/L.intracellularis* e *E. coli* enterotoxigênica. Esta associação foi relatada por Suh e Song (2005) que encontraram 2,2% das 462 amostras positivas para *Salmonella* spp e *L. intracellularis*. Outras associações já foram relatadas na Suécia, 58% das 320 amostras fecais eram infectadas concomitante por *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* (Jacobson et al., 2005). Thomson et al. (1998) relataram a ocorrência de infecção mista por *B. pilosicoli* e *L. intracellularis*, *B pilosicoli* e *Salmonella* spp. e *B. pilosicoli* e *E. coli* enteropatogênica em 7%, 4,7% e 3,52%, respectivamente.

O parasita *T. suis* já relatado como comum na indústria de suínos (Batte et al., 1977), não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Em um estudo Dinamarquês recente realizado em 79 propriedades, os ovos de *Trichuris suis* foram identificados em somente 3 granjas refletindo a baixa ocorrência desse agente (Haugegaard, 2009). O controle parasitário melhorado dos últimos anos, associado com a modernização tecnológica da indústria de suínos, tornaram os helmintos entéricos raros no rebanho suinícola nacional. Além disso, a doença ocorre mais frequentemente em granjas onde os animais são criados soltos, ou quando estes, em alguma das fases de criação têm acesso a terra (Sobestiansky e Barcellos, 2007), o que não ocorria nas granjas avaliadas neste estudo. Sabe-se que os ovos são eliminados com as fezes e se tornam infectantes ainda no estágio L1, e embora muito sensíveis a dessecação, sua viabilidade, sob condições ambientais favoráveis, pode ser bastante longa, podendo chegar até a seis anos (Burden et al., 1987).

A histopatologia apesar de pouco utilizada neste estudo apresentou resultados condizentes com aqueles observados nas técnicas de cultivo e diagnóstico molecular, o que demonstra a eficiência dessa ferramenta de diagnóstico. O exame anatomopatológico é de baixo custo quando comparado a outras técnicas, e a análise detalhada das lesões

observadas na microscopia, aliada a informações clínicas podem definir um diagnóstico. Das granjas analisadas, positivas para PCV-2, observou-se que em três casos o vírus estava associado a um patógeno entérico, *L. intracellularis* ou *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. Cita-se que apesar da acentuação das lesões intestinais, a presença de PCV-2 juntamente com outros agentes como *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *L. intracellularis*, não causa maiores perdas produtivas do que aquelas causadas pelas infecções isoladas desses agentes (Opriessnig et al., 2008).

2.6. CONCLUSÕES

(1) Os agentes enteropatogênicos causadores de diarreia estão presentes nos rebanhos de recria e terminação do estado de Minas Gerais. (2) A *B. hyodysenteria* e *T suis* não estão presentes nos rebanhos mineiros. (3) As infecções mistas são muito frequentes em nosso sistema de produção de suínos de recria e terminação. Os enteropatógenos *L. intracellularis* e *S. typhimurium* foram os principais patógenos causadores de infecção mista em suínos de recria e terminação no estado de Minas Gerais. (4) A *L. intracellularis* é o agente entérico mais observado nos casos de infecção simples. (5) A *B. pilosicoli* apresenta uma baixa prevalência e sua ocorrência, no nosso estudo, está associada a casos de infecção mista.

3. Capítulo 3:

Desenvolvimento de modelo experimental murino para enteropatia proliferativa (*Lawsonia intracellularis*), utilizando homogeneizado de mucosa intestinal e cultura pura

3.1 RESUMO

A susceptibilidade a infecção por *L. intracellularis* em quatro diferentes linhagens de camundongos (Swiss, BALB/c, C-57 Black 6 e DB-A) foi estudada. Cento e sessenta camundongos (n = 40, por linhagem) foram inoculados por via gástrica. De cada linhagem, 16 animais receberam homogeneizado de

mucosa de suínos infectados por *L. intracellularis*, 16 receberam cultura pura de *L. intracellularis* (PHE/MN00-1) e oito animais receberam placebo. Dois animais do grupo controle e quatro camundongos de cada grupo foram eutanaziados nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-inoculação. Fragmentos de intestino foram coletados para análise histológica e imuno-histoquímica (IHQ) e “pool” de fezes de cada grupo foi coletado para a realização da *Nested* PCR para *L. intracellularis*. Dois camundongos da linhagem DB-A exibiram lesões macroscópicas de enteropatia proliferativa (EP) no 14 dia pós-inoculação. Todas as linhagens de camundongos avaliadas apresentavam lesões histológicas de EP e IHC positiva, que variava de acordo com a intensidade da lesão. As lesões foram mais acentuadas especialmente naqueles animais inoculados com cultura pura. As lesões mais graves foram observadas em camundongos DB-A e Swiss. A eliminação nas fezes de *L. intracellularis* foi observada em todas as linhagens com algumas variações. Apesar de todas as linhagens de camundongos utilizadas serem susceptíveis a infecção, existiram diferenças entre elas no estabelecimento das lesões.

Palavras-chave: *Lawsonia intracellularis*, modelo experimental, camundongo, DB-A, BALB/c, Swiss, C-57 Black 6.

3.2 INTRODUÇÃO

A *L. intracellularis* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória causadora da enteropatia proliferativa (EP) em suínos e em muitas outras espécies animais (McOrist et al., 1995; Gebhart e Guedes 2004; Kroll et al., 2005). A EP é caracterizada macroscopicamente por espessamento da mucosa intestinal e histopatologicamente pela hiperplasia das criptas intestinais, principalmente no íleo, mas também no ceco e cólon (Lawson e Gebhart, 2000).

A EP é a principal causa de perdas na indústria suína em todo o mundo (Jacobson et al., 2009). Estas perdas são representadas por diminuição do ganho de peso, diarreia em suínos cronicamente afetados, mortalidade de jovens adultos e de cevados próximo a idade de abate. O diagnóstico da infecção por *L.*

intracellularis é baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de fezes ou de fragmentos intestinais, teste de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA ou IPMA no soro, e por hibridização *in situ*, histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) nas amostras de tecidos fixados em formalina (Boye et al, 1998).

Pouco se sabe sobre a epidemiologia dessa doença. São conhecidos somente alguns poucos fatores da bactéria e do hospedeiro que contribuem para o estabelecimento da EP (Guedes e Gebhart, 2002b, Friedman et al., 2008). A presença de animais subclínicamente infectados, eliminando *L. intracellularis* nas fezes, levam a contaminação das instalações e transmissão para animais susceptíveis (Guedes, 2003). Entretanto a ocorrência de surtos de EP em granjas nunca antes povoadas e que receberam animais de reposição de granjas sem história clínica da doença têm sido observada. Desta forma, surgem suspeitas com relação a possível existência de vetores biológicos ou mecânicos (Guedes, 2002).

A EP tem sido descrita em hamsters, furões, coelhos, raposas, cães, cavalos, cobiças, primatas, ovelhas e cabritos (Kroll et al., 2005). Há relatos da doença em aves, como o Emu (*Dromaius novaehollandiae*) (Lemarchand et al. 1997), avestruz (*Struthio camelus*) (Cooper et al. 1997) e “Brewer’s Blackbird” (*Euphagus cyanocephalus*) (Pusterla et al., 2008). Ratos e camundongos representam um reservatório em potencial, sobretudo para os suínos, onde o ambiente é particularmente coabitado por roedores (Pusterla et al., 2008).

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). A bactéria pode ser eliminada nas fezes por um período de até 3 meses em alguns animais (Guedes et al., 2002b; Guedes e Gebhart, 2003a) e pode sobreviver nas fezes por até 2 semanas em temperatura ambiente (Collins et al. 2000). De acordo com Collins et al. (2001), um número reduzido de bactérias é suficiente para infectar animais susceptíveis. Cerca de 10^3 organismos de *L. intracellularis* contidas no

inóculo foi capaz de provocar a infecção em leitões. Além disso, é resistente a peroxidomonossulfato de potássio e misturas fenólicas nas concentrações de 1% e 0,33%, respectivamente (Guedes, 2008). Por esses motivos, estudos sorológicos de prevalência da enfermidade vêm mostrando índices entre 60 e 90% de rebanhos positivos em diferentes países (Lawson e Gebhart, 2000).

A susceptibilidade a infecção de camundongos de laboratório pela *L. intracellularis* foi comprovada experimentalmente (Smith et al, 2000). Entretanto, a ocorrência de lesões de EP variou entre as diferentes linhagens de camundongos. Camundongos A/J (Murakata et al., 2007), C-57 Black 6, BALB/c (Go et al., 2005, Colins et al., 1999) e ICR (Go et al., 2005) demonstram como não susceptíveis a infecção por *L. intracellularis*. Já outros autores relatam as linhagens BALB/c, C3H/HeJ, ICR e C-57 Black 6 como susceptíveis a infecção (Murakata et al., 2008).

Friedman et al. (2008) demonstrou que roedores capturados em granjas de suínos, positivas para *L. intracellularis*, ou nas suas adjacências, apresentavam bactérias nas fezes ou eram sorologicamente positivos, indicando infecção natural. Dentre as espécies analisadas, o camundongo foi o que apresentou maior número de amostras positivas, sendo essa espécie presente em todas as granjas analisadas.

Em um dos primeiros relatos de infecção experimental de *L. intracellularis* em ratos e camundongos observou-se que os ratos apresentam um quadro de infecção intestinal transiente e diminuto, sendo que das duas linhagens analisadas, Wistar e Sprague Dawley somente um animal da linhagem Wistar apresentou lesões leves de EP, ou seja, menos de 5% das criptas afetadas (Collins et al, 1999). Entretanto, é interessante notar que os estudos *in vitro* realizados para avaliar a penetração da *L. intracellularis* nas células intestinais, são realizados na sua maioria em células epiteliais do intestino delgado de ratos (IEC-18) (Lawson et al., 1995). Das três linhagens comerciais de camundongos testadas com cultura pura, BALB/c, C-57 Black 6 e A129 somente a linhagem A129 apresentou lesões histológicas

sugestivas de EP e essas lesões foram detectadas na segunda semana após a inoculação (Collins et al, 1999).

Murakata et al. (2008) demonstrou que há diferenças no que diz respeito ao estabelecimento de lesões de EP em camundongos de acordo com o tipo de inóculo utilizado. O experimento demonstrou que os camundongos inoculados com homogeneizado de mucosa intestinal extraída de coelhos afetados apresentavam lesões mais graves do que aqueles inoculados com homogeneizado de mucosa intestinal de suínos. Portanto, a susceptibilidade de camundongos parece estar relacionada à linhagem dos animais e ao tipo de inóculo utilizado. Suínos infectados com cultura pura ou homogeneizado de mucosa não apresentam diferenças no estabelecimento das lesões de EP (Guedes e Gebhart, 2003a).

Neste contexto, esse trabalho tem como objetivo avaliar o desenvolvimento das lesões de enteropatia proliferativa em quatro linhagens de camundongos, Swiss, BALB/C, C-57 Black 6 e DB/A2 a partir da inoculação experimental de cultura pura de *L. intracellularis* e homogeneizado de mucosa intestinal de suínos infectados e avaliar a eliminação de *L. intracellularis* nas fezes desses animais.

3.3 MATERIAL E METÓDOS

3.3.1 Camundongos

Foram utilizados quarenta camundongos de cada uma das quatro linhagens analisadas (BALB/c, C-57 Black 6, DB/A2 e Swiss) totalizando 160 animais, todos machos de 3-4 semanas de idade, pesando $13,6g \pm 2,341g$, e provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Todos os camundongos foram alojados em gaiolas de plástico, com oito animais cada, recebendo alimentação e água *ad libitum* e iluminação controlada. Os animais foram aclimatados por uma semana antes da realização do experimento. O experimento foi conduzido em conformidade com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA), processo número 162/2008.

3.3.2 Inóculos

3.3.2.1 Cultura pura de *L. intracellularis*

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) cultivadas em meio Eagle modificado Dulbecco's com 1% de L-glutamina e 5% de SFB, sem antibióticos, à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, foi infectada com a suspensão de *L. intracellularis*, cepa PHE/MN1-00 (ATCC PTA-3457). A monocamada infectada foi tratada com cloreto de potássio a 0,1% e depois recuperada por raspagem das garrafas de cultivo celular. Após o rompimento das células, o sobrenadante era utilizado para infectar novas células McCoy. O nível de infecção era calculado antes de cada passagem através da técnica de imunoperoxidase indireta. Na nona passagem, quando as células apresentavam-se altamente infectadas, entre seis e sete dias de infecção, o cultivo era então 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 destruídas pela raspagem foram misturadas, homogeneizadas por 15s e centrifugadas por 20 minutos a $3.400 \times g$, para formação de um precipitado de *L. intracellularis*. Esse material foi ressuspensionado em solução de sacarose fosfato glutamato (SPG) com 5% de SFB. A suspensão foi aliquoteada em tubos criogênicos de 3,6 mL e armazenada a -80°C, até a inoculação.

3.3.2.2 Homogeneizado de mucosa

Para inoculação dos camundongos, utilizaram-se segmentos intestinais de suínos 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 homogenizador por cerca de um minuto (Winkelman e Tasker, 2002). Esse material foi submetido à avaliação bacteriológica para *Salmonella* spp. e

parasitológica (como descrito no Cap. 2), que asseguraram a ausência de outros patógenos relevantes (*Salmonella* spp. e *E. coli* enterotoxigênica).

3.3.3 Quantificação do inóculo

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

3.3.4 Bioensaio em Hamster

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. As lesões de EP foram confirmadas através das lesões histopatológicas e IHQ.

3.3.5 Delineamento experimental

De cada uma das quatro linhagens de camundongos, 16 animais foram inoculados com 0,5 ml de cultura pura de *L. intracellulares* (cepa PHE/MN00-1) contendo $7,75 \times 10^7$ bactérias por ml, 16 com 0,5 ml de homogeneizado de mucosa intestinal de suínos contendo $8,9 \times 10^8$ bactérias por ml (Figura 14) e oito com água destilada estéril (controle), utilizando uma agulha intragástrica (agulha de gavage). Quatro animais de cada grupo de camundongos infectados e dois do grupo controle foram eutanasiados para exame anatomopatológico nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-

infecção. Antes da eutanásia as caixas eram forradas e os camundongos foram mantidos por um período de duas horas. Após esse período um *pool* de amostras fecais foi coletado de cada caixa e armazenado a menos 20°C para análise posterior.



Figura 14 – Inoculação intragástrica, utilizando agulha de gavage, de um camundongo da linhagem Swiss com homogeneizado de mucosa contendo *Lawsonia intracellularis*.

3.3.6 Histotologia e Imuno-histoquímica

Fragmentos do intestino (duodeno, jejuno, íleo, ceco, colon e reto) foram fixados em formol tamponado a 10%, embebidos em parafina, e seccionados a uma espessura de 5µm. Um dos cortes foi corado com HE e o outro foi submetido a imuno-histoquímica. Lâminas silanizadas com secções de 3 µm de cada tecido foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) utilizando a Streptavidina²¹ marcada e anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis* na diluição de 1:30.000 (Guedes e Gebhart, 2003) (ANEXO 1). A marcação positiva foi detectada utilizando-se 3-amino-9-etilcarbazol²² (AEC). As lesões histológicas foram graduadas de acordo com a intensidade: 0, nenhum; 1 leve, 2, moderado; e 3, acentuado. Um sistema idêntico de graduação foi utilizado para avaliar o grau de

²¹ Dako LSAB+ System –HRP Biotinnylated, cat n° K0690, INVITROGEN, Carpinteria, USA.

²² Dako, Corporation, AEC Substrate-Chromogen, cat n°. K3464, INVITROGEN, Carpinteria, USA.

imunomarcção do antígeno de *L. intracellularis*.

3.3.7 Detecção de *L. intracellularis* nas fezes dos camundongos

3.3.7.1 Extração de DNA

A extração de DNA de amostras fecais foi realizada de acordo com Boom et al. (1990) utilizando-se pedra diatomácea. Resumidamente, 0,2 g de fezes eram pesadas e incubadas em solução de lise por 15 min, centrifugadas a 14.000g por 2 min, seguido por 10 min de incubação com solução de pedra diatomácea²³. Posteriormente, a solução foi centrifugada (14.000g por 2 min) novamente e o sedimento obtido foi lavado com solução de lavagem (duas vezes), etanol PA(2 vezes), e acetona PA (1 vez) sendo seco a 56°C por 10 min. O DNA extraído foi resuspenso em água miliQ estéril e estocado a -20°C.

3.3.7.2 Pares de Primers Nested PCR

As seguintes seqüências de *primers* foram utilizadas para a detecção do DNA da *L. intracellularis* através da *Nested PCR*: LIA FWD(5' – TATGGCTGTCAAACACTCCG – 3'), LIB (5' – TGAAGGTATTGGTATTCTCC – 3'), LIC (5' – TTACAGGTGAAGTTATTGGG – 3') e LID REV (5' – CTTTCTCATGTCCCATAAGC – 3'). Os *primers* externos LIA e LIB amplificam um fragmento de 319 pb, enquanto que os *primers* internos LIC e LID amplificam um fragmento com 270 pb (Jones et al., 1993)

3.3.7.3 Nested PCR

A *Nested PCR* foi executada com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção do DNA de *L. intracellularis* nas fezes. A técnica foi realizada de acordo com Friedman et al. (2008). As reações foram executadas em 25 µl de volume total, utilizando-se no tampão da PCR [10mmol l⁻¹ de Tris HCl (pH 8,3), 50 mmol l⁻¹ de KCl e 1,5 mmol l⁻¹ de MgCl₂], 0,2 mmol l⁻¹ de dNTP e 1

U de Taq DNA Polimerase²⁴. Um microlitro (1 µl) do DNA extraído foi acrescentado à reação. A primeira amplificação foi realizada com 35 ciclos, sendo que cada ciclo consistia de 94°C por 40 s, 55°C por 40 s e 72°C por 40 s. A segunda amplificação foi executada utilizando-se 2,5 µl do produto da primeira PCR como *template*, em um volume total de 25 µl de solução, sob as mesmas condições de concentração e temperatura. Os dois pares de primers foram acrescentados à reação numa concentração de 1pmol µl⁻¹. Amostras de controle negativo foram adicionadas a todas as reações. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

3.3.8 Análise Estatística

Para análise estatística utilizou-se o teste exato de Fischer, através do programa SAS²⁵.

3.4 RESULTADOS

Com relação ao bioensaio realizado em Hamsters 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, comprovando a patogenicidade do inóculo. Nenhum sinal de infecção por *L. intracellularis* foi observado nos animais controle.

Não foi observada diarreia ou outros sinais clínicos nos camundongos inoculados com homogeneizado de mucosa, cultura pura ou nos animais inoculados com placebo. Macroscopicamente, somente dois camundongos da linhagem DB-A, inoculados com cultura pura, apresentaram lesões sugestivas de EP caracterizadas por um espessamento das alças intestinais do ceco e do íleo no 14º dia pós infecção (Figura 15). Nenhum dos camundongos do grupo controle apresentou qualquer alteração histológica ou

²³ Sigma-Aldrich, Diatomaceous earth, St Louis, MO, EUA.

²⁴ Cenbiot, Taq. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil.

²⁵ SAS Institute, Cary, North Caroline, USA 1999

imuno-histoquímica e todos foram negativos na PCR.

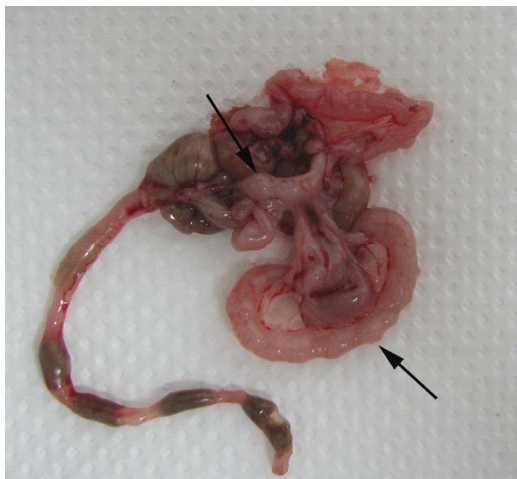


Figura 15 – Lesão macroscópica de *L. intracellularis* (Enteropatia Proliferativa) em um camundongo da linhagem DB-A 14 dias após a inoculação. Observa-se espessamento da alça intestinal (Íleo) com rugosidade acentuada na serosa (setas).

3.4.1 Histopatologia e IHQ

Todas as linhagens de camundongos analisadas apresentaram lesões histopatológicas sugestivas de infecção por *L. intracellularis*, mas a gravidade das lesões variou de acordo com a linhagem do camundongo, tipo de inóculo utilizado e do período pós-inoculação. As principais lesões histológicas observadas consistiam de proliferação (hiperplasia) multifocal de células epiteliais das criptas de Lieberkühn no intestino delgado e glândulas mucosas do intestino grosso essa lesão variava de leve a acentuada e predominando no íleo e no ceco. No ápice de algumas vilosidades intestinais, observou-se uma proliferação focal de células epiteliais, essas células possuíam um citoplasma amplo e abundante. Esta lesão foi comumente observada no 7º dia pós-inoculação. As criptas intestinais estavam alongadas e hiperplásicas, havia grande quantidade de enterócitos imaturos e ausência de células caliciformes. Esta lesão foi observada em

criptas isoladas ou em grandes segmentos do intestino grosso e/ou delgado, especialmente, naqueles animais que foram inoculados com cultura pura e menos frequentemente nos animais inoculados com homogeneizado de mucosa. Não foi observada reação inflamatória no intestino dos camundongos inoculados com *L. intracellularis*.

Os camundongos da linhagem Swiss apresentaram lesões leves no 7 dia pós-inoculação (Figura 16A) e lesões graves em 14 dia pós infecção (Figura 16B) e nenhuma alteração foi detectada após este período. Camundongos BALB/C apresentaram lesões leves no dia 7 e no dia 14 pós infecção. As alterações proliferativas eram mais frequentes nas criptas localizadas próximas as placas de Peyer do ceco. A linhagem dos camundongos C-57 Black 6 demonstrou lesões histológicas leves até no 21 dia após inoculação. Sendo que essas foram mais facilmente detectadas no 14 dia pós inoculação (Figura 17A), onde todos os animais inoculados com cultura pura analisados apresentavam lesões. Os camundongos DB-A apresentaram lesões até o último dia do experimento (28 dias pós infecção). As lesões nessa linhagem foram mais intensas nos dias 14 e 21 pós-inoculação (Figura 18A e 18B). Nos dias 7 e 28 pós-inoculação as lesões eram leves e observadas em criptas isoladas (Tabela 4).

Marcação IHQ positiva foi observada nos locais de lesão e a intensidade de marcação variou de acordo com a intensidade da lesão (leve a acentuada) (Tabela 4) (Figura 16C, 16D, 17B, 18C, 18D). A imunomarcação foi observada no ápice de algumas vilosidades no 7 dia pós-inoculação, nos locais onde havia tumefação do citoplasma das células epiteliais (Figura 19). À medida que a lesão diminuía de intensidade encaminhando-se para a resolução, a marcação IHQ evidenciou-se em maior intensidade próximo das placas de Peyer (Figura 20A e 20B) e no interior de macrófagos localizados na lâmina própria.

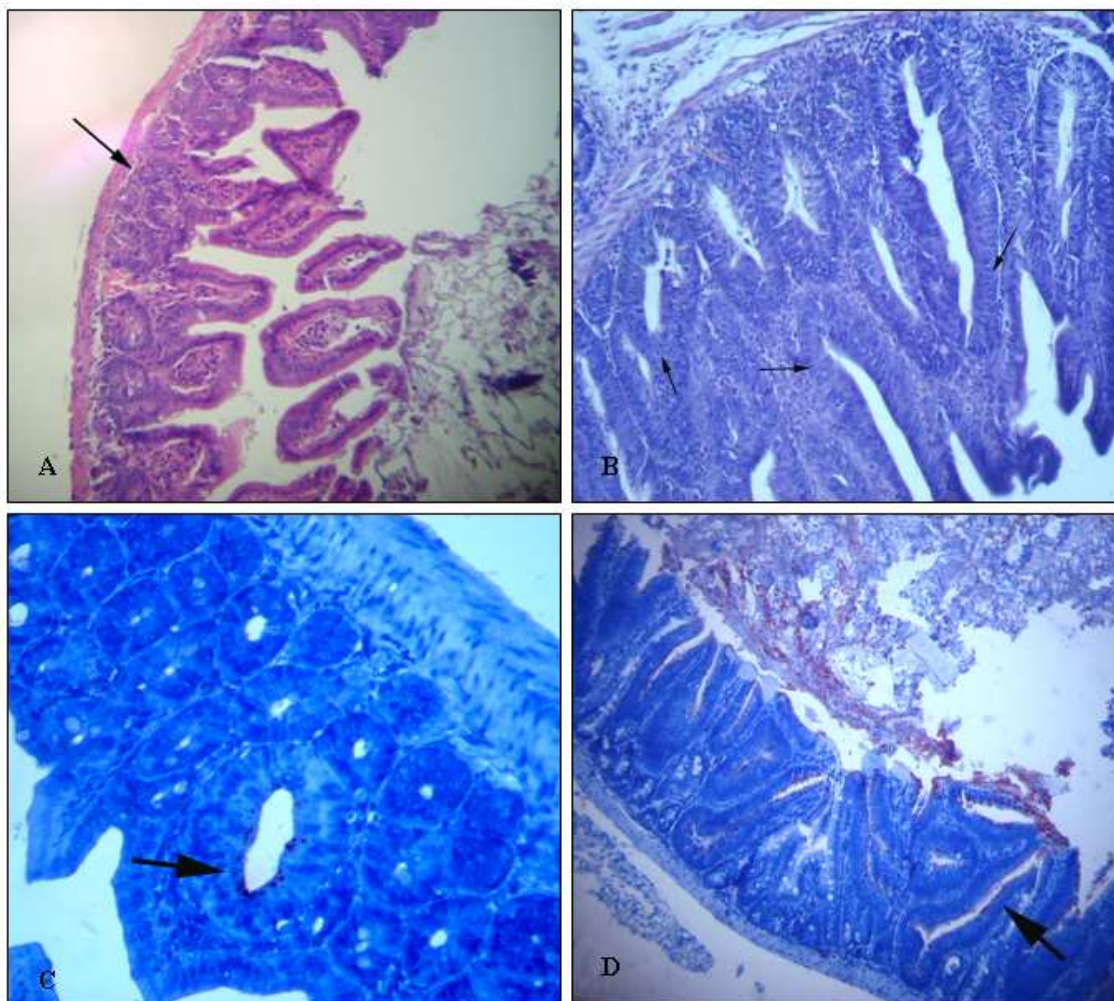


Figura 16 – Enteropatia proliferativa. A) Camundongo Swiss, íleo, 7 dias pós inoculação. Observa-se proliferação multifocal leve multifocal das criptas intestinais com ausência de células caliciformes e grande quantidade de enterócitos jovens (seta), HE, 4X. B) Camundongo, Swiss, íleo, 14 dias pós inoculação. Há hiperplasia difusa acentuada das criptas intestinais (setas) com ausência de células caliciformes, espessamento da mucosa e enterócitos jovens, HE, 20X. C) Camundongo, Swiss, ceco, 7 dias pós inoculação. Observa-se marcação imuno-histoquímica focal leve (seta), IHQ, 40X. D) Camundongo, Swiss, íleo, 14 dias pós inoculação. Há marcação difusa acentuada para o antígeno de *Lawsonia intracellularis*, nas criptas (seta) e na superfície da mucosa intestinal, IHQ, 4X.

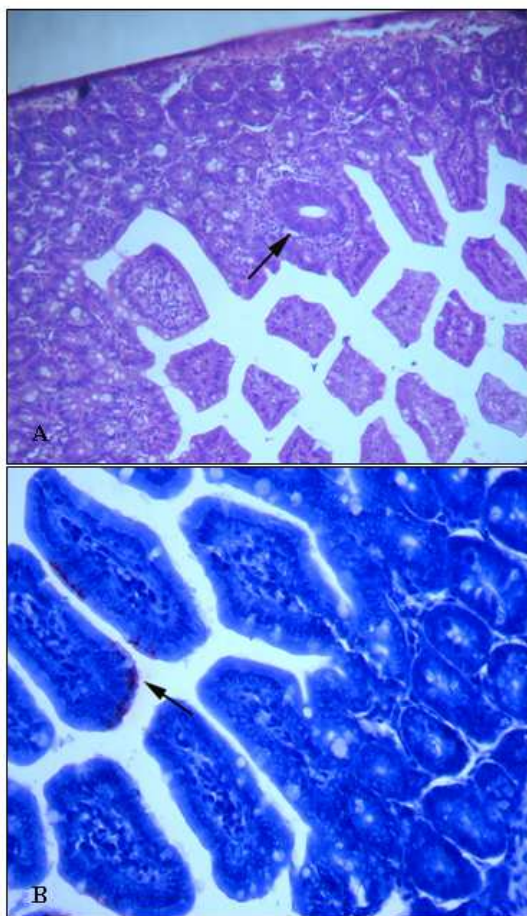


Figura 17 – Enteropatia proliferativa. A) Camundongo C-57 Black 6, ileo, 14 dias pós inoculação. Há hiperplasia focal leve das criptas intestinais (seta) com ausência de células caliciformes e grande quantidade de enterócitos jovens, HE, 4X. B) Camundongo, C-57 BLACK 6, ileo, 14 dias pós inoculação. Há marcação imuno-histoquímica leve para o antígeno da *Lawsonia intracellularis*, IHQ, 40X.

3.4.2 Resultados Nested PCR

Os resultados da PCR das fezes foram compatíveis com as lesões histológicas

observadas. Os camundongos Swiss inoculados com cultura pura eliminaram *L. intracellularis* nas fezes no dia 7 e 14. O grupo inoculado com homogeneizado de mucosa eliminou a bactéria nas fezes somente no dia 14. Os camundongos da linhagem BALB/c apresentaram resultados da PCR positivo para *L. intracellularis* somente no dia 14 em ambos os grupos inoculados (cultura pura e homogeneizado de mucosa). A linhagem C-57 BLACK 6 eliminou a bactéria nas fezes nos dias 7 e 14 pós- inoculação. Os camundongos inoculados com homogeneizado de mucosa apresentaram resultados de PCR positivo nas duas ocasiões enquanto aqueles inoculados com cultura pura foram positivos somente no dia 7 pós-inoculação. Os camundongos DB-A foram positivos na PCR nos dias 7, 14 e 21 em ambos os grupos inoculados (Tabela 4) (Figura 21A, 21B, 22A, 22B).

3.4.3 Resultados da Análise Estatística

A análise pelo teste exato de Fischer demonstrou que há associação significativa entre o inóculo utilizado (cultura pura e homogeneizado de mucosa) e a ocorrência de lesões histopatológicas ($P \leq 1.100E-05$) (5% de significância), e entre o inóculo e a presença de marcação IHQ ($P \leq 4.926E-04$) (5% de significância), ou seja, as lesões histológicas e a marcação IHQ foram mais intensas nos camundongos inoculados com cultura pura do que naqueles inoculados com homogeneizado de mucosa (ANEXO 4).

Associação significativa também foi demonstrada entre as linhagens analisadas e a intensidade de lesões histopatológicas ($P \leq 2.778E-04$) (5% de significância), e entre as linhagens analisadas e a intensidade da marcação IHQ ($P \leq 4.926E-04$) (5% de significância). Infere-se que as linhagens Swiss e DB-A apresentaram lesões e imunomarcação mais intensas do que as linhagens C-57 Black 6 e Balb/C (ANEXO 5).

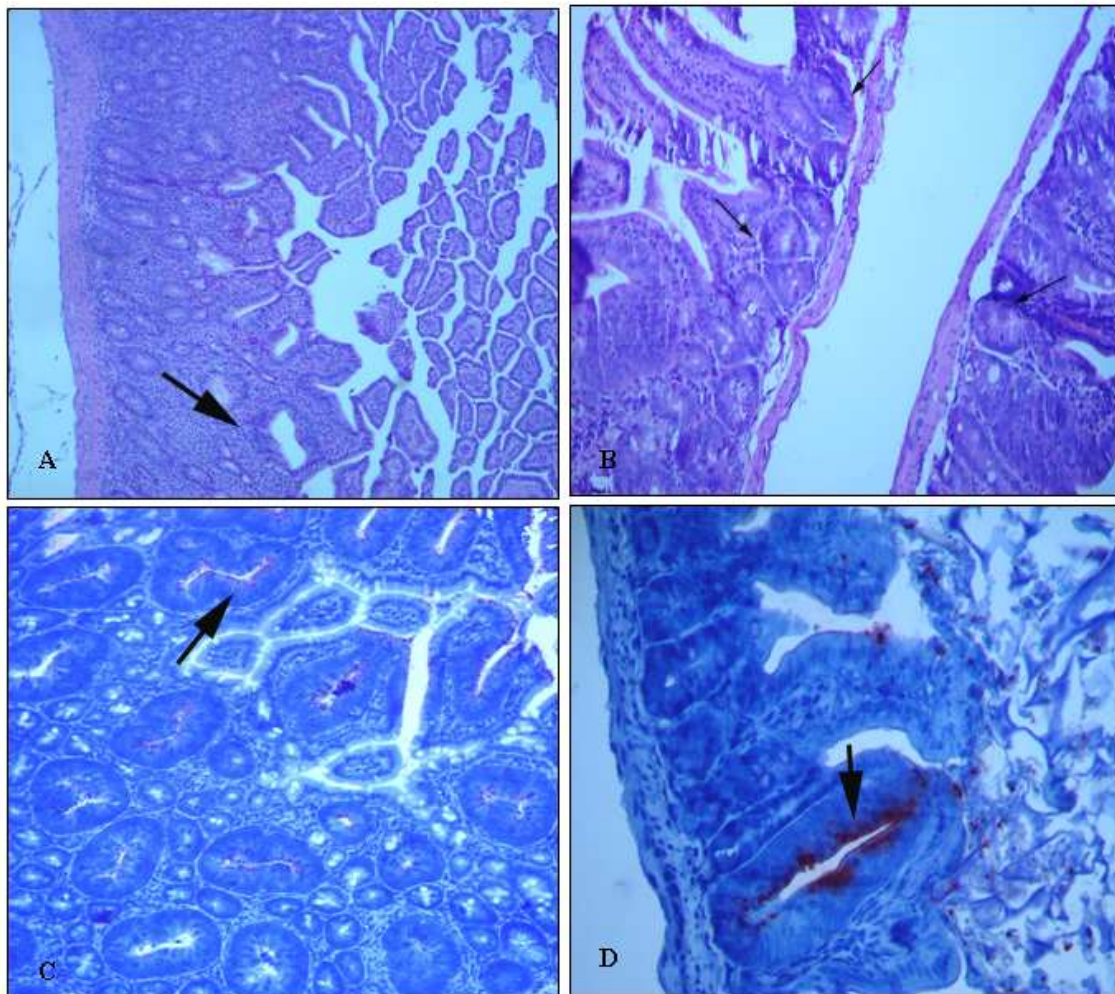


Figura 18 – Enteropatia proliferativa. A) Camundongo DB-A, ileo, 14 dias pós inoculação. Observa-se espessamento difuso acentuado da mucosa intestinal com hiperplasia das criptas intestinais (seta), HE, 4X. B) Lesão histológica de enteropatia proliferativa em um camundongo, DB-A, ileo, 21 dias pós inoculação. Há hiperplasia difusa moderada das criptas intestinais (setas), HE, 20X. C) Camundongo, DB-A, ceco, 14 dias pós inoculação. Observa-se marcação imunoistoquímica difusa acentuada, no ápice das células das criptas intestinais (seta), IHQ, 4X. D) Camundongo, DB-A, ileo, 21 dias pós inoculação. Há marcação imunoistoquímica multifocal moderada, no ápice das células da cripta intestinal (seta), IHQ, 40X.

Tabela 5 – Resultados individuais das lesões histopatológicas, marcação imunistoquímica e resultados da PCR do *pool* de fezes das diferentes linhagens de camundongos inoculadas com homogeneizado de mucosa e cultura pura, contendo *L. intracellularis*, nos dias 7, 14, 21 e 28 pós inoculação (dpi).

Linhagem	Histopatologia				Imuno-histoquímica				PCR			
	dpi				dpi				dpi			
Inóculo	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
Swiss												
Homogeneizado de mucosa	0/0/0/0*	1/1/1/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	1/1/1/0	0/0/0/0	0/0/0/0	-	+	-	-
Cultura Pura	1/2/1/1	3/3/2/3	0/0/0/0	0/0/0/0	1/1/1/1	3/3/2/2	0/0/0/0	0/0/0/0	+	+	-	-
BALB/c												
Homogeneizado de mucosa	0/0/0/0	1/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	-	+	-	-
Cultura Pura	1/1/1/1	1/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	1/1/1/1	1/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	-	+	-	-
C-57 BLACK6												
Homogeneizado de mucosa	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	1(LP)/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	-	-	-	-
Cultura Pura	1/1/1/1	1/2/1/1	1/1/0/0	0/0/0/0	1/1/1/0	1/1/1/1	1/0/0/0	0/0/0/0	+	+	-	-
DB-A												
Homogeneizado de mucosa	1/1/1/0	1/1/1/0	1/1/1/1	0/0/0/0	1/1/1/0	1/1/0/0	1/1/1/1	0/0/0/0	+	+	+	-
Cultura Pura	1/1/2/1	3/3/2/1	2/2/2/1	1/1/0/0	1/2/1/1	3/3/2/1	1/2/2/1	1/1/0/0	+	+	+	-

* Lesões histopatológicas e marcação imuno-histoquímica de *L. intracellularis*: 0, ausente; 1, leve; 2, moderada; 3, severa. Para resultados da PCR; +, positivo; -, negativo. LP (lâmina própria)

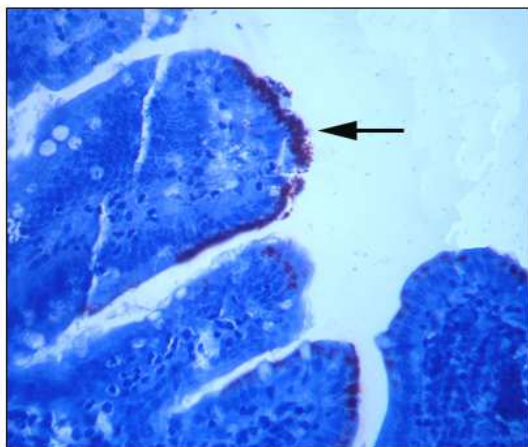


Figura 19 – Enteropatia proliferativa. Camundongo, Swiss, ileo, 7 dias pós inoculação com cultura pura de *L. intracellularis*. Observa-se marcação imuno-histoquímica multifocal acentuada no ápice das vilosidades intestinais (enterócitos maduros) (setas), IHQ, 40X.

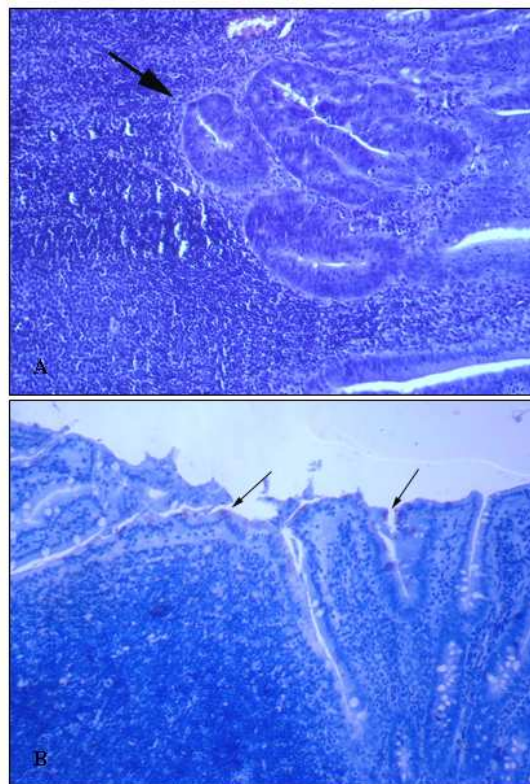


Figura 20 – Enteropatia proliferativa. A) Camundongo DB-A, ceco, 28 dias pós inoculação. Observa-se hiperplasia difusa acentuada das criptas intestinais próximas as placa de Peyer (seta), HE, 20X. B) Camundongo, DB-A, ileo, 28 dias pós inoculação. Há marcação imuno-histoquímica multifocal leve nos enterócitos que recobrem a placa de Peyer (setas), IHQ, 20X.

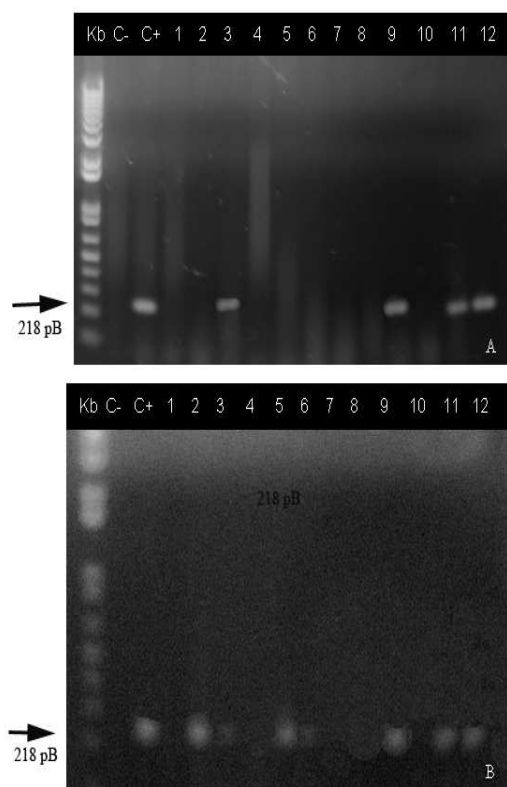


Figura 21 – A) Gel de agarose a 1%, *Nested* PCR, 7 dias após a inoculação. Da esquerda para direita: Kb, marcador de peso molecular; C-, controle negativo; C+, controle positivo *Lawsonia intracellularis* (218 pb); 1, controle negativo Swiss; 2, Swiss inoculado com homogeneizado de mucosa; 3, Swiss inoculado com cultura pura; 4, controle negativo BALB/C; 5, BALB/C inoculado com homogeneizado de mucosa; 6, BALB/C inoculado com cultura pura; 7, controle negativo C-57 BLACK 6; 8, C-57 BLACK 6 inoculado com homogeneizado de mucosa; 9, C-57 BLACK 6 inoculado com cultura pura; 10, controle negativo DB-A; 11, DB-A inoculado com homogeneizado de mucosa; 12, DB-A inoculado com cultura pura. Observe as bandas positivas nas linhas 3, 9, 11 e 12. B) Gel de agarose, *Nested* PCR, 14 dias após a inoculação. Numeração idêntica à figura 21A. Observe as bandas positivas nas linhas 2, 3, 5, 6, 9, 11 e 12.

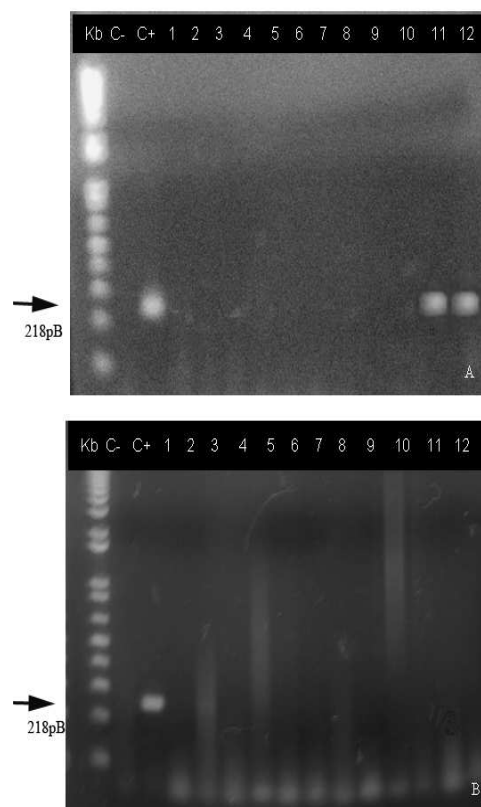


Figura 22 - A) Gel de agarose a 1%, *Nested* PCR, 21 dias após a inoculação. Da esquerda para direita: Kb, marcador de peso molecular; C-, controle negativo; C+, controle positivo *Lawsonia intracellularis* (218 pb); 1, controle negativo Swiss; 2, Swiss inoculado com homogeneizado de mucosa; 3, Swiss inoculado com cultura pura; 4, controle negativo BALB/C; 5, BALB/C inoculado com homogeneizado de mucosa; 6, BALB/C inoculado com cultura pura; 7, controle negativo C-57 BLACK 6; 8, C-57 BLACK 6 inoculado com homogeneizado de mucosa; 9, C-57 BLACK 6 inoculado com cultura pura; 10, controle negativo DB-A; 11, DB-A inoculado com homogeneizado de mucosa; 12, DB-A inoculado com cultura pura. Observe as bandas positivas nas linhas 11 e 12. B) Gel de agarose, *Nested* PCR, 28 dias após a inoculação. Numeração idêntica à figura 22A. Nenhuma banda positiva foi detectada.

3.5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstra a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos à infecção por *L. intracellularis*. A relação entre o patógeno, o hospedeiro e o estabelecimento da doença obedece a um mecanismo intrínseco de correlação. Um patógeno pode apresentar diferentes níveis de infecção que varia de acordo com a especificidade do agente. Para infectar a célula hospedeira, a bactéria intracelular precisa se aderir e penetrar nas células, o que exige um mecanismo complexo de invasão celular. Em seguida, as bactérias precisam evadir do sistema lisossomal intracelular e multiplicar-se a fim de progredir com a infecção (Olsen et al., 2004).

Os resultados demonstraram uma variação significativa no estabelecimento das lesões de *L. intracellularis* entre as quatro linhagens de camundongos estudadas. Camundongos DB-A e Swiss foram os mais susceptíveis a infecção, enquanto as lesões nos camundongos BALB/C e C-57 Black6 foram menos intensas. Estas diferenças na suscetibilidade a agentes infecciosos vêm sendo descritas há muito tempo na literatura, e as bases genéticas para essas diferenças ainda não foram determinadas (Collins et al., 1999; Fortier et al., 2005; Murakata et al., 2008).

Um estudo comparativo das cepas de *L. intracellularis* isoladas de diferentes espécies animais, baseado no sequenciamento do DNA ribossomal 16S da bactéria, não mostrou nenhuma diferença entre os isolados, embora diferenças de proteínas externas possam existir (Cooper et al., 1999; Murakata et al. 2008). Guedes e Gebhart (2003c), trabalhando com anticorpos monoclonais (AcM 2001 e IG4 MAbs) e um anticorpo policlonal (1999 PABs) para *L. intracellularis*, demonstraram através da análise de Western blot que todos os isolados de *L. intracellularis*, exceto um isolado de hamster, apresentavam reatividade para os anticorpos, o que pode indicar alguma diferença em proteínas de membrana externa da cepa isolada de hamsters.

Foi interessante observar a suscetibilidade da linhagem de camundongos Swiss, uma linhagem comum em laboratórios,

que nunca fora antes descrita como susceptível a EP ou candidata a infecção. Adicionalmente, camundongos da linhagem DB-A também apresentaram lesões histológicas significativas de EP, sendo que essas foram presentes até o 28 dpi com um pico de lesão no 14 e 21 dpi. Esse padrão de infecção se assemelha muito ao que é descrito em suínos infectados experimentalmente (MacIntyre et al., 2003). Camundongos são excelentes modelos experimentais para o estudo de doenças infecciosas (Fortier et al, 2005), a presença de lesões acentuadas de EP em camundongos Swiss e DB-A, demonstra o grande potencial dessas duas linhagens para o desenvolvimento de um modelo experimental de infecção para *L. intracellularis* e também para testes de vacina.

Nenhum animal inoculado apresentou diarreia ou outra sintomatologia clínica durante a realização do experimento. A diarreia, comum em suínos (Jacobson et al., 2009), não é descrita em camundongos e hamsters, tanto naqueles animais inoculados experimentalmente como nos animais infectados de forma natural (Collins et al., 1999; Kroll et al., 2005; Friedman et al., 2009;).

A infecção por *L. intracellularis* é caracterizada macroscopicamente pelo espessamento da mucosa intestinal e histopatologicamente por hiperplasia das criptas intestinais (Lawson e Gebhart 2000). Ambas as lesões foram observadas em camundongos no estudo comprovando a infecção pelo agente. Camundongos inoculados com cultura pura apresentaram lesões histológicas e IHQ mais acentuadas do que aqueles inoculados com homogeneizado de mucosa. Estudos anteriores em suínos comparando cultura pura e homogeneizado intestinal não mostraram diferenças na gravidade das lesões ou no nível de infecção (Guedes e Gebhart, 2003a), o contrário do que ocorreu em nosso trabalho onde a cultura pura foi mais eficiente. A maior vantagem da utilização da cultura pura em relação ao homogeneizado é o controle rígido da bactéria infectante e a ausência de bactérias ou outros fatores de tecido (Guedes et al., 2002b).

O exame imuno-histoquímico nos camundongos demonstrou que a imunomarcagem do antígeno variou de acordo com a intensidade da lesão. Em suínos, há uma relação entre o

aumento do número de bactérias e a acentuação da lesão de hiperplasia (Lawson e Gebhart 2000; Guedes et al., 2003; Kroll et al., 2005) e o mesmo parece acontecer em camundongos. Boutrup (2008) observou que a *L. intracellularis* pode ser encontrada no interior das células epiteliais presentes no ápice das vilosidades, indicando infecção nos enterócitos maduros, o que implica que estas células são também um ponto de ataque para a *L. intracellularis*. Esta pode ser uma possível explicação para a presença de antígenos no ápice das vilosidades no 7º dia pós-inoculação.

Nos casos onde a infecção se tornava menos intensa, tendendo a resolução, a marcação era frequentemente observada nas criptas próximo das placas de Peyer ou localizada na lâmina própria ou no citoplasma de macrófagos. Sabe-se que bactérias localizadas no citoplasma dos enterócitos passam através da membrana para a lâmina basal, são internalizadas pelas células apresentadoras de antígenos e drenadas para os linfonodos e fígado. A ocorrência de antígenos de *L. intracellularis* foi relatada nos linfonodos mesentéricos dos animais afetados antes (Segalés et al., 2001; Guedes e Gebhart, 2003a). Essas alterações contribuem para a eliminação dos organismos patogênicos e para a reestruturação da arquitetura normal do epitélio intestinal (Smith e Lawson, 2001).

A PCR é um dos métodos mais eficazes para a detecção de *L. intracellularis* (Kroll et al., 2005). Segundo Jones et al. (1993), a PCR pode detectar até 10³ bactérias por grama de fezes. Com esta técnica demonstramos que os camundongos apresentaram um padrão de eliminação de *L. intracellularis* diferente dos suínos. Suínos podem eliminar a bactéria a partir da primeira até a décima segunda semana pós-inoculação (Kroll et al., 2005), enquanto que a linhagem de camundongos DB-A elimina a bactéria por 21 dias. As lesões histológicas mais pronunciadas e a eliminação de *L. intracellularis* mais frequente ocorreram no décimo quarto dia pós-inoculação, semelhante ao que é descrito em suínos (MacIntyre et al., 2003).

3.6 CONCLUSÃO

(1) O presente estudo demonstrou que camundongos inoculados intragastricamente com *L. intracellularis* desenvolveram hiperplasia epitelial das criptas com marcação IHQ positiva para o antígeno no citoplasma das células epiteliais da mucosa. (2) Os camundongos inoculados com cultura pura apresentaram lesões mais acentuadas e frequentes de EP, do que aqueles inoculados com homogeneizado de mucosa. (3) Camundongos Swiss e DB-A foram as linhagens com maior ocorrência de lesão, estas se acentuavam principalmente no D14 (Swiss), e D14 e D21 (DB-A) pós infecção. (4) A eliminação nas fezes de *L. intracellularis* foi observada em todas as linhagens variando de acordo com o inóculo utilizado e a linhagem do camundongo.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS Relatório 2008. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/relatorios/rela2008_P.pdf>. Acesso em: 1 set 2009.

ABSHIER, J. M.; BESH-WILLIFORD, C. L.; FRANKLIN, C. L.; RUSSELL, S. P. Spontaneous infection of *Lawsonia intracellularis*-like bacteria in the mouse. *Anais... Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 82, 2001, Saint Louis, p. 49.

AFIP Contributor Manual. Disponível em: <<http://www.afip.org/consultation/resources/AFIPManual40-40.pdf>>. Acesso em: 02 mar 2010.

ALMEIDA, M. N. Fatores que contribuem para a falta de uniformidade em suínos de terminação. 2008. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ARGENZIO, R. A. Glucose-Stimulated Fluid absorption in the pig small intestine during the early stage of swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.*, v. 41, n. 12, p. 2000-2006, 1980.

BACCARO, M. R.; MORENO, A. M., SHINYA, L. T. et al. Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finishing pigs. *Braz. J. of Microbiol.*, v. 34, p. 225-229, 2003.

- BANDEIRA, R. Presenta de *Salmonella* sp. em suínos ao abate em cortes de pernil processados em frigoríficos no Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de veterinária da Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; MATHIESEN, M.; UZEDA, M. et al. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrheic pigs in Brazil. *Vet. Rec.*, v. 146, p. 398-403, 2000.
- BARCELLOS, D. E. S. N. 2000. 163f. Tese (Doutorado em ciências Microbiológicas) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- BARCELLOS, D. E. S. N. Colite espiroquetel em suínos: uma doença emergente. *Bolt. Inst. Pesq. Vet. Desidério Ramos*, v. 3, p. 1-8, 2001.
- BARCELLOS, D. E.; RAZIA, L. E.; BOROWSKI, S. M. Ocorrência e identificação de espiroquetas intestinais em suínos em granjas de porte industrial de duas regiões criatórias do estado do Rio Grande do Sul, em relação a medicação da ração. *Cien. Rur.*, v. 33, p. 725-729, 2003
- BATTE, E. G., MCLAMB, R. D., MUSE, K. E. et al. Pathophysiology of Swine Trichuriasis. *J. Vet. Res.*, v. 38, p. 1075-1079, 1977.
- BERTSCHINGER, H. U.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* Infections. In: STRAW, B.E. et al. (Eds.). *Diseases of Swine*. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, 1999. Cap.32, p.431-457.
- BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos abatidos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesq. Vet. Brasil.*, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.
- BIKSI, I, LORINCZ, M., MOLNÁR, B. et al. Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. *Acta Vet.Hungar.*, v. 55, p. 219-127, 2007
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BOYE, M; BALODA, S. B.; LESER, T. D. et al. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet. Microbiol.*, v. 81, p. 33-40, 2001.
- BOYE, M.; JENSEN, T. K.; MOLLER, K. et al. Specific detection of *Lawsonia intracellularis* in porcine proliferative enteropathy inferred from fluorescent rRNA *in situ* hybridization. *Vet. Pathology.*, v. 35, p.153-156, 1998.
- BOUTRUP, T. S. (2008). Studies of the pathogenesis of porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. Target cells and progression of lesions. University of Copenhagen, 63p. (PhD Thesis).
- BURDEN, D. J.; HAMMET, N. C.; BROOKES, P. A. Field observation on the longevity of *Trichuris suis* ova. *Vet. Rec.*, v. 11, p. 43, 1987.
- BURCH, D. G. S. Controlling diarrhoea in growing pigs – the grey scour syndrome. *Pig Journal*, Inglaterra, v.45, p.131-149, 2000.
- CAMPOS, L. C. *Salmonella* sp. In: TRABULSI, L. R. et al. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 229-238, 1999.
- CASTAGNA, S. M. F. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas e linfonodos submandibulares de suínos ao abate. *Arq. Brás. Vet. e Zootc.*, v.56,n.3, p. 300-306, 2004.
- CHIRIBOGA, A. E.; GUIRAES, W. V.; VANETTI, M. C. et al. Detection of *Lawsonia intracellularis* in feces of swine from the main producing regions in Brazil. *Can. J. Microbiol.*, v.45, p. 230-234, 1999.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; SIMON, N. L. ET AL. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imuno-histoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. *Cien. Rur.*, v. 36. n. 5, p. 1480-1485, 2006.
- CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; CHARLES, O. T. *Pathogenesis*

of bacterial infections in animals. 2. ed. Ames: Iowa State University, p. 133-153, 1993.

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.

COLLINS, A. M.; DIJK, M. V.; VU, N.Q. et al. Immunity to *Lawsonia intracellularis*. In: Allen D. Leman Conference, 28, 2001, Minneapolis. *Anais...* Saint Paul: Veterinary Outreach Programs/UMN, 2001, 115-120p.

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.*, v. 77, p. 120-122, 1999.

COOPER, D. M.; GEBHART, C. J. Comparative aspects of proliferative enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 212, p. 1446-1451, 1998.

COOPER, D. M.; SWANSON, D. L.; BARNES, S. M.; GEBHART, C. J. 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, p. 635-639, 1997a.

COOPER, D. M.; SWANSON, D. L.; 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.

CÔTÉ, S.; LETELLIER, A.; LESSARD, L. et al. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can. J. Vet. Res.*, v. 68, p. 241-248, 2004.

DAVIES, P. R.; NICHOLS, M. A. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet. Microbiol.*, v. 83, n. 1, p. 45-60, 2001.

DUBREUIL, J. D. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: Knowing is half the battle. *Microbiol. Lett.*, v. 278, p. 137-145, 2008.

DUHAMEL, G. E.; WHEELDON, E. B. Intestinal adenomatosis in a foal. *Vet. Pathol.*, v. 19, p. 447-450, 1982.

DUHAMEL, G. E.; CARVAJAL A.; DE ARRIBA, M. L. et al. Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. *Vet. Rec.*, v. 158, p. 700-701, 2006.

DUHAMEL, G. E. Colonic spirochetosis caused by *Serpulina pilosicoli*. *Larg. Ani. Pract.*, v. 19, p.14-22, 1998.

DUHAMEL, G. E.; KINYON, J. M.; MATHIESEN, M. R. et al. Prevalence of porcine colonic spirochetosis in a multiple-site production system and microbial sensitivity patterns of *Serpulina pilosicoli*. *Anais...* 39th American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Meeting, Arkansas, p.45. 1996

DUHAMEL, G. E. Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis. *An. H. Res. Rew.*, v. 2, p. 3-17, 2001.

EKPERIGIN, H. E.; NAGARAJA, K. V. *Salmonella*. *Vet. Clin. North. Am.*, v. 28, n. 2, p. 17-29, 1998.

ELDER, R. O.; DUHAMEL, G. E.; SCHAFER, R. W. et al. Rapid detection of *Serpulina hyodysenteriae* in diagnostic specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 1497-1502, 1994.

ELWELL, M. R.; CHAPMAN, A. L.; FRENKEL, J. K. Duodenal hyperplasia in a guinea pig. *Vet. Pathol.*, v. 18, 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.

FÁVERO, J. A. Produção de Suínos (2003). Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Suinos/SPSuinos/importancia.html>> Acesso em: 05 out 2009.

FELLSTROM, C. B.; PETTERSON, K. E.; JOHANSSON, N. et al. Prevalence of *Serpulina* species in relation to diarrhea and feed medication in pig-rearing herds in Sweden. *Am. J. Vet. Res.*, v. 57, p. 807-811, 1996.

FRANCIS, D. H.; GRANGE, P. A.; ZEMAN, D. H. et al. Expression of mucin-type glycoprotein K88 receptors strongly correlates with piglet susceptibility to K88+ enterotoxigenic *Escherichia coli*, but adhesion of this bacterium to brush borders does not. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 4050-4055, 1998.

FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J. Swine Health Prod.*, v. 10, p. 171-175, 2002.

FRANCO, D. B. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia Alimentar*, São Paulo: Ateneu, 1996, 108p.

FRIEDMAN, M.; BEDNAR, V.; KLIMES J. et al. *Lawsonia intracellularis* in rodents from pig farms with the occurrence of porcine proliferative enteropathy. *Letters in A. Microbiol.*, v. 47, p. 117-121, 2008.

FORTIER, A.; MIN-OO, G.; FORBES, J. et al. Single effects in mouse models of host: pathogen interactions. *J. Leukoc. Biol.*, v. 77, p. 868-877, 2005.

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.

GARCIA, S. K. Suinocultura mineira (III): Densidade de suínos nos pólos regionais. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 12, 2006. *Anais...* Fortaleza, 2006, p. 545-546.

GEBHART, C.; GUEDES, R. M. C. *Lawsonia intracellularis*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F., SONGER, J. G; et al. Ed. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Oxford: Blackwell Publishing, p. 363-372, 2004.

GIRARD, C.; LEMARCHAND, T.; HIGGINS, R. Porcine colonic spirochetosis: a retrospective

study of eleven cases. *Can. Vet. J.*, v. 36, p. 291-294, 1995.

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.; 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.

GUEDES, R. M. C.; WINKELMAN, N. L.; GEBHART, C. J. Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the infectious dose of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Rec.*, v. 153, p. 432-433, 2003.

GUEDES, R. M. C. Enteropatia proliferativa suína (ileíte). *Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n. 42, p. 45-56, 2003.

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. Diarreia em suínos de criação e terminação principais enfermidades. *Suíno Cia.*, n. 11, p. 11-18, 2005.

GUEDES, R. M. C. Known facts about the epidemiology of porcine proliferative enteropathy. *Thai J. Vet. Med*, v.38, n. 2, p. 9-17, 2008.

GO, Y.Y.; LEE, J. K.; YE, J. Y. et al.. Experimental reproduction of proliferative enteropathy and the role of IFN-gamma in protective immunity against *Lawsonia intracellularis* in mice. *J. Vet. Sci.*, v. 6, p. 357-359, 2005

HAUGEGAARD, J. Prevalence of nematodes in Danish industrialized sow farms with loose housed sows in dynamic groups. *Vet. Parasitol.*, v. 6, 2009.

HAMPSON, D. J. Evaluation of a novel antimicrobial polymer for the control of porcine postweaning colibacillosis. *Aust Vet J.*, v. 78, p. 117-120, 2000.

HAMPSON, D. J.; FELLSTROM, D. J.; THOMSON, J. R. Swine Dysentery. In: STRAW, B.; ZIMMERMAN, J. A. S.; TAYLOR, D. J. (Eds) *Diseases of Swine*. Oxford: Blackwell, p. 785-805, 2006.

HAMPSON, D. J.; TROTT, D. J. A review - Intestinal spirochetal infections of pigs: an overview with an Australian perspective. In: HENESSY, V.; CRANWELL, P. D (eds), *Manipulating Pig Production*, Iowa: Werribee, p.139-169, 1995.

HAMPSON, D. J.; TROTT, D. J. Spirochetal diarrhea/porcine intestinal Spirochetosis. In: STRAW, B.E. et al. (Eds.). *Diseases of swine*. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, 1999. Cap.40, p.553-562, 1999.

HARRISSON, L. R.; GOSSER, H. S. Demonstration of spirochaetes in formalized tissues using Dieteler's silver stain. In: Annual meeting of the american association of veterinary laboratory diagnosticians, 22, 1979, Columbia, *Anais...* Columbia: American association of veterinary laboratory diagnosticians (AAVLD), 1979, p. 373-378.

HERBST, W.; HERTRAMPF, B.; SCHMITT, T.; WEISS, R.; BALJER, G. 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, p. 361-364, 2003.

HIRSH, D. C. Swine Salmonellosis In: BIBERTEIN, E. L.; ZEE, Y. C. (Orgs) *Salmonella Review of Veterinary microbiology*. Orlando: Blackwell, p. 110-115, 1990.

HOFFMANN, R. P. Diagnóstico de parasitismo veterinário. Porto Alegre: Sulina, 1987. 156p.

HOLAND, R. E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, p. 345-375, 1990.

HOLYOAKE, P. K, CUTTER, R. S, CAPLE, I. W. A diagnostic dilemma: detecting proliferative enteritis in pigs at slaughter. *Aus. Vet. J.*, v. 71, p. 308-309, 1994.

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.

IMA Instituto Mineiro de Agropecuária - Programa Nacional de Sanidade Suídea, Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=420&Itemid=353>. Acesso em: 05 out 2009.

JACOBSON, M.; HÅRD A. F.; SEGERSTAD, C.; GUNNARSSON, A. et al. Diarrhoea in the growing pig – a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res in Vet. Sci.*, v. 74, p. 163-169, 2003.

JACOBSON, M.; ASPAN, A.; KÖNIGSSON, M. H. et al. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for

PCR. *Vet. Microbiol.*, v. 102, n. 3-4, p. 189-201, 2004.

JACOBSON, M. GERTH LÖFSTEDT, M.; HOLMGREN N.; et al. The prevalences of *Brachyspira* spp and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild board population. *J. Vet. Med.*, v. 52, p. 386-391, 2005.

JACOBSON, M.; FELLSTRÖM, C.; JENSEN-WAERN, M. (2009) Porcine Proliferative enteropathy: An important disease with questions remaining to be solved. *The Veterinary Journal*, doi: 10.1016/j.tvjl.2009.05.010 (Article in Press)

JASNI, S.; MCORIST, S.; LAWSON, G. H. K. Experimental induced proliferative enteritis in hamsters: an ultrstructural study. *Rec. Vet. Sci.*, v. 56, p. 186-192, 1994.

JENSEN, T. K.; MOLLER, K.; SESER, T. D. 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.

JANSSON, D. S.; RASBACK, T.; FELLSTROM, C. et al. Experimental Challenge of Mallards (*Anas platyrhynchos*) with *Brachyspira hyodysenteriae* and “*Brachyspira suanatina*” Isolated from Pigs and Mallards. *J. Comp. Pathol.*, v. 141, p. 211-222, 2009.

JOENS, L. A.; MARQUEZ. R. HALTER, M. Comparison of outer membrane fractions of *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*. *Vet. Microb.*, v. 35, p. 119-132, 1993.

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, p. 2611-2615, 1993.

JOHNSTON, T. et al. Recents advances in diagnosing and controlling porcine colonic spirochetosis caused by *Serpulina pilosicoli*. *Compend. Con. Edu. Pract. Vet.*, v. 21, p. 198-209, 1999.

KICH, J. D. Desenvolvimento de um teste de ELISA – LPS para *Salmonella* e sua aplicação em rebanhos suínos na identificação de fatores de risco associados a infecção. 2007. 68f. Dissertação (dissertação de mestrado). Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

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.

KOMAREK, V.; MADERNER, A.; SPERGSEER, J. et al. Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pig with miscellaneous chronic diseases. *Vet. Microbiol.*, v. 134. p. 311-317, 2009.

KRINGEL, H.; ROEPSTORFF, A. *Trichuris suis* population dynamics following a primary experimental infection. *Vet. Parasitol.*, v. 139, p. 132-139, 2006.

KROLL. J. J.; ROOF, M. B.; HOFFMAN, L. J. et al. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim Health Res Rev.*, v. 6, n. 2, p. 173-197, 2005.

LA, T., PHILLIPS, N. D., HAMPSON, D. J. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig faeces. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 3372-3375, 2003.

LA, T., COLLINS, A. M., PHILLIPS, N. D. et al. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. *Letters in A. Microbiol.*, v. 42, p. 284-288, 2006.

LAWSON, G. H. K., MCORIST, S., ROWLAND, A. C. et al. Serological diagnosis of the porcine proliferative enteropathies:

implications for etiology and epidemiology. *Vet. Rec.*, v. 122, p. 554-557, 1988.

LAWSON, G. H. K.; McORIST, S. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. *J. Comp. Pathol.*, v. 108, p. 41-46, 1993.

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, G. H. K.; GEBHART, C. J. Proliferative enteropathy: review. *J. Comp. Pathol.*, v. 122, p. 77-100, 2000.

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, J. I. et al., Human intestinal spirochetes are distinct of *Serpulina hyodysenteriae*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 16-21, 1993.

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.

LIGNON, G. B; FORMIGA, D. N.; FREITAS, A. R. et al. Prevalência e aspectos do controle de Nematódeos gastrintestinais em suínos. *CT / 17 / EMBRAPA-CNPSA*, v. Jan., p. 1-3, 1981.

LINDECRONA, 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.

LINTON, A. H. Salmonellosis in pigs. *Brith. Vet. J.*, v. 135, n. 2, p. 109-112, 1979.

LUNA, L. G. Routine Staining Procedures. In: LUNA, L. G. (Ed). *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw- Hill Book Co, 1968, p. 24-58.

MACÊDO, N. R.; MENEZES, C. P. L.; LAGE, A. P. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas em leitões diarreicos. *Arq. Brás. Méd. Vet. Zoot.*, v. 59, p. 1117-1123, 2007.

MANSFIELD, L. S.; URBAN, J. F. The pathogenesis of necrotic proliferative colitis in swine linked to whipworm induced suppression of mucosal immunity to resident bacteria. *Vet. Imm. Immunopath.*, v. 50, p. 1-17, 1996.

MARQUES, A. C. A produção de suínos e a preservação do meio ambiente 9o Seminário Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura. *Anais... 2001*, p 5-7.

MACINTYRE, N.; SMITH, D. G. E.; SHAW, D. J et al. Immunopathogenesis of Experimentally Induced Proliferative Enteropathy in Pigs. *Vet. Pathol.*, v. 40, p. 421-432, 2003.

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, 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.; LAWSON, G. H. K. Possible relationship of proliferative enteritis in pigs and hamsters. *Vet. Microbiol.*, v. 15, p. 293-302, 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, p. 520-525, 1995.

McORIST, S.; ROBERTS, L.; JASNI, S. E. T AL. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic

- mechanisms. *J. Comp. Path.*, v. 115, p. 35-45, 1996.
- 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, 1997.
- McORIST, S.; GEBHART, C. J. Porcine proliferative enteropathies. In: STRAW B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. et al. (Eds) *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University Press, 1999, p.521-534.
- McORIST, S.; GEBHART, C. J.; BOSWORTH, B. T. Evaluation of porcine ileum models of enterocyte infection by *Lawsonia intracellularis*. *Can. J. Vet. Res.*, v. 70, p. 155-159, 2006.
- MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. *Cien. Rur.*, v. 38. n. 6, p. 1687-1683, 2008.
- MOESER, A. J.; BLIKSLAGER, A. T. Mechanisms of porcine diarrheal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 231, p. 56-67, 2007.
- MOREHOUSE, L. G. Salmonellosis in swine and its control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 160, p. 595-601, 1972.
- MORENO, A. M., BACCARO, M. R., COUTINHO, L. L. *Lawsonia intracellularis* detection in swine feces from important production regions in Brazil. *Arq. Inst. Biol.*, v. 69, p. 5-8, 2002.
- MORÉS, N; NOGUEIRA, R. H. G.; NEVES, O. S. 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.
- MORES, N. Perfil Sanitário da suinocultur no Brasil. *Suin. Indus.*, p. 36 – 40, 1994
- MORES, N.; MORENO, A. M. Colibacilose Neonatal. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Eds) *Doenças de Suínos*, Canone Editorial: Goiânia, 2007, p. 770.
- MØLLER, K., JENSEN, T. K., JORSAL, S.E. et al. Detection of *Lawsonia intracellularis*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhea among growing pigs. *Vet. Microbiol.*, v. 62, p. 59-72, 1998.
- MULLANEY, C. D.; FRANCIS, K. H.; WILLGOHS, J. A. Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88, and 987P pilus antigens of *Escherichia coli*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 3, p. 115-118, 1991.
- MUNIAPPA, N. et al. Light and ultrastructural changes in the ceca of chickens inoculated with human and canine *Serpulina pilosicoli*. *Vet. Pathol.*, v. 33, p. 542-550, 1996.
- MURAKATA, K.; SATO, A.; YOSHIYA, M. et al. Infection of different strains of mice with *Lawsonia intracellularis* derived from rabbit or porcine proliferative enteropathy. *J. Comp. Pathol.*, v. 139, p. 8-15, 2008
- NADVORNY, Y. A. et al. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no RSem 2000. *Act. Sci. Vet.*, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Lin. Microbiol. Rev.*, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NEEF, N. A.; LYSONS, R. J. Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. *Infec. Immun.*, v. 62, p. 2395-2403, 1994.
- NIBBELINK, S. K.; SACCO, R. E.; WANNEMUEHLER, M. J. Pathogenicity of *Serpulina hyodysenteriae*: In vivo induction of tumor necrosis factor and interleukin -6 by a *Serpulina* butanol/water extract (endotoxin). *Microb. Pathogen.*, v. 23, n. 3, p. 181-187, 1990.
- NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; THRUSFIELD, M.V., GRAAT, E.A.M Application of quantitative methods in

veterinary epidemiology. Wageningen: Wageningen Press, 1997. 445p.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. Salmonella: A model for bacteria pathogenesis. *Annual Rev. Med.*, v. 52, p. 259-274, 2001.

OLIVEIRA, C. J. B.; GARCIA, T. B.; CARVALHO, L. F. O. S. et al. Nose-to-nose transmission of *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium between weaned pigs. *Vet. Microbiol.*, v. 125, p. 355-362, 2007.

OLIVEIRA, S. Detecção e identificação de *Salmonella* sp., *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. galinarum* e *S. pulorum* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em materiais de origem avícola. 2000. 104f. Dissertação (mestrado). Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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.

OPRIESSNIG, T.; ROOF, M.; LAYTON, S.M. Experimental co-infection with porcine circovirus type 2 and *Salmonella Typhimurium* or *Lawsonia intracellularis*. In: The 20th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, Durban, 22-26 Junho 2008, *Anais...* South Africa: IPVS, 2000. p. 48.

PEARCE, G.P. Epidemiology of enteric diseases in growerfinisher pigs: a postal survey of pig producers in England. *Vet. Rec.*, Inglaterra. v.27, n.144, p. 338-342, 1999.

PITTMAN, J.S. Enteritis in grower-finisher pigs caused by F18-positive *Escherichia coli*. *J. S. Health Prod.*, v.18, p. 81-86, 2010.

PHILLIPS, N. D.; LA, T.; ADAMS, P. J. et al. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. *Vet. Microbiol.*, v. 134, p. 294-299, 2009.

PUSTERLA, N.; MAPES, S.; REJMANEK, D. et al. Detection of *Lawsonia intracellularis* by real-time PCR in the feces of free-living animals

from equine farms with documented occurrence of equine proliferative enteropathy. *J. Wildl. Dis.*, v. 44, n. 4, p. 992-998, 2008.

RÅSBÄCK, T.; JANSSON, D. S. JOHANSSON, K. E. et al. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *En. Microbiol.*, v. 9, n. 4, p. 983-981, 2007.

REED, W. M.; OLANDER, H. J. THACKER, H. L. Studies on the pathogenesis of *Salmonella Heidelberg* infection in weanling pigs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, p. 2300-2310, 1986.

RISTOW, L. E.; ZICA, K. G. B.; BOTELHO, R. G. A et al. Evaluation of indirect immunofluorescent test and frequency of antibody detection for *Lawsonia intracellularis* against this bacteria in the state of Minas Gerais. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, Melbourne, *Anais...* Melbourne: IPVS, 2000. p. 78.

ROWLAND, A. C.; LAWSON, G. H. K.; MAXWELL, A. Intestinal adenomatosis in the pig: occurrence of a bacterium in affected cells. *Nature*, v. 247, p. 417, 1974.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 309p.

SANTOS, R. L. et al. Phages types of *Salmonella* sp. *enteritidis* isolated from clinical and food samples and from broiler carcasses in southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo*, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2003.

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, et al. Diseases of Swine. 8. ed. Ames: Iowa: University Press, p. 535-551, 2000.

SEGALÉS, J.; FERNÁNDEZ-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.

SMITH, D. G. E.; LAWSON, G. H. K. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the

pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* v. 82, p. 331-345, 2001.

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.

SMITH, S. H.; McORIST, S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res. Vet. Sci.*, v. 62, p. 6-10, 1997.

SORDEN, S. D. Basic pathophysiology of enteric disease. In: ANNUAL MEETING, Nashville, *Anais...* Nashville: AASV, 2001. p.345-348.

STEGE, H.; JENSEN, T. K.; MOLLER, K. et al. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev. Vet. Med.*, v. 46, p. 279-292, 2000.

SOBESTIANSKY, J. Clínica e Patologia Suína. Goiânia: Gráfica Art3, 1999, 464p.

SOBESTIANSKY, J. et al. Clínica Veterinária em sistemas intensivos de produção de suínos e relatos de casos clínicos. Goiânia: Art 3, 2001, 103p.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. (Eds) Doenças de Suínos. Cânone editorial: Goiânia, 2007, 770p.

STEWART, T. B.; HOYT, P. G. Internal Parasites. In: STRAW Diseases of Swine. 8. ed. Ames: Iowa: University Press, 2006, p. 535-551.

SUH, D. K.; SONG, J. C. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* em Swine herds. *J. Vet. Sci.*, v. 6, n. 4, p. 289-293, 2005.

TAYLOR, D. J.; SIMMONS, J. R.; LAIRD, H. M. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.*, n. 106, p. 326-332, 1980.

TAYLOR, D. J.; TROTT, D. J. Porcine intestinal spirochaetosis and spirochaetal colitis.

In: HAMPSON, D. J., STATON, T. B. (Eds.) *Intestinal Spirochaetes in domestic animals and man*. Canbrided: CAB International, 1997, cap. 8, p. 211-241.

THOMSON, J. R.; SMITH, W. J.; MURRAY, B. P. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Vet. Rec.*, v. 142, p. 235-239, 1998.

THOMAS, W.; SELWOOD, R. Monoclonal antibodies to a 16 kDa antigen of *Serpulina* (*Brachyspira*) *hyodysenteriae*. *J. Med. Microbiol.*, v. 37, p. 214-220, 1992.

TROTT, D. J., McLAREN, A. J. HAMPSON, D. J. Pathogenicity of human or porcine intestinal spirochetes in day old specific pathogen free chicks: an animal model for animal spirochetosis. *Infect. Immun.*, v. 63, n. 9, p. 3705-3710, 1995.

TROTT, D. J. ALT, D. P.; ZUERNER, R. L. et al. The search for *Brachyspira* outer membrane proteins that interact with the host. *An. H. Res. Rev.*, v. 2, n. 1, p. 19-30, 2001.

VAN DER GAAG, M. A.. A state transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pig Supply Chain. *Eur. J. Operat. Res.*, 2003. Disponível em: <<http://www.scirus.com>>. Acesso em 09 set. 2009.

VANDENBERGHE, J.; MARSBOOM, R. *Campylobacter*-like bacteria in adenocarcinomas of colon in two Wistar rats. *Vet. Rec.* v. 111, p. 416-417, 1982.

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.

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

WEISS, L. H. N.; NONNIG, R.; CARDOSO, M. R. I. et al. Occurrence of *Salmonella* in finishing pigs in south Brazil. In: International

symposium on epidemiology and control of Salmonella in pork, 3, 1999, Washington. Anais... Washington: (S. n.), 1999, p. 184.

WEGENER, H. C.; BAGER, F.; ARESTRUP, F. M.; Vigilância da resistência aos antimicrobianos no homem, nos produtos alimentares e no gado da Dinamarca. Surveillance report. Dinamarca, v.2, nº 3. p 17 - 19, 1997. Disponível em: < <http://www.eurosurveillance.org/em/v02n03/0203-421.asp>> Acesso em: 13 de out. de 2009.

WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: Leman, A. D. et al. (Org) Diseases of swine (7 ed) Ames: Iowa University Press, p. 570-583, 1993.

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, p. 107-111, 2002.

WINKELMAN, N. L.; DEE, S. D. 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... 17^o IPVS Congress, 2002. p.145.

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, p. 499-501, 2006.

ZHANG, P.; WITTERS, N. A.; DUHAMEL, G. E. Identification of Serpulina pilosicoli outer membrane antigens (SPOMA) by western blot analysis of human isolate SP 16 with convalescent and hyperimmune swine sera. In: PAUL, P. S., FRANCIS, D. H., BENFIELD, D. (Eds). *Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases*. Washington: Plenum, 1998, p. 39-57.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S. N. Patogenicidade das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. *Acta Sci. Vet.*, v. 36, n. 1, p. 81-86, 2008.

5. ANEXOS

Anexo 1- Protocolo de imuno-histoquímica – *Lawsonia intracellularis*

1. Xilol – 5 min
2. Xilol – 5 min
3. Xilol – 5 min
4. Álcool 100% (anidro) – 5 min
5. Álcool 96% - 3 min
6. Álcool 70% - 3 min
7. Água destilada – 3 min
8. H₂O₂ 3% - 30 min (100ml – 97ml PBS e 3ml de H₂O₂)
9. Água destilada – 3 min
10. Proteinase K (0,05%)(incubar em câmara úmida a 37°C) – 5 min
11. Água de torneira – 10 min
12. PBS Tween 0,05% – 5 min
13. Leite em pó Molico (0,5g de leite e 20ml de água destilada) – incubar em câmara úmida em temperatura ambiente – 40 min.
14. Anticorpo policlonal – 1:30.000 (incubar em câmara úmida a 37°C) – 30 min
15. PBS Tween 0,05% – 5 min
16. Anticorpo Biotinilado® (incubar em câmara úmida em temperatura ambiente) – 30 min
17. PBS Tween 0,05% – 5 min
18. Streptavidina® (incubar em câmara úmida em temperatura ambiente) – 25 min
19. PBS Tween 0,05% – 5 min
20. Solução AEC (incubar em câmara úmida em temperatura ambiente) – 10 min
21. Água destilada – 5 min
22. Água de torneira – 5 min
23. Hematoxilina de Mayer – 3 a 5 min
24. Água de torneira corrente – 5/10 min
25. Montar lâmina usando meio aquoso

Anexo 2 - Protocolo de imuno-histoquímica - *Brachyspira* sp

- 1) Xilol I e II por 20 min cada,
- 2) Álcool 100% 2 min,
- 3) Álcool 96% 2 min,
- 4) Álcool 80% 2 min
- 5) Álcool 70% 2 min
- 6) Água Destilada
- 7) Peróxido de Hidrogênio 3% por 5 min (diluír em água destilada até uma concentração final de 3% = 3 ml H₂O₂ em 97 ml de água destilada),

- 8) Lavar com TBS
- 9) Recuperação antigênica: tripsina 0,1% (diluída em PBS) por 10 min a 37° C, escorrer e colocar a lâmina em tampão citrato (pH 6). Deixar por 2 min em microondas na potencia máxima, evitar evaporar, controlar colocando TBS sem Tween quando ferver. Deixar esfriar (colocar TBS sem tween para completar o tampão que evaporou);
- 10) Bloqueio de reações inespecíficas: leite desnatado 5% (diluir em PBS) por 15 min (alternativa: usar Power Block caseína pronta por 15 min).
- 11) Lavar com TBS
- 12) Anticorpo primário policlonal: 1/75 diluído em PBS, por 45 min a 37° C em estufa,
- 13) Lavar com TBS
- 14) Gotas amarelas (anticorpo secundário) 2° min em temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte)
- 15) Lavar com TBS
- 16) Gotas vermelhas (estreptoavidina) por 20 min em temperatura ambiente (suficiente para cobrir o corte),
- 17) Lavar com TBS
- 18) Cobrir com DAB (0,6 ml de DAB+ 0,4 ml PBS+ 25 micro litros de peróxido de hidrogênio). Deixar por 5-10 min ou até ficar marrom
- 19) Lavar com TBS e enxaguar em água destilada
- 20) Contra corar com hematoxilina (até 1 min)
- 21) Desidratar em álcool 80%, 96%, e 100% por 2 min cada
- 22) Xilol III e IV
- 23) Montar a lâmina

TAMPÃO CITRATO

- 1 litro de água destilada
- 2,1 gramas de ácido cítrico
- Ajustar o pH 6,0 com NaOH a 0,5%

TBS

Anexo 4 – Tabela de contingência comparando inoculo utilizado cultura pura (C) e homogeneizado de mucosa (H) com a intensidade da lesão histológica e imuno-histoquímica (ausente, leve, moderada e severa).

INÓCULO vs HISTOPATOLOGIA

Table of INOCULO by HISTO

INOCULO HISTO
Frequency,

- 1 litro de água destilada
- 1.3 gramas de tris base (Sigma tris base T-1503)
- 8.7 gramas de NaCl
- 6.0 gramas de tris HCL (sigma T-3253)

Anexo 3 – Protocolo de imuno - histoquímica para circovírus suíno tipo II (PCV-II)

- 1) Xilol 10 min
- 2) Xilol 10min
- 3) Álcool 100 3 min
- 4) Álcool 90 3 min
- 5) Álcool 80 3 min
- 6) Álcool 70 3 min
- 7) Água destilada 3 min
- 8) Água oxigenada (25 ml de água oxigenada e 225 ml de PBS) por 30min
- 9) PBS 30 min
- 10) Proteinase K 0,05%, 5 min em câmara úmida em estufa a 37° C
- 11) PBS 5 min
- 12) Leite em pó (0,5g em 20ml de PBS) por 30min em câmara úmida a 37° C
- 13) Anticorpo primário (PCV-2 1:800) 45 min em câmara úmida,
- 14) Lavar PBS - 5min.
- 15) Anticorpo Biotinilado® (incubar em câmara úmida a 37°C) – 30 min
- 16) Lavar PBS – 5 min
- 17) Streptavidina® (incubar em câmara úmida em temperatura ambiente) – 25 min
- 18) Lavar PBS por 5 min.
- 19) Solução AEC (incubar em câmara úmida em temperatura ambiente) – 10 min
- 20) Água destilada – 5 min
- 21) Água de torneira – 5 min
- 22) Hematoxilina de Mayer – 3 a 5 min
- 23) Água de torneira corrente – 5/10 min
- 24) Montar lamínula usando meio aquoso

Percent					
Row Pct					
Col Pct	ausente	leve	moderada	severa	Total
C	26	25	8	5	64
	20.31	19.53	6.25	3.91	50.00
	40.63	39.06	12.50	7.81	
	34.67	62.50	100.00	100.00	
H	49	15	0	0	64
	38.28	11.72	0.00	0.00	50.00
	76.56	23.44	0.00	0.00	
	65.33	37.50	0.00	0.00	
Total	75	40	8	5	128
	58.59	31.25	6.25	3.91	100.00

Statistics for Table of INOCULO by HISTO

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	3	22.5533	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Square	3	27.7168	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	21.4884	<.0001
Phi Coefficient		0.4198	
Contingency Coefficient		0.3870	
Cramer's V		0.4198	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test
Table Probability (P)
Pr <= P

Sample Size = 128

INOCULO vs Imunoistoquímica

The FREQ Procedure

Table of INOCULO by IHQ

INOCULO	IHQ				
Frequency					
Percent					
Row Pct					
Col Pct	ausente	leve	moderada	severa	Total
C	28	26	6	4	64
	21.88	20.31	4.69	3.13	50.00
	43.75	40.63	9.38	6.25	
	35.90	65.00	100.00	100.00	
H	50	14	0	0	64
	39.06	10.94	0.00	0.00	50.00
	78.13	21.88	0.00	0.00	
	64.10	35.00	0.00	0.00	
Total	78	40	6	4	128
	60.94	31.25	4.69	3.13	100.00

Statistics for Table of INOCULO by IHQ

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	3	19.8051	0.0002
Likelihood Ratio Chi-Square	3	23.8091	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	18.9099	<.0001
Phi Coefficient		0.3934	
Contingency Coefficient		0.3661	

Cramer's V 0.3934

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Fisher's Exact Test
Table Probability (P) 1.183E-06
Pr <= P 4.961E-05

Sample Size = 128

Anexo 5 - Tabela de contingência comparando as linhagens utilizadas (Balb/C, C-57 Black 6, DB-A e Swiss) com a intensidade da lesão histológica e imuno-histoquímica (ausente, leve, moderada e severa).

LINHAGEM VS HISTOPATOLOGIA

The FREQ Procedure

Table of LINHA by HISTO

LINHA	HISTO					
Frequency,						
Percent						
Row Pct						
Col Pct	ausente	leve	moderada	severa	Total	
Balb	24	8	0	0	32	
	18.75	6.25	0.00	0.00	25.00	
	75.00	25.00	0.00	0.00		
	32.00	20.00	0.00	0.00		
C 57	22	9	1	0	32	
	17.19	7.03	0.78	0.00	25.00	
	68.75	28.13	3.13	0.00		
	29.33	22.50	12.50	0.00		
DBA	8	17	5	2	32	
	6.25	13.28	3.91	1.56	25.00	
	25.00	53.13	15.63	6.25		
	10.67	42.50	62.50	40.00		
Swiss	21	6	2	3	32	
	16.41	4.69	1.56	2.34	25.00	
	65.63	18.75	6.25	9.38		
	28.00	15.00	25.00	60.00		
Total	75	40	8	5	128	
	58.59	31.25	6.25	3.91	100.00	

Statistics for Table of LINHA by HISTO

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	9	27.8667	0.0010
Likelihood Ratio Chi-Square	9	31.3685	0.0003
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	7.7338	0.0054
Phi Coefficient		0.4666	
Contingency Coefficient		0.4228	
Cramer's V		0.2694	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

Statistics for Table of LINHA by HISTO

Fisher's Exact Test
Table Probability (P) 7.854E-11
Pr <= P 2.778E-04

Sample Size = 128

LINHAGEM vs Imunoistoquímica

The FREQ Procedure

Table of LINHA by IHQ

LINHA	IHQ				Total
Frequency,					
Percent					
Row Pct					
Col Pct	ausente	leve	moderada	severa	
Balb	25	7	0	0	32
	19.53	5.47	0.00	0.00	25.00
	78.13	21.88	0.00	0.00	
	32.05	17.50	0.00	0.00	
C 57	23	9	0	0	32
	17.97	7.03	0.00	0.00	25.00
	71.88	28.13	0.00	0.00	
	29.49	22.50	0.00	0.00	
DBA	9	17	4	2	32
	7.03	13.28	3.13	1.56	25.00
	28.13	53.13	12.50	6.25	
	11.54	42.50	66.67	50.00	
Swiss	21	7	2	2	32
	16.41	5.47	1.56	1.56	25.00
	65.63	21.88	6.25	6.25	
	26.92	17.50	33.33	50.00	
Total	78	40	6	4	128
	60.94	31.25	4.69	3.13	100.00

Statistics for Table of LINHA by IHQ

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	9	26.0821	0.0020
Likelihood Ratio Chi-Square	9	29.9124	0.0005
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	7.8908	0.0050
Phi Coefficient		0.4514	
Contingency Coefficient		0.4114	
Cramer's V		0.2606	

WARNING: 50% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.

LINHAGEM vs Imunoistoquímica

The FREQ Procedure

Statistics for Table of LINHA by IHQ

Fisher's Exact Test

Table Probability (P)	4.241E-10
Pr <= P	4.926E-04

Sample Size = 128