

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINARIA
Colegiado dos cursos de Pós-Graduação**

**FLUIDO ORAL PARA DETECÇÃO DE EXPOSIÇÃO À *Lawsonia
intracellularis* EM SUÍNOS NATURALMENTE INFECTADOS**

Javier Alberto Barrera Zarate

**Belo Horizonte
2017**

Javier Alberto Barrera Zarate

FLUIDO ORAL PARA DETECÇÃO DE EXPOSIÇÃO À *Lawsonia intracellularis* EM SUÍNOS NATURALMENTE INFECTADOS

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais
Requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal
Área: Patologia Animal
Orientador: Prof. Dr. Roberto Mauricio
Carvalho Guedes

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária-UFMG
2017**

B272f Barrera Zarate, Javier Alberto, 1984-
Fluido oral para detecção de exposição à *Lawsonia intercellularis* em suínos naturalmente infectados / Javier Alberto Barrera Zarate. – 2017.

58 p. : il.

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

1 Suíno – Doenças – Teses. 2. Intestinos – Doenças – Teses. 3. Anticorpos – Teses.
4. Sorologia veterinária – Teses. 5. Patologia veterinária – Infecção – Teses. I. Guedes,
Roberto Maurício Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. III. Título.

CDD – 636. 408 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

JAVIER ALBERTO BARRERA ZARATE

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovada em 28 de Abril de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes
Presidente - Orientador

Profª. Zélia Inês Portela Lobato
Escola de Veterinária - UFMG

Prof. João Paulo Amaral Haddad
Escola de Veterinária - UFMG

Drª. Núbia Resende Macêdo
Doutorado - UFMG

If you don't pay the price for success,
you will pay the price for failure
Zig Ziglar

Success is no accident.
It is hard work, perseverance, learning,
studying, sacrifice and most of all,
love of what you are doing or learning to do.
Pele

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, inteligência e muita força para superar todas as dificuldades. Gracias.

Aos meus pais, meu irmão, minha irmã, meu cunhado e minhas sobrinhas Isabela e Juliana por todo o amor, educação e apoio.

Muito especialmente, quero agradecer ao meu orientador Prof. Roberto Mauricio Carvalho Guedes, pela disponibilidade, amizade, PACIÊNCIA, dedicação, ensinamentos e profissionalismo ... um Muito Obrigado.

Agradeço aos professores da Patologia, Natalia Ocarino, Rogeria Serakides, Felipe Pierezan, Renato de Lima, Roselene Ecco e Lorena Rocha. Pelos ensinamentos, apoio, amizade e conselhos.

A meus professores em Colômbia, Jose Dario Mogollon, Maria Antonia Rincon e Nestor Mossos. Pelas orientações, oportunidades, momentos de dedicação e apoio. Vocês me ensinaram que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Aos queridos e grandes amigos e companheiros de pós-graduação que tive a oportunidade de conhecer e conviver durante os dois anos de mestrado, Mariana R (Segunda irmã), Camila C (mini pig), Karina, Amanda V (uai - fofocas), Mariane W (mais fofocas), Agna F (risadas), Carlos P, Beatriz (vamos fingir que a gente está normal), Luisa, Thais, Sato, Lucas, Amanda G, Thaire, Ricardo, Dyeime, Pamela, Daniel, Sostenes, Luis S, etc.... E meus amigos em Colômbia por seu constante apoio, Paula Bermudez, Paola Daza, Brayan Fonseca.

A todos os estudantes de graduação que conheci durante o mestrado, vocês foram grandes amigos, companheiros e colegas. Obrigado a todos vocês pelos bons momentos juntos, pelas risadas, pelas brincadeiras, por tudo. Aos times de Futsal de VeterinariaAquacultura e Shakhtar da UFMG, obrigado pela amizade e os excelentes jogos. SUCESSOS para todos vocês.

Finalmente quero agradecer a minha avó Maria Eva (in memoriam), você foi uma segunda mãe para mim, infelizmente eu não pude me despedir, eu já estava muito longe e não consegui te dar um último abraço. Você sempre esteve comigo e sei que ainda está. Obrigado por tudo! Saudades.

RESUMO

A enteropatia proliferativa suína, causada pela bactéria *Lawsonia intracellularis*, é uma doença intestinal difundida mundialmente que acomete várias espécies animais, entre elas o suíno, causando episódios de diarreia, perda de peso e morte dos animais. Diferentes meios diagnósticos *ante-mortem* têm sido implementados na detecção desta doença com o objetivo de prevenir e controlar a bactéria nas granjas suínas. Experimentalmente foi demonstrada em suínos a utilidade do fluido oral (FO) na detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis*. Para demonstrar a utilidade do FO para diagnóstico ao nível de campo foram utilizadas 15 granjas das quais se coletaram amostras de soro e fezes de 20 animais de 5 faixas etárias distintas, bem como amostras de fluido oral de duas baias por faixa etária. Amostras de soro e FO foram testadas pela imunoperoxidase em monocamadas de células para a detecção de Imunoglobulina G e A. Apresentou-se uma similaridade entre a técnica de PCR e IgG no FO em 4 das 5 idades avaliadas. Demonstrou-se a detecção simultânea no soro e FO de Imunoglobulina G que ocorreu principalmente em granjas que apresentavam sinais clínicos sugestivos ou característicos de enteropatia proliferativa suína. Esses resultados demonstram a utilidade do FO na detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis* como possível ferramenta diagnóstica e de monitoramento da enteropatia proliferativa suína, particularmente em rebanhos com quadros clínicos sugestivos da doença.

Palavras-chave: enteropatia proliferativa suína, IPMC, sorologia, fluido oral, anticorpos, suínos.

ABSTRACT

Porcine proliferative enteropathy, caused by the bacterium *Lawsonia intracellularis*, is a widespread intestinal disease that affects several animal species, including swine, causing episodes of diarrhea, weight loss and death. Different ante mortem diagnostic methods have been used for the diagnosis of this disease to guide the implementation of preventive and control measures at the pig farms. Experimentally, the usefulness of oral fluid (OF) in detecting anti-*L. intracellularis* antibodies has been demonstrated in swine. To demonstrate the utility of the OF as a diagnostic method in the field, 15 pig farms were studied. Serum and fecal samples were collected from 20 animals of 5 different age groups, and OF samples collected from animals in two pens at the same age groups. Serum and OF samples were analyzed by immunoperoxidase in monolayer assay for the detection of Immunoglobulin G and A. A similarity was found between PCR and IgG in OF in four of the five ages evaluated. Simultaneous detection in serum and OF of immunoglobulin G was observed mainly in farms showing suggestive or characteristic clinical signs of porcine proliferative enteropathy, demonstrating the usefulness of the OF in the detection of anti-*L. intracellularis* antibodies as a possible diagnostic tool for monitoring of Porcine proliferative enteropathy, mainly in herds with clinical signs compatible with the disease.

Key words: Porcine proliferative enteropathy, IPMA, serology, oral fluid, antibodies, pigs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1. Enteropatia Proliferativa Suína	11
3.1.1. Etiologia	11
3.1.2. Características da Doença	11
3.1.3. Epidemiologia	14
3.1.4. Diagnóstico	14
3.2. Fluido Oral	16
3.2.1. Fluido Oral em Suínos	17
3.2.2. Detecção de anticorpos no fluido oral de suínos	17
3.2.3. Detecção de agentes infecciosos no fluido oral	19
3.2.4. Implementação de testes com fluido oral em produções suínas	19
3.2.5. Processo de coleta de fluido oral	19
3.2.6. Aplicações do diagnóstico de fluido oral em medicina veterinária	20
4. MATERIAL E METODOS	21
4.1. Seleção dos animais e coleta das amostras	21
4.2. Obtenção de sangue e processamento através da técnica IPMC	22
4.3. Obtenção de fluido oral e processamento através da técnica IPMC	23
4.4. Obtenção de matéria fecal e processamento através da técnica PCR	24
4.5. Análises estatísticas	24
5. RESULTADOS	26
5.1. Considerando todas as granjas	26
5.2. Granjas sem sinais clínicos	27
5.3. Granjas com sinais clínicos sugestivos de EPS	28
5.4. Granja com sinais clínicos característicos da forma aguda de EPS	30
5.5. Análise temporal de positividade nos testes	34
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9. ANEXO	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise McNemar. Valores de “P”, na relação sorologia vs IgG no FO, sorologia vs IgA no FO, PCR vs IgG no FO e PCR vs IgA no FO nas 15 granjas avaliadas.

Tabela 2: Análise McNemar. Valores de “P”, na relação sorologia vs IgG no FO, sorologia vs IgA no FO, PCR vs IgG no FO e PCR vs IgA no FO em granjas com sinais clínicos.

Tabela 3: Resultados das 15 granjas avaliadas para a detecção de IgG em sorologia, IgG em FO, IgA em FO e PCR nas 5 diferentes idades.

Tabela 4: Porcentagem de Detecção na análise temporal de positividade de Kaplan Meier.

Tabela 5: Resultados da regressão de Cox avaliando as curvas de sobrevivência de cada teste

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Suíno, intestino delgado, íleo. Macroscopia de adenomatose intestinal suína. Espessamento da mucosa intestinal e formação de membrana pseudo-diftérica. Fonte: Carlos E. Real Pereira.

Figura 2: Suíno, intestino delgado, íleo. Macroscopia de enteropatia proliferativa hemorrágica suína. Engrossamento da serosa intestinal com conteúdo sanguinolento. Fonte: Prof. Roberto Guedes.

Figura 3: Resultados dos testes de sorologia (IgG), fluido Oral (IgG e IgA) e PCR das 15 granjas avaliadas nas 5 diferentes idades.

Figura 4: Resultados de Sorologia IgG, Fluido Oral IgG e IgA e PCR das 6 granjas sem sinais clínicos de EPS nas 5 diferentes idades.

Figura 5: Resultados dos testes de Sorologia (IgG), Fluido Oral (IgG e IgA) e PCR em amostras de 9 granjas com sinais clínicos sugestivos de EPS nas 5 diferentes idades.

Figura 6: **A.** amostra de FO de baixa positiva à detecção de IgG anti-*L. intracellularis* no IPMC. **B.** amostra de FO de baixa positiva à detecção de IgA anti-*L. intracellularis* no IPMC. Observa-se morfologia bem definida de bactérias no citoplasma e entre células McCoy infectadas *in vitro* (Microscópio óptico, 40X).

Figura 7: Resultados de Sorologia IgG e PCR dos 20 animais amostrados e resultados de Fluido Oral para IgG e IgA por baía na granja com sinais clínicos característicos de EPS aguda nas 5 diferentes idades.

Figura 8: Análises de temporal de positividade de Kaplan Meier. 1 = início de creche, 2 = final de creche, 3 = recria, 4 = início de terminação, 5 = pré-abate.

1. INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa suína (EPS), comumente chamada ileíte é uma doença infecciosa entérica causada pela bactéria intracelular obrigatória *Lawsonia intracellularis*. A EPS é uma das enfermidades entéricas mais importantes economicamente na indústria suína em todo o mundo (Lawson e Gebhart, 2000). A doença é caracterizada macroscopicamente pelo espessamento da mucosa do intestino delgado e em algumas ocasiones do intestino grosso (Rowland e Lawson, 1992). Na histopatologia, é evidente a hiperplasia do epitélio das criptas com a ausência de células caliciformes (Ward e Winkleman, 1990). A EPS tem três formas comuns de apresentação. A forma crônica, observada comumente em animais de crescimento e caracterizada por diarreia e redução do ganho de peso. A forma aguda que se apresenta em animais mais velhos e é caracterizada por fezes sanguinolentas e casos de morte súbita (Lawson e Gebhart, 2000). A forma subclínica que prejudica o ganho de peso nos animais e tem um impacto epidemiológico importante nas produções suínas (Jacobson *et al.*, 2010).

Antigamente, o diagnóstico de EPS era baseado nos sinais clínicos da doença e nas lesões macroscópicas e microscópicas típicas no intestino delgado. Atualmente, existem vários métodos diagnósticos *post-mortem* e *ante-mortem* com diferentes sensibilidades e especificidades que vêm sendo utilizados para identificar *L. intracellularis* (Kroll *et al.*, 2005). Entre os testes *ante-mortem* estão as provas sorológicas, que são métodos relativamente baratos, de fácil interpretação e indicam a exposição dos suínos à bactéria, provendo informação necessária para estabelecer o estado epidemiológico de EPS em sistemas de produção suínas e gerando dados necessários para definir protocolos de medicação ou vacinação em rebanhos afetados (Guedes *et al.*, 2002a).

A imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) é um método sorológico de fácil interpretação, com especificidade de 100% e sensibilidade de 89% (Guedes *et al.*, 2002a). É uma ferramenta utilizada na elaboração do soroperfil da enfermidade, indicando a idade em que os animais tiveram contato com a bactéria (Guedes *et al.*, 2002a). Esta técnica é usada rotineiramente no laboratório de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, detectando IgG sérica anti-*L. intracellularis*.

Além do soro como fonte de anticorpos para o diagnóstico de *L. intracellularis* em suínos, foi demonstrado por Gabardo (2015), em suínos experimentalmente inoculados, que o FO também pode ser usado na detecção de anticorpos contra esta bactéria, usando a técnica de IPMC.

O FO é constituído por água, transudatos do sistema circulatório e secreções originárias das glândulas salivares maiores e menores da cavidade oral (Prickett e Zimmerman, 2010). Tendo em conta a conexão que existe entre o sistema circulatório com os capilares da mucosa oral e as glândulas salivares, o uso desse fluido corporal como meio diagnóstico de diferentes doenças tem sido amplamente implementado em humanos e animais (Kaufman e Lamster, 2002; Nagler *et al.*, 2002; Prickett e Zimmerman, 2010).

No caso de diagnóstico de doenças através de FO em granjas suínas, a coleta dessa amostra clínica oferece diversas vantagens em relação ao soro. Considerando o comportamento de suínos, a coleta deste tipo de amostragem é fácil e rápida, não sendo necessário material especial de coleta, além não causar estresse nos animais (Lima *et al.*, 2010; Schaefer *et al.*, 2013; White *et al.*, 2014). Em suínos, este tipo de amostragem tem sido útil na detecção de agentes virais e bacterianos (Stallnecht *et al.*, 1999; Prickett *et al.*, 2008b; Morioka *et al.*, 2009; Casagrande *et al.*, 2010; Detmer *et al.*, 2011; Dekker *et al.*, 2012) e na detecção de anticorpos específicos contra diferentes patógenos (Corthier e Aynaud 1977; DeBuysscher e Dubois, 1978; DeBuysscher e Berman, 1980; Loftager *et al.*, 1993; Pacheco *et al.*, 2010; Kittawornrat *et al.*, 2013; Panyasing *et al.*, 2013; Gabardo *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

Tendo em conta que recentemente foi demonstrado experimentalmente que animais inoculados com a bactéria *L. intracellularis*, bem com animais naturalmente infectados sob condições experimentais controladas, apresentaram anticorpos anti-*L. intracellularis* em FO através da técnica de IPMC, os objetivos deste estudo foram:

1. Determinar a funcionalidade do FO na detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis* em condições de campo.

2. Avaliar a utilidade Do FO como ferramenta de diagnóstico e de avaliação da cinética da infecção de *L. intracellularis* a campo, comparando com os resultados de IPMC de amostras de soro.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Enteropatia Proliferativa Suína

3.1.1. Etiologia

A *L. intracellularis* é uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, microaerófila, móvel (Lawson e McOrist, 1993) com 1,25 a 1,75 µm de comprimento e 0,25 a 0,43 µm de largura (McOrist *et al.*, 1995). A doença é caracterizada pela hiperplasia e proliferação das criptas intestinais devido à colonização da bactéria em enterócitos imaturos (Smith e Lawson, 2001), resultando em espessamento da mucosa do intestino delgado (Bae *et al.*, 2013).

A enfermidade é mais comumente encontrada em suínos (Kroll *et al.*, 2005) mas há estudos que descrevem a bactéria como causa de enfermidades em ampla variedade de hospedeiros (França *et al.*, 2008), incluindo primatas não humanos (Klein *et al.*, 1999), hamster (Frisk e Wagner, 1977), ratos (Vandenberghe *et al.*, 1982), cães (Collins *et al.*, 1983), cavalos (Williams *et al.*, 1996), coelho (Umemura *et al.*, 1982), furão (Fox *et al.*, 1994), raposas (Eriksen e Landsverk, 1985), ovelhas (Chalmers e Pritchard, 1990), veados (Drolet *et al.*, 1996), emus (Lemarchand *et al.*, 1997) e avestruzes (Cooper *et al.*, 1997). *L. intracellularis* nunca foi identificada em problemas entéricos em humanos, portanto não é considerada uma doença zoonose (McOrist *et al.*, 2003; Michalski *et al.*, 2006).

3.1.2. Características da doença

Como mencionado anteriormente, a EPS tem três formas de apresentação. A forma crônica, conhecida como adenomatose intestinal suína, observada mais comumente em animais de crescimento entre 6 e 20 semanas de idade (McOrist e Gebhart, 1999), caracteriza-se clinicamente como anorexia, diarreia, letargia, redução do ganho de peso (Lawson e Gebhart, 2000) e mortalidade baixa, que quando ocorre, resulta principalmente da bacteremia secundária causada por organismos oportunistas (Winkelman e Dee, 1996). A forma aguda, também conhecida como enteropatia proliferativa hemorrágica, acomete animais mais velhos, de 4 a 12 meses (McOrist e Gebhart, 1999), afetando suínos de terminação e animais de reposição, marrãs e cachaços (Vannucci e Gebhart, 2014),

Caracteriza-se por perda intestinal de sangue e fezes enegrecidas (Lawson e Gebhart, 2000) podendo resultar na morte de 50% dos animais afetados (Jacobson *et al.*, 2010) ou casos de morte súbita (Lawson e Gebhart, 2000). Tem sido recentemente descrita uma nova forma subclínica de EPS (McOrist *et al.*, 2003), onde o único sinal clínico observado nos animais atingidos é a baixa taxa de crescimento, levando a perdas econômicas nos sistemas de produção (Jacobson *et al.*, 2010). Além da perda econômica relativa a diminuição do ganho de peso em animais afetados, existe também importância epidemiológica desta forma subclínica relacionado a disseminação do agente (McOrist e Gebhart, 2012).

Macroscopicamente, as lesões características da EPS são normalmente encontradas no intestino delgado e com menor frequência no intestino grosso (Rowland e Lawson, 1992). A forma crônica consiste em espessamento da mucosa intestinal, enterite necrotizante com presença de membrana necrótica aderida à mucosa e serosa intestinal com aspecto cerebroide (Fig. 1) (Rowland e Hutchings, 1978; Knittel, 1999; Lawson e Gebhart, 2000; Vannucci e Gebhart, 2014). Na forma aguda, as lesões são caracterizadas por edema e espessamento da parede intestinal, proliferação acentuada da mucosa (McOrist e Gebhart, 1999) e necrose da superfície da mucosa com formação de membranas diftéricas e coágulos na luz intestinal (Fig. 2) (Ward e Winkelman, 1990).



Figura 1: Suíno, intestino delgado, íleo. Macroscopia de adenomatose intestinal suína. Espessamento da mucosa intestinal e formação de membrana pseudo-difébrica. Fonte: Carlos E. Real Pereira.

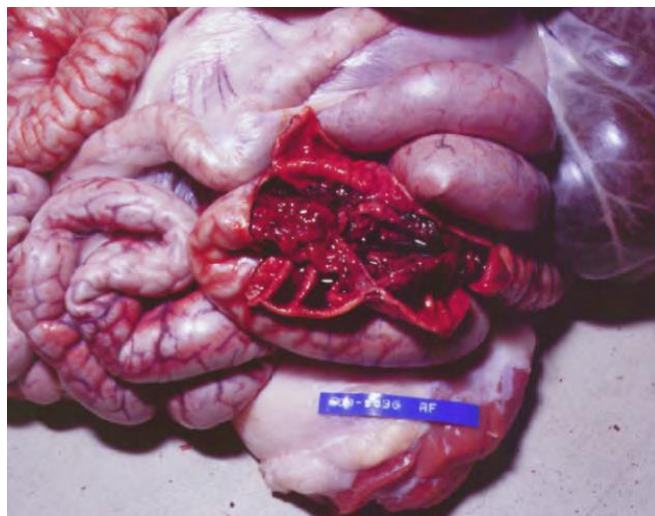


Figura 2: Suíno, intestino delgado, íleo. Macroscopia de enteropatia proliferativa hemorrágica suína. Engrossamento da serosa intestinal com conteúdo sanguinolento. Fonte: Prof. Roberto Guedes.

À histologia, as características são as mesmas para todas as formas de EPS. Observa-se proliferação do epitélio das criptas no intestino delgado e a presença da bactéria no citoplasma apical de enterócitos que pode ser demonstrada por coloração pela prata (Rowland e Lawson, 1974). No epitélio atingido há presença de abundantes figuras mitóticas e ausência de células caliciformes (Lawson e Gebhart, 2000). Há acúmulo de células epiteliais imaturas induzindo a dilatação da luz das criptas intestinais (McOrist e Gebhart, 1999). A infiltração de células inflamatórias não é um achado característico de EPS (Rowland e Lawson, 1992).

3.1.3. Epidemiologia

EPS é uma enfermidade endêmica com uma ampla distribuição internacional em sistemas de produção suína e com um impacto econômico importante, associado com a redução do ganho de peso, baixa eficiência da conversão alimentar, além da mortalidade e custo da medicação (McOrist *et al.*, 1997a; Bae *et al.*, 2013). EPS é considerada a doença de maior importância econômica em diversas regiões suínícolas na Europa (Jacobson *et al.*, 2003) e nos Estados Unidos (Winkelman *et al.*, 1996).

Em países com expressiva produção de suínos, a prevalência da doença em rebanhos é elevada. Entre os mais importantes estão os Estados Unidos com 96% (Mcortis *et al.*, 2003), Austrália

100% (Holyoake *et al.*, 2010), Japão 94% (McOrist, 2005), China 57% (Wu *et al.*, 2014) e Dinamarca 93.7% (Stege *et al.*, 2000). No Brasil, Moreno *et al.* (2002), através da PCR, acharam uma prevalência de 30%, (16% em Minas Gerais, 20% no Paraná, 25% no Rio Grande do Sul, 35% em Santa Catarina, 37% em São Paulo, 40% em Goiás e 40% no Mato Grosso do Sul). Num estudo de Resende *et al.*, (2015), demonstrou-se através de um estudo sorológico uma prevalência de 100% em rebanhos de suínos do estado de Minas Gerais.

Diferentes fatores contribuem na prevalência e impacto econômico da EPS nas granjas. Particularmente, os meios de propagação e transmissão do agente (fezes contaminadas, fômites ou vectores mecânicos), tipo de instalações que dificultam a limpeza das fezes (Guedes, 2004), idade e raça dos animais, tipo de manejo da granja (vacinação, aplicação de antibióticos e uso de desinfetantes) e o sistema de produção (Kroll, 2005).

3.1.4. Diagnóstico

Os procedimentos de rotina para o diagnóstico *post-mortem* de EPS são realizados através dos achados macroscópicos no intestino delgado (Jordan *et al.*, 1999), coloração de rotina de Hematoxilina-Eosina em fragmentos intestinais demonstrando as alterações proliferativas nas criptas do intestino delgado (Rowland, 1978), coloração especial Warthin-Starry que permite a visualização da bactéria nos cortes histológicos (Jensen *et al.*, 1997) e as técnicas de imuno-histoquímica e imuno-fluorescência que permitem a detecção do agente em fragmentos de tecido intestinal (Knittel *et al.*, 1997).

Entretanto, as técnicas diagnósticas *ante-mortem* de EPS são importantes na prevenção, monitoramento e controle dessa doença (Magtoto *et al.*, 2014). Entre estes testes está a reação em cadeia da polimerase (PCR) que é um método altamente específico na detecção de DNA em amostras de matéria fecal (Jones *et al.*, 1993a) e é usado para demonstrar a liberação ativa de *L. intracellularis* através das fezes em animais com presença ou ausência de sinais clínicos ou lesões macroscópicas no intestino (Jordan *et al.*, 1999). A PCR tem demonstrado uma baixa sensibilidade (Guedes *et al.*, 2002) devido ao fato da técnica ser incapaz de detectar suínos excretando pouca quantidade bactérias e de forma intermitente, podendo ocasionar resultados falsos negativos (Knittel *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1999). Outra causa para a baixa sensibilidade na PCR são os fatores inibitórios que são

encontrados naturalmente nas fezes e que podem interferir com os resultados da técnica (Jacobson *et al.*, 2003).

Outro meio diagnóstico *ante-mortem* amplamente utilizado são os testes sorológicos. Essas técnicas fornecem informação histórica da infecção dos animais com a bactéria (Guedes, 2004) e são uma ferramenta diagnóstica utilizada para avaliar a cinética da infecção em grupos de animais e estabelecer soroperfis necessários para formulação de estratégias de vacinação ou medicação em rebanhos com problemas de EPS (Walter *et al.*, 2004).

Entre os testes sorológicos convencionais para a detecção de anticorpos contra *L. intracellularis*, citam-se o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Holyoake *et al.*, 1994), a imunofluorescência indireta (IFA) (Knittel *et al.*, 1998) e a Imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) (Guedes *et al.*, 2002a). Essa última técnica, segundo Magtoto *et al.*, (2014), é o padrão ouro para o diagnóstico de EPS, apesar de que a preparação das placas seja complexa.

IPMC tem uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 89% em soros com uma diluição 1:30, demonstrando ser uma ferramenta apropriada para o diagnóstico em rebanhos, mas não para o diagnóstico de indivíduos (Guedes *et al.*, 2002a). A técnica é de fácil de interpretação, a cor da reação é estável por vários meses dando um registro permanente dos resultados que podem ser armazenados por longo tempo. Além disso, diferente da IFA, a IPMC tem a vantagem de não precisar de microscópio fluorescente (Guedes *et al.*, 2002ab) e em relação com a ELISA, a IPMC é uma técnica mais econômica para o diagnóstico de EPS.

No diagnóstico de EPS através do IPMC em amostras de soro, o anticorpo detectado é a Imunoglobulina G (IgG) (Guedes *et al.*, 2002a). A detecção deste anticorpo também foi demonstrada no FO, em suínos experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*, onde a IPMC demonstrou uma sensibilidade de detecção de 88.46% para IgG e, neste mesmo estudo, também foi possível detectar Imunoglobulina A (IgA) com uma sensibilidade de 84.62% (Gabardo, 2015). Esta detecção foi possível já que o FO possui uma composição semelhante ao soro e tem a capacidade de refletir a concentração dos anticorpos séricos (Wang *et al.*, 2002). Testes a campo, com infecções naturais ainda haviam sido realizadas.

3.2. Fluido Oral

Independentemente da espécie, o FO é originado a partir das glândulas salivares e do sistema circulatório (Prickett e Zimmerman, 2010) e é constituído principalmente por água e uma mistura de produtos orgânicos e inorgânicos com funções biológicas importantes relacionadas com a lubrificação, atividade antimicrobiana, limpeza, formação do bolo alimentar, mastigação e digestão (Dodds *et al.*, 2005; Llena-Puy, 2006).

A composição do FO é influenciada diretamente por alterações locais na cavidade oral ou indiretamente por alterações sistêmicas no organismo. Tendo em conta a conexão que existe entre as glândulas salivares e capilares da mucosa oral com o sistema circulatório do animal, o FO é uma ferramenta diagnóstica útil na detecção de enfermidades (Kaufman e Lamster, 2002; Greabu *et al.*, 2009). Por esta razão, o FO tem sido descrito como “espelho da saúde do corpo” (Greabu *et al.*, 2009) já que nele é possível a detecção de anticorpos (Pacheco *et al.*, 2010), vírus (Detmer *et al.*, 2011), hormônios (Yates *et al.*, 2010), proteínas de fase aguda (Gutiérrez *et al.*, 2009) e outros componentes do soro.

Nos mamíferos, as glândulas salivares variam em tamanho, localização e estrutura (Shackleford e Wilborn, 1968) e a formação do FO varia entre essas glândulas (Prickett e Zimmerman, 2010). Um suíno adulto produz cerca de 15 litros de FO por dia (Zeng *et al.*, 2017), proveniente das três principais glândulas salivares que são a parótida, mandibular e sublingual e das glândulas salivares menores localizadas como lóbulos dispersos na região da mucosa e submucosa bucal, labial, palatal e lingual (Stembírek *et al.*, 2012).

3.2.1. Fluido oral em suínos

Em suínos, o primeiro relato da utilização do FO como amostra diagnóstica foi realizado por Corthier e Aynaud (1977) que, através da inoculação intranasal e intramuscular com o vírus da peste suína clássica, detectaram respostas de anticorpos mensuráveis no soro e no FO. Posteriormente, foram publicados diferentes trabalhos detectando a presença de anticorpos (DeBuysscher e Berman, 1980; Loftager *et al.*, 1993; Pacheco *et al.*, 2010; Kittawornrat *et al.*, 2013; Panyasing *et al.*, 2013) ou patógenos (Morioka *et al.*, 2009; Detmer *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2012) em amostras de FO nessa espécie.

Como a técnica de diagnóstico utilizando amostras de FO tem sido extensivamente estudada, a definição desse termo está bem estabelecida. Assim, "saliva total" representa o fluido obtido por expectoração e "fluido oral" é definido como o fluido obtido através de coletores absorventes na cavidade oral (Atkinson *et al.*, 1993). Como as amostras de suínos são coletadas com cordas, podemos definir então que amostras utilizadas para diagnóstico são fluido oral.

Amostras de FO têm sido utilizadas recentemente como meio diagnóstico de rotina e tem sido amplamente aceitas por veterinários e produtores de suínos (White *et al.*, 2014), como White *et al.* (2014) que demonstraram rápida evolução do uso desse tipo de amostra no laboratório de diagnóstico veterinário da Universidade Estadual de Iowa, nos Estados Unidos, onde 10.329 testes em amostras de FO suíno foram realizadas em 2010, seguido de 32.544, 60.172 e 94.011 em anos subsequentes

3.2.2. Detecção de anticorpos no fluido oral de suínos

No suíno, cinco classes de imunoglobulinas (Ig) têm sido reconhecidas: IgM, IgA, IgG, IgE e IgD (Butler e Brown, 1994). Sendo IgA, IgG e IgM consideradas como as três principais classes de imunoglobulinas e IgE e IgD encontrando-se numa menor proporção (Butler *et al.*, 2006). A medição dessas Igs nos suínos podem ser realizadas em diferentes fluidos corporais e fornecem informação importante sobre o status imunocompetente dos animais (Escribano *et al.*, 2012).

A produção local de anticorpos IgM, IgA e IgG na cavidade oral, ocorre nas glândulas salivares e no tecido linfóide associado aos ductos das glândulas salivares (Brandtzaeg, 2007), mas a principal fonte de anticorpos no FO é através da difusão passiva a partir do sistema circulatório para a cavidade oral, através de capilares que se encontram abaixo do epitélio da mucosa oral (Brandtzaeg, 2007; Naumova *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram a utilidade do FO na detecção de anticorpos específicos contra várias doenças suínas, tais como, Peste Suína Clássica (Corthier e Aynaud 1977), *Escherichia coli* (DeBuysscher e Dubois, 1978), *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 2 (Loftager *et al.*, 1993), vírus da Febre Aftosa (Pacheco *et al.*, 2010), vírus do Síndrome Respiratório e Reprodutivo Suíno (Kittawornrat *et al.*, 2013), vírus da Influenza A (Panyasing *et al.*, 2013), vírus da Gastroenterites Transmissível, onde foi avaliada a resposta secretória imune avaliando a concentração de IgA, IgM e

IgG no soro e FO em suínos inoculados com o vírus e que posteriormente demonstraram a detecção destes anticorpos nos fluidos corporais avaliados (DeBuysscher e Berman, 1980) e *L. intracellularis* (Gabardo, 2015), esse último em condições de indução experimental da enfermidade. A concentração de anticorpos é dependente do estado de saúde do animal, sendo assim, animais doentes possuem uma concentração maior de imunoglobulinas totais em FO comparado a animais saudáveis (Escribano *et al.*, 2012).

Os anticorpos podem permanecer estáveis em amostras de FO de suínos a 4°C por pelo menos 12 dias ou por período indeterminado desde que as amostras sejam congeladas a -10°C. Em temperaturas mais elevadas, o FO sofre uma diminuição dos títulos detectáveis de anticorpos (Prickett *et al.*, 2010)

De acordo com um estudo de Olsen *et al.*, (2013), a composição dos anticorpos no FO é influenciada pelo material de coleta. Foram testadas cordas de algodão, cânhamo e nylon na identificação de IgA, IgM e IgG e demonstrou-se que as concentrações de IgM e IgA são mais baixas quando é utilizada a corda de algodão, mas que, independentemente do material de coleta, as concentrações de IgG não são alteradas.

3.2.3. Detecção de agentes infecciosos no fluido oral

Diferentes agentes virais de suínos têm sido detectados em amostras de FO sob condições experimentais e de campo. Vírus da estomatite vesicular foi isolado a partir de FO, mas não do soro (Stallnecht *et al.*, 1999), vírus da febre aftosa (Morioka *et al.*, 2009), vírus Síndrome Respiratório e Reprodutivo Suíno (Prickett *et al.*, 2008b), circovírus Suíno tipo II (Prickett *et al.*, 2008b) e o vírus Influenza (Detmer *et al.*, 2011).

Assim como para vírus, há estudos utilizando amostras de FO como fonte de detecção de bactérias, por exemplo, *Streptococcus suis* (Dekker *et al.*, 2012.) e *Helicobacter* spp (Casagrande *et al.*, 2010).

3.2.4. Implementação de testes com fluido oral em produções suínas

Em suínos, a utilização de amostras de FO vem sendo estudada como uma alternativa ao soro sanguíneo em testes diagnósticos utilizados para estudos epidemiológicos em granjas. A utilização

do FO para o monitoramento das doenças oferece algumas vantagens distintas sobre o soro. Considerando o bem-estar animal, o uso do FO representa um método não invasivo de amostragem que causa o mínimo de desconforto e estresse ao animal e o coletor (Lima *et al.*, 2010; White *et al.*, 2014). Isto se justifica pelo comportamento naturalmente curioso dos suínos (Schaefer *et al.*, 2013), os quais têm uma preferência especial por objetos que são mastigáveis, flexíveis e destrutíveis (Van de Weerd *et al.*, 2003) como a corda de algodão, com a que os animais interagem e brincam e, com isso, depositam o FO na mesma (Schaefer *et al.*, 2013). Testes já padronizados para amostras de FO em suínos incluem PCR (Prickett *et al.*, 2008a), ELISA (Prickett *et al.*, 2008a; Sattler *et al.*, 2015) e IFA (Prickett, 2008b).

3.2.5. Processo de coleta de fluido oral

Os materiais necessários para coleta de FO em suínos são cordas de 100% algodão, sacos plástico transparentes limpos e resistentes (ziploc®), tubos cônicos de plástico de 5 – 50 ml e uma tesoura (Schaefer *et al.*, 2013). As amostras de fluido oral são coletadas coletivamente amarrando as cordas em locais de fácil acesso aos animais, de tal forma que a altura das mesmas atinja o topo do dorso dos suínos (Prickett *et al.*, 2008), mantendo as pontas desfiadas para facilitar sua apreensão. As cordas devem ser firmemente amarradas em locais nos quais não entrem em contato com o piso, comedouros ou bebedouros (Schaefer *et al.*, 2013).

A definição do número de cordas a serem amarradas por baía é proporcional ao número de animais, sendo recomendado uma corda para cada 10 suínos ou uma corda por baía, as quais são expostas aos suínos para mastigação por 20-30 minutos, ou até os animais perderem o interesse (Prickett *et al.*, 2008; Schaefer *et al.*, 2013). Segundo White *et al.* (2014), para suínos treinados, que já tiveram exposição prévia a amostragem de FO, é recomendado um período de exposição à corda de 20 minutos, a fim de assegurar a participação de aproximadamente 70% dos animais em baias com 25 a 30 suínos. Animais sem experiência prévia a amostragem de FO (suínos não treinados) recomenda-se um período de exposição de 60 minutos para atingir um nível semelhante de participação. No mesmo estudo, foi comprovado que só uma experiência de coleta é suficiente para o treinamento (White *et al.* 2014). Após a mastigação, a parte molhada da corda é inserida no saco plástico e o FO é extraído da corda através de compressão manual. Posteriormente, o saco é fechado,

e o canto inferior do mesmo é cortado e o FO é coletado no tubo plástico de 5mL ou 50ml (Schaefer *et al.*, 2013).

Normalmente são coletados 4 a 8mL de FO que devem ser mantidos refrigerados para o transporte até o laboratório onde serão centrifugadas. Caso não seja possível centrifugar as amostras, é importante deixar os tubos em repouso a 4°C, durante 8-12 horas permitindo a sedimentação de sujidades e restos celulares presentes (Schaefer *et al.*, 2013).

3.2.6. Aplicações do diagnóstico de fluido oral em medicina veterinária

A criação de programas de vigilância para o monitoramento de rotina em populações suínas utilizando amostras de FO facilita a coleta rápida de dados em situações de controle, detecção e erradicação de surtos de doenças endêmicas ou exóticas em suínos a nível regional ou nacional (Prickett e Zimmerman, 2010). Esses programas podem ser facilmente integrados em protocolos de vigilância de rotina nas granjas (White *et al.*, 2014), já que as coletas são realizadas em baias e, conseqüentemente, um maior número de suínos é amostrado, reduzindo o custo da mão de obra (Schaefer *et al.*, 2013). Além disso, como demonstrado anteriormente, não é necessário equipamento especial para a coleta de FO, sendo um método prático que não causa estresse aos animais e as coletas podem ser repetidas várias vezes (Ramirez *et al.*, 2012). Assim, o objetivo com a utilização dessa técnica é melhorar o diagnóstico e detecção de diferentes agentes infecciosos utilizando intervenções adequadamente cronometradas e direcionadas em populações suínas (Prickett e Zimmerman, 2010; White *et al.*, 2014).

Além do desenvolvimento e padronização dos métodos de coleta e otimização dos ensaios diagnósticos para diversos patógenos de interesse em suínos, é importante continuar promovendo a investigação desse tipo de meio diagnóstico em medicina veterinária, tendo em conta a capacidade do FO de formular diagnósticos sensíveis e específicos que proporcionam o acesso a dados de doenças infecciosas em tempo real (Prickett e Zimmerman, 2010) e aumentar a eficiência na relação custo-benefício da vigilância em rebanhos suínos (Ramirez *et al.*, 2012), melhorando a prestação de serviços de gestão de saúde por parte dos veterinários em populações animais (Prickett e Zimmerman, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos animais e coleta das amostras

O estudo foi realizado no estado de Minas Gerais, Brasil, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo # 370/2015).

Entre junho de 2015 e agosto de 2016 foram coletadas amostras de suínos de 15 granjas comerciais em sistema de criação confinado, com ciclo completo ou múltiplos sítios, com fluxo de produção estável e uniforme, e que possuíam entre 500 e 3000 matrizes.

Todas as granjas amostradas possuíam histórico de diagnóstico de EPS no passado e foram classificadas de acordo com a presença ou não de sinais clínicos compatíveis com a doença no momento da coleta. Esta classificação foi baseada em informações fornecidas pelos veterinários responsáveis técnicos de cada granja. A partir disto, foram utilizadas 6 granjas sem sinais clínicos, 9 granjas com animais apresentando baixa taxa de crescimento e diarreia sugestiva da doença e 1 dessas granjas coletadas apresentou animais com baixa taxa de crescimento e casos de diarreia sanguinolenta característica da forma aguda de EPS nas idades de início de terminação e pré-abate. Não havia a expectativa de negatividade em nenhuma granja amostrada já que existe grande circulação do agente na região (Resende *et al.*, 2015).

Em cada granja foram amostrados individualmente 100 animais de cinco faixas etárias distintas (20 animais/faixa etária), sendo elas: início de creche (21 a 35 dias de vida), final de creche (49 a 64 dias), recria (77 a 91 dias), início de terminação (105 a 120 dias) e pré-abate (140 a 155 dias de idade). Foram obtidas amostras individuais de sangue e fezes de um total de 1500 animais, considerando-se 15 a 20% de prevalência esperada da doença e intervalo de confiança de 95% (Straw *et al.*, 1999).

As amostras de fluído oral (FO) foram coletadas nas mesmas baias onde foram colhidas amostras de soro e matéria fecal dos animais, de duas baias, nas mesmas faixas etárias listadas anteriormente, obtendo-se um total de 150 baias amostradas no estudo.

As amostras de soro e de fezes foram processadas pelas técnicas de IPMC e PCR, respectivamente, e seus resultados foram comparados com os resultados das amostras de FO, que também foram testadas pela técnica de IPMC.

4.2. Obtenção de sangue e processamento através da técnica de IPMC

Para a coleta de sangue, foram utilizadas seringas de 10mL e agulhas descartáveis e estéreis. O sangue foi coletado da fossa jugular direita e, posteriormente, centrifugado a 1000g por 10 minutos para a obtenção do soro, que foram em seguida armazenados a -20°C até serem testados pela técnica de IPMC (Guedes *et al.*, 2002a). Brevemente, foram utilizadas placas de cultura de 96 poços contendo Células McCoy (fibroblastos de rato, ATCC# CRL-1696; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) infectadas com *L. intracellularis*. Em cada poço foi adicionado 70 microlitros de células McCoy (5×10^3 células/ml), que posteriormente foram mantidas em estufa em atmosfera de CO₂, a 37°C até a inoculação, 24 horas depois, com *L. intracellularis*. Essa bactéria foi obtida previamente de suíno infectado com a forma hemorrágica da doença (cepa PHE/MN1-00) (Guedes e Gebhart, 2003a) a que foi adicionada DMEM (Dulbecco's modified Eagle's – JRH Lenxa, KS), com 7% de soro fetal bovino (SFB). Cem microlitros dessa preparação foram adicionados em cada poço com a cultura de McCoy, previamente preparada.

As placas foram incubadas por cinco dias em concentração de gás contendo 8% de O₂, 8,8% de CO₂ e 83,2% N₂ e temperatura de 37°C. Finalmente, foi usada solução de acetona e metanol (1:1) para fixar as células infectadas após este período, adicionando 70 microlitros em cada poço. As placas fixadas foram mantidas a -20°C até sua utilização.

As placas de 96 poços com cultura de células McCoy e infectadas com *L. intracellularis* foram hidratadas com água destilada por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, 50µl dos soros a serem testados, diluídos 1:30 em PBS 1X (salina de tampão fosfato; pH 7,2), foram adicionados aos poços. A placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C e, posteriormente, lavada vigorosamente 4 vezes com PBS 1X. O anticorpo anti-IgG suíno (Sigma-Aldrich Biochemical Co, St Louis, Missouri) foi diluído 1:600 em IPMC buffer (PBS com 2.5% soro fetal bovino, 1% soro de coelho, e 0.08% Tween 80) e, posteriormente, foi adicionado 30µl dessa solução em cada poço e incubado por 45 minutos a 37°C em câmara úmida escura. A placa foi novamente lavada com PBS 1X. Em seguida, foi adicionado em cada poço 100 µl da solução reveladora constituída de 9,5 ml de tampão acetato (ácido acético

glacial; acetato de sódio), 0,5 ml de AEC (3-amino-9-etil-carbazol) e 5µl de peróxido de hidrogênio e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Depois as placas foram lavadas 4 vezes com água destilada e deixadas na estufa por 20 minutos a 37°C, para posterior observação em microscópio óptico invertido. Soros de suínos sabidamente positivos e negativos foram utilizados como controles em cada placa (Guedes *et al.*, 2002a).

A leitura dos resultados foi feita em microscópio invertido de luz clara. A amostra foi considerada positiva se fossem encontradas bactérias marcadas no citoplasma das células McCoy e/ou no meio extracelular.

4.3. Obtenção de FO e processamento através da técnica de IPMC

Para a coleta do FO, foram utilizadas cordas de algodão de 70 cm de comprimento e 5 mm de espessura que foram amarradas no interior das baías por aproximadamente 20 a 30 minutos para obtenção de aproximadamente 10 ml de FO por baía. O FO foi extraído torcendo a parte úmida da corda em um saco plástico e transferido para um tubo cônico de 50 ml. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1000 g por 20 minutos e armazenado a -20°C até serem testadas pela técnica de IPMC modificado (Gabardo, 2015). Brevemente, placas de 96 poços com cultura de células McCoy infectadas com *L. intracellularis* foram hidratadas com PBS Tween 0,05% (salina de tampão fosfato com 0,05% de Tween 20, e pH ajustado para 7,2) por 10 minutos a 37 °C e logo o PBS Tween 0,05% foi descartado. Cinquenta microlitros de FO não diluído foi adicionado em cada poço. A placa foi incubada por 45 minutos a 37 °C e depois lavada vigorosamente 4 vezes com PBS 1X. O anticorpo anti-IgG ou anti-IgA suíno foi diluído 1:100 em PBS Tween 0,05% e, posteriormente, adicionado 30µl da solução em cada poço e incubado por 45 minutos a 37°C. A placa foi novamente lavada com PBS 1X. Logo, foi adicionado em cada poço 100 µl da solução reveladora constituída de 9,5 ml de tampão acetato, 0.5 ml de AEC e 5µl de H₂O₂ e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Depois as placas foram lavadas 4 vezes com água destilada e deixadas na estufa por 20 minutos a 37°C para posterior observação em microscópio óptico invertido. FO de suínos sabidamente positivos e negativos foram utilizados como controles em cada placa (Guedes *et al.*, 2002a).

4.4. Obtenção de Matéria Fecal e processamento através da técnica de PCR

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos mesmos animais utilizados para a coleta de sangue (mínimo de 2grs de fezes foi coletado de cada animal) e armazenado em microtubos de 1,5ml, para posterior extração de DNA.

O DNA foi extraído das amostras fecais utilizando Kit comercial (PSP Stool DNA Spin Kit, Molecular STRATEC). A partir do DNA extraído foi realizada a reação de PCR para a detecção de ácido nucléico da *L. intracellularis*, segundo descrito por Jones *et al.* (1993).

4.5. Análise estatística

Para a realização desse estudo foi estimada uma prevalência de 34,7%, com erro de 25%, nível de confiança de 95% e população em nível rebanho de 1500 granjas no estado de Minas Gerais (Resende *et al.*, 2015). Percebe-se que o erro esperado foi ampliado por não se tratar especificamente de um inquérito populacional, mas de um processo de validação de métodos diagnósticos, optamos por utilizar este processo amostral para possibilitar que uma composição mais próxima da realidade possível dessa amostragem seja utilizada como parâmetro do processo de validação, aumentando consideravelmente a validação externa do estudo. Utilizando uma amostra aleatória simples para o cálculo deste nível da amostragem, verificou-se a necessidade de utilização de no mínimo 13 granjas para estimar a prevalência. Optamos por utilizar 15 granjas como margem de segurança do estudo. No nível animal foram utilizados os dados de sensibilidade (89%), especificidade (100%), tamanho médio da população de cada estrato da propriedade em 1.000 animais, 20 animais por faixa etária (5 faixas etária, 100 animais por granja). A sensibilidade de rebanho calculada para uma prevalência de rebanho de 20% foi de 98,1%, utilizando a rotina HerdPlus do site EpiTools (<http://epitools.ausvet.com.au/>). Para fluido oral utilizando o mesmo raciocínio acima, foi definido apenas duas baias por faixa etária por granja, visto que a baia é considerada “pool” de material de vários animais (no mínimo 6 animais) reduzindo a variância do resultado.

A análise estatística dos diferentes testes diagnósticos foi executada através do teste estatístico de McNemar (McNemar, 1947; Klingenberg e Agresti, 2006), que avalia a concordância e semelhança entre os testes diagnósticos em cada faixa etária, considerando que valores de $P > 0.05$ indicam semelhança diagnóstica entre os testes avaliados e valores de $P < 0.05$ demonstram que os testes

avaliados não apresentam similaridade. Nas análises de McNemar, primeiramente, a sorologia foi implementada como padrão ouro e, posteriormente, a PCR. Também foi usado o teste de Kaplan-Meier (KM) (Kaplan & Meier, 1958), que estima a probabilidade da ocorrência de um evento em um período de tempo determinado. Nesse estudo, o evento foi considerado o momento em que um teste detecta animais positivos na sorologia ou na PCR ou baias positivas no caso de amostras de FO. Dessa forma, o teste possibilitou a comparação entre a positividade de cada teste diagnóstico em cada uma das faixas etárias mencionadas anteriormente. A unidade experimental para todas as comparações dos testes foi a baia, considerando a baia positiva quando pelo menos um animal era positivo na sorologia, ou na PCR, ou a amostra de FO coletada da baia positiva era positiva para IgG ou IgA contra *L. intracellularis*.

O teste de Kaplan-Meier foi utilizado para elaborar uma curva de redução de negatividade para cada teste diagnóstico. Consequentemente, essas curvas foram comparadas e interpretadas através da análise estatística de Regressão de Cox (Cox, 1972), que identifica ou não a relação e concordância entre os diferentes testes diagnósticos usados no estudo e sua capacidade de detectar animais ou baias positivas nas granjas ao longo do tempo.

5. RESULTADOS

5.1. Considerando todas as granjas

Na sorologia, que detecta IgG sérica anti-*L. intracellularis*, animais positivos surgiram a partir da fase de recria em 2 granjas e no início da terminação em 12 granjas. Na fase de pré-abate, todas as 15 granjas apresentaram animais sorologicamente positivos (Fig. 3).

Testando o FO, detectaram-se baias positivas para IgG a partir do início de creche em 8 baias, na fase final da creche em 4 baias, na fase da recria em 4 baias, no início da terminação em 12 baias e no período pré-abate em 10 baias. A detecção de IgA em FO foi observada em apenas 2 baias no final de creche e no período de pré-abate (Fig. 3). Os resultados positivos para FO que se apresentaram foi sempre nas duas baias coletadas em todas as faixas etárias.

A PCR detectou a eliminação de bactéria pelas fezes inicialmente na fase final de creche e na recria em 1 granja. No início de terminação foram 5 granjas positivas e em pré-abate 5 granjas foram positivas (Fig. 3).

Usando o teste McNemar, na fase de recria observou-se uma similaridade entre os testes de sorologia e IgG no FO, com um valor $P = 1,0$. Nas fases de início de terminação e pré-abate os valores de P foram de 0,0045 e 0,000, respectivamente, demonstrando que a probabilidade de semelhança entre os testes de sorologia e IgG em FO foi baixa nessas faixas etárias. Na relação da sorologia com IgA no FO, observou-se uma similaridade entre os testes no que se refere as baias negativas, nas idades de início de creche e final de creche com valores de P de 1,0 e 0,1573, respectivamente (Tab. 1), sem significado diagnóstico relevante.

Ainda usando o teste McNemar, foi observada similaridade entre o teste de PCR e IgG no FO nas idades de final de creche, recria, início de terminação e pré-abate com valores de 0,1573, 0,6547, 0,4142 e 0,7630, respectivamente. Comparando PCR com IgA no FO a similaridade apresentou-se nas fases de final de creche, recria e pré-abate com valores 1,0, 0,0833 e 0,0578, respectivamente (Tab. 1).

Tabela 1. Análise McNemar. Valores de “P”, na relação sorologia vs IgG no FO, sorologia vs IgA no FO, PCR vs IgG no FO e PCR vs IgA no FO nas 15 granjas avaliadas.

	Início de creche	Final de creche	Recria	Início de terminação	Pré-abate
IgG Soro vs IgG FO	0,0047	0,0455	1,0000	0,0045	0,0000
IgG Soro vs IgA FO	1,0000	0,1573	0,0455	0,0000	0,000
PCR vs IgG FO	0,0047	0,1573	0,6547	0,4142	0,7630
PCR vs IgA FO	1,0000	1,0000	0,0833	0,0143	0,0578

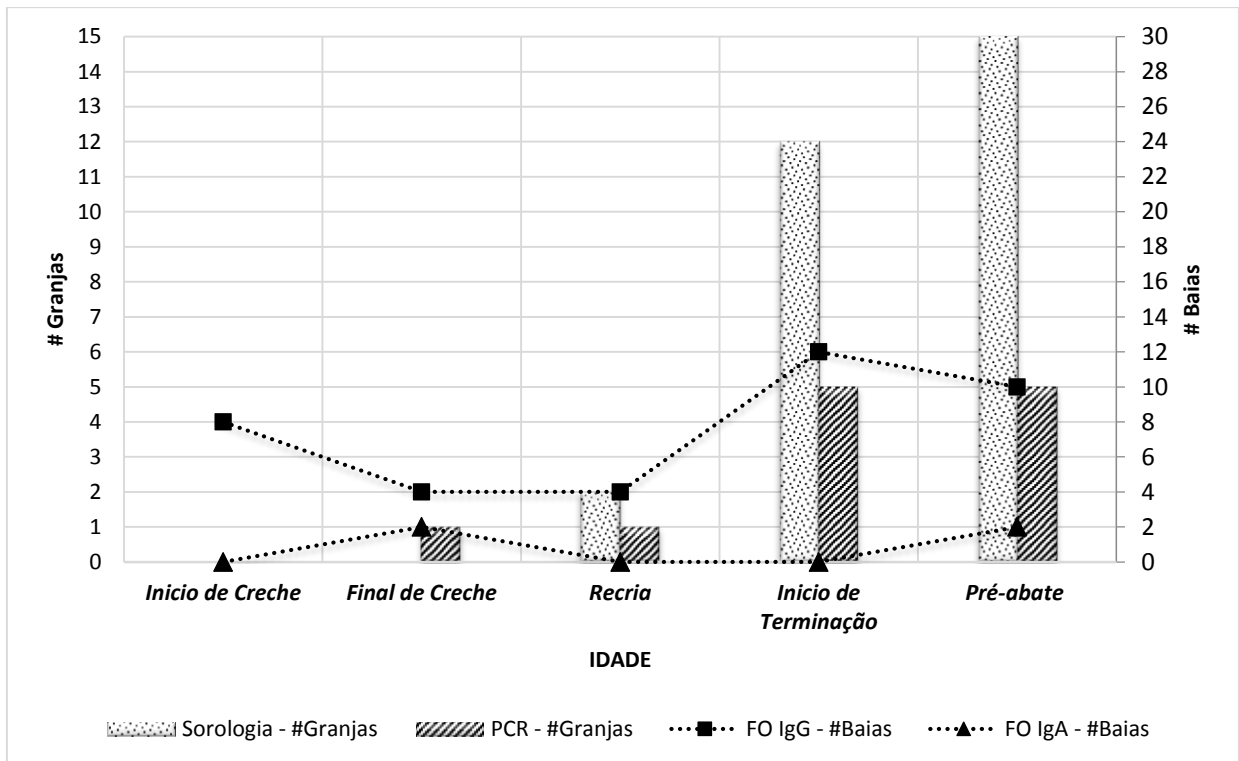


Figura 3. Resultados dos testes de sorologia (IgG), fluido Oral (IgG e IgA) e PCR das 15 granjas avaliadas nas 5 diferentes idades.

5.2. Granjas sem sinais clínicos

Das 6 granjas sem sinais clínicos de EPS no dia da coleta, a soroconversão iniciou no início da terminação em 4 delas e, no período pré-abate, todas as 6 granjas foram positivas. A detecção de IgG em FO foi positiva no início da creche em 4 das 12 baias, e em 2 baias nos períodos de final de creche, recria e pré-abate, não sendo detectada nenhuma positividade no início de terminação. Não houve detecção de IgA em FO em nenhuma baia. Na PCR, animais do período pré-abate de 2 granjas foram positivos (Fig. 4).

Dessas granjas, somente uma apresentou resultados positivos coincidentes por faixa etária entre a detecção de IgG em soro e IgG em FO na idade de pré-abate (Tab. 3).

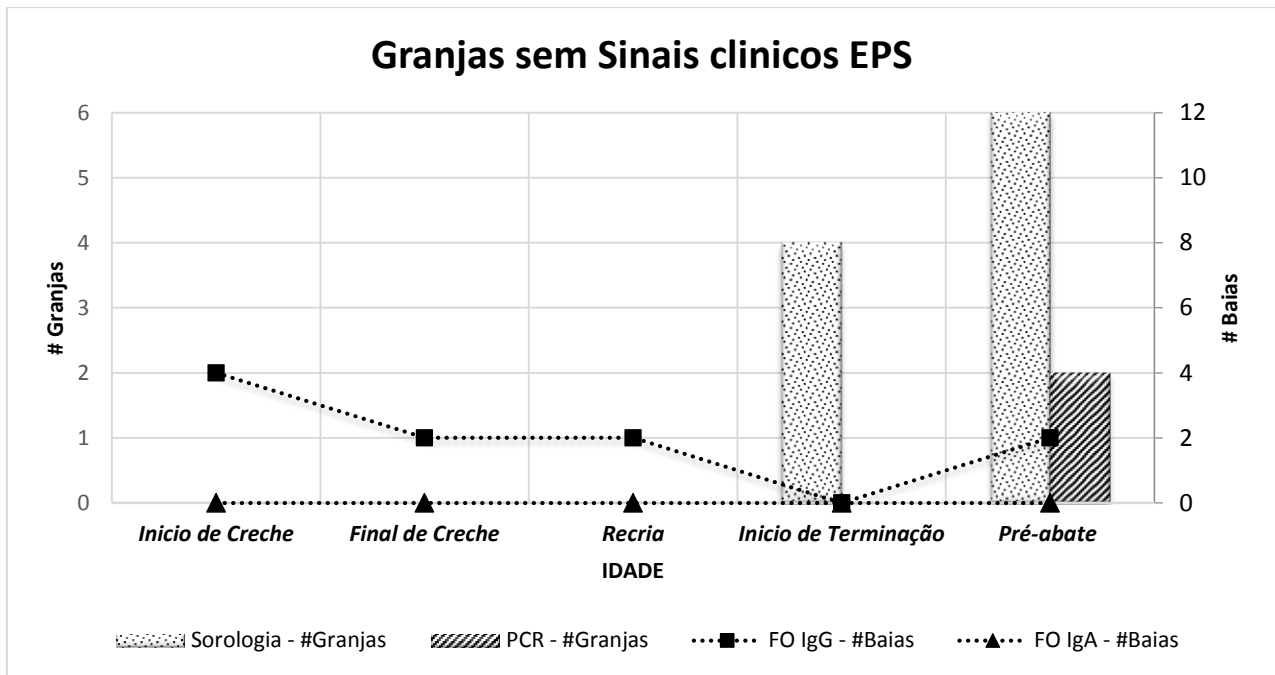


Figura 4. Resultados de Sorologia IgG, Fluido Oral IgG e IgA e PCR das 6 granjas sem sinais clínicos de EPS nas 5 diferentes idades.

5.3. Granjas com sinais clínicos sugestivos de EPS

Já em relação as 9 granjas com sinais clínicos sugestivos de EPS (baixa taxa de crescimento e diarreia) que se apresentou principalmente nas idades de início de terminação e pré-abate, a sorologia apresentou positividade nas fases de recria em 2 das 9 granjas, no início da terminação em 8 granjas e em todas as granjas no período de pré-abate. A detecção de IgG no FO foi positiva no início da creche em 4 das 18 baias, em duas baias nas fases final da creche e na recria, 12 baias positivas no início de terminação e oito no período pré-abate. Para IgA no FO foi detectada apenas em 2 baias na fase final da creche e 2 baias na fase de pré-abate. Na PCR foi detectado DNA da *L. intracellularis* em 1 granja na fase final da creche, na recria houve detecção em 1 granja, no início da terminação em 5 granjas e, no período pré-abate, em 3 granjas (Fig. 5).

Nessas granjas, apresentou-se detecção simultânea de IgG em soro e IgG em FO na fase da recria em 1 granja, na terminação em 6 granjas e no período pré-abate em 3 granjas (Tab. 3).

No teste McNemar, na idade de recria e início de terminação os valores P de 0,7055 e 0,0956, respectivamente, demonstram similaridade entre os testes de sorologia e IgG no FO. Na comparação entre sorologia com IgA no FO, observou-se uma similitude entre os testes baseado em baias negativas, nas idades de início de creche e final de creche com valores de P 1,000 e 0,1573 respectivamente (Tab. 2), que não representa relevância diagnóstica.

Ainda no teste de McNemar, observou-se similaridade entre o teste de PCR e IgG no FO nas idades de final de creche, recria e início de terminação com valores de 0,1573, 0,6547 e 0,0833 respectivamente. Comparando PCR com IgA no FO a similaridade foi nas fases de final de creche, recria e início de terminação com valores 1,0, 0,0833 e 0,0833 respectivamente.

Tabela 2. Análise McNemar. Valores de “P”, na relação sorologia vs IgG no FO, sorologia vs IgA no FO, PCR vs IgG no FO e PCR vs IgA no FO em granjas com sinais clínicos.

	Início de creche	Final de creche	Recria	Início de terminação	Pré-abate
IgG Soro vs IgG FO	0,0047	0,0455	0,7055	0,0956	0,0002
IgG Soro vs IgA FO	1,0000	0,1573	0,0833	0,0001	0,0000
PCR vs IgG FO	0,0047	0,1573	0,6547	0,0833	0,0253
PCR vs IgA FO	1,0000	1,0000	0,0833	0,0833	0,0082

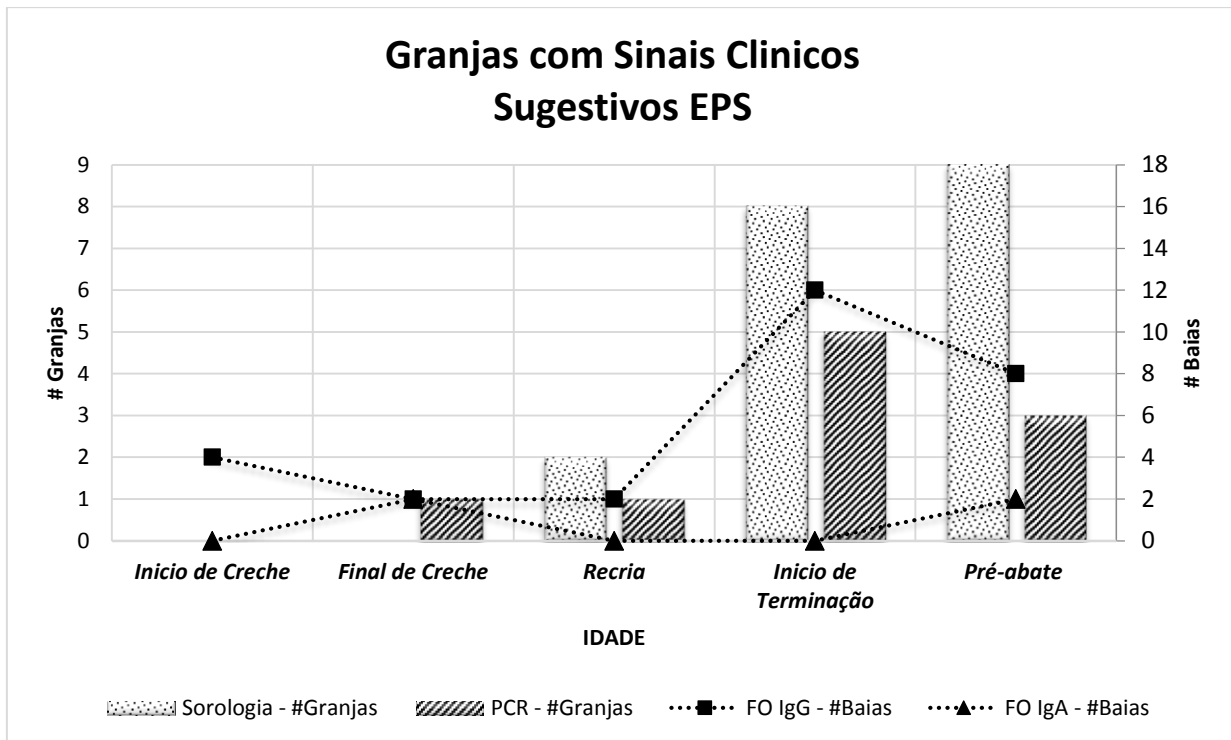


Figura 5. Resultados dos testes de Sorologia (IgG), Fluido Oral (IgG e IgA) e PCR em amostras de 9 granjas com sinais clínicos sugestivos de EPS nas 5 diferentes idades.

5.4. Granja com sinais clínicos característicos da forma aguda de EPS

Nessa Granja, dois animais de 20 foram soropositivos na fase de recria, 12 animais no início de terminação e todos os animais amostrados no período pré-abate. No FO, a IgG e IgA foram detectadas nas duas baias no período pré-abate (Fig. 6). Na PCR foram positivos 6 animais no início de terminação (Fig. 7).

Nessa granja apresentou-se detecção simultânea de IgG no soro, IgG no FO e IgA no FO no período pré-abate (Tab. 3).

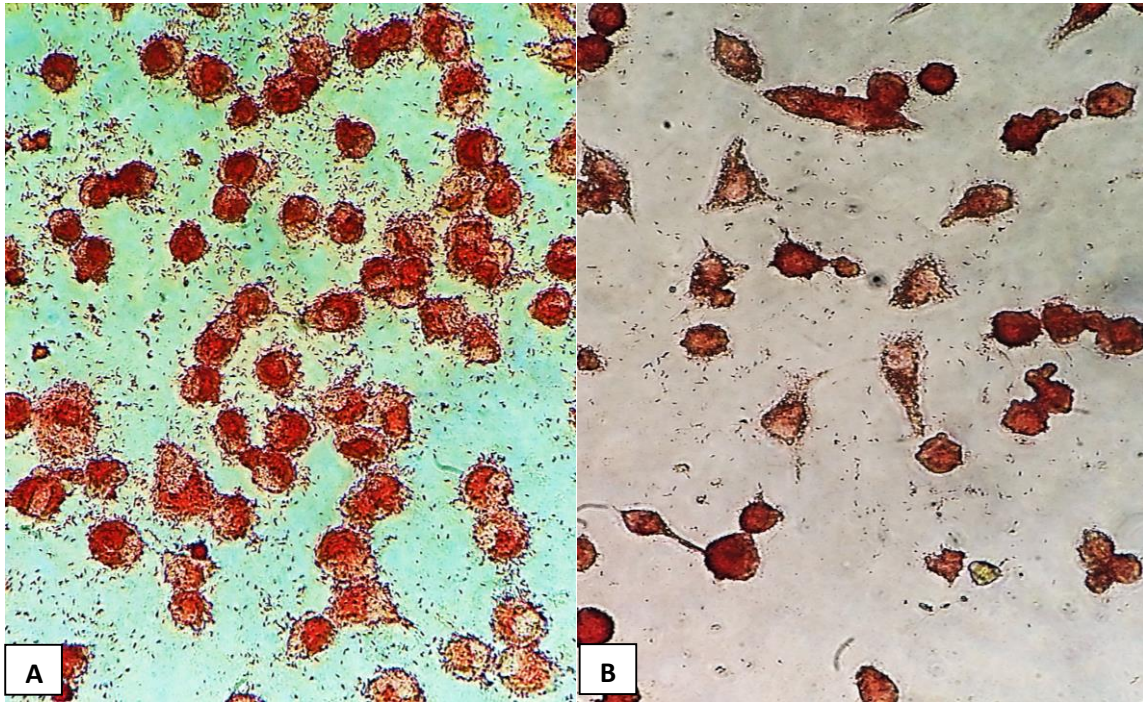


Figura 6. **A.** amostra de FO de baía positiva à detecção de IgG anti-*L. intracellularis* no IPMC. **B.** amostra de FO de baía positiva à detecção de IgA anti-*L. intracellularis* no IPMC. Observa-se morfologia bem definida de bactérias no citoplasma e entre células McCoy infectadas *in vitro* (Microscópio óptico, 40X).

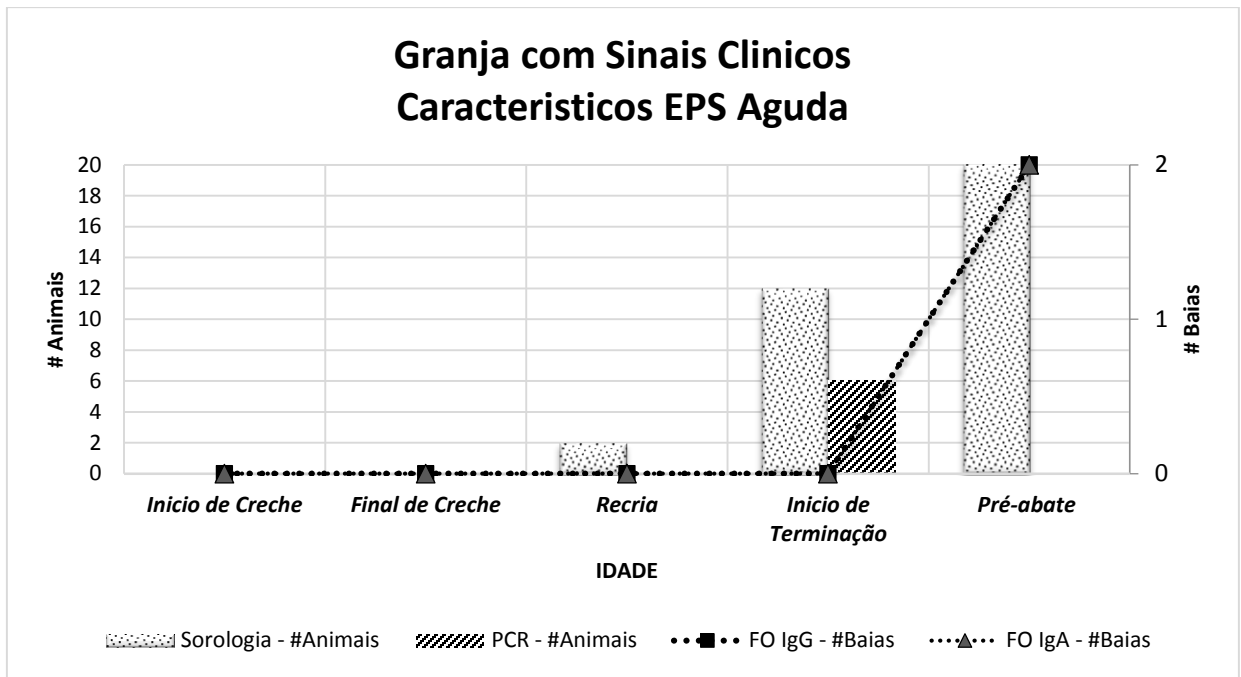


Figura 7. Resultados de Sorologia IgG e PCR dos 20 animais amostrados e resultados de Fluido Oral para IgG e IgA por baía na granja com sinais clínicos característicos de EPS aguda nas 5 diferentes idades.

Tabela 3. Resultados das 15 granjas avaliadas para a detecção de IgG em sorologia, IgG em FO, IgA em FO e PCR nas 5 diferentes idades.

# Granja	Categoria Granja	Início de creche (21 a 35 dias)				Final de creche (49 a 63 dias)				Recria (77 a 91 dias)				Início terminação (105 a 119 dias)				Pré-abate (140a 154 dias)			
		Sorologia	FO IgA	FO IgG	PCR	Sorologia	FO IgA	FO IgG	PCR	Sorologia	FO IgA	FO IgG	PCR	Sorologia	FO IgA	FO IgG	PCR	Sorologia	FO IgA	FO IgG	PCR
1	H	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	4/20	-	-	0/10	15/20	-	-	6/10
2	H	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	14/20	-	-	0/10	15/20	-	-	0/10
3	H	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	18/20	-	-	0/10
4	H	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	13/20	-	+	0/10
5	H	0/20	-	+	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	11/20	-	-	0/10	18/20	-	-	0/10
6	H	0/20	-	+	0/10	0/20	-	+	0/10	0/20	-	+	0/10	11/20	-	-	0/10	19/20	-	-	1/10
7	D	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	13/20	-	+	1/10	20/20	-	+	0/10
8	D	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	11/20	-	+	3/10	20/20	-	-	0/10
9	D	0/20	-	-	NT	0/20	-	-	NT	0/20	-	-	NT	8/20	-	-	NT	5/20	-	+	NT
10	D	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	0/20	-	+	2/10	10/20	-	-	8/10
11	D	0/20	-	-	NT	0/20	-	-	NT	0/20	-	-	NT	16/20	-	+	NT	6/20	-	-	NT
12	D	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	1/20	-	-	5/10	8/20	-	+	4/10	9/20	-	-	9/10
13	D	0/20	-	+	0/10	0/20	-	+	2/10	0/20	-	-	0/10	1/20	-	-	0/10	6/20	-	+	5/10
14	D	0/20	-	+	0/0	0/20	+	-	0/10	0/20	-	+	0/10	9/20	-	+	0/10	13/20	-	-	0/10
15*	D	0/20	-	-	0/10	0/20	-	-	0/10	2/20	-	-	0/10	12/20	-	-	6/10	20/20	+	+	0/10

H = Granja com Histórico EPS, D = Granja com Sinais Clínicos EPS representados por diarreia, # animais positivos / # animais amostrados, NT = Não Testado, (-) = Negativo em FO, (+) = Positivo IgG ou IgA em FO, (*) = Granja com sinais clínicos característicos EPS aguda

5.5. Análises temporal de positividade

Na análise temporal de Kaplan Meier de positividade de baias em diferentes testes, observou-se uma proximidade nas porcentagens de detecção nos testes de IgG em soro e IgG em FO nas idades de início de terminação com um 77% no soro e 60% no FO. Na idade de pré-abate, a porcentagem de detecção foi de 100% na sorologia e de 87% na IgG no FO, demonstrando uma relação maior entre estes dois testes nesta última faixa etária. Não houve associação entre os testes de sorologia, IgA em FO e PCR nas 5 diferentes idades. Somente foi observada associação entre IgA em FO e PCR na fase de creche quando não houve positividade nesses testes. (Fig. 8) (Tab. 4).

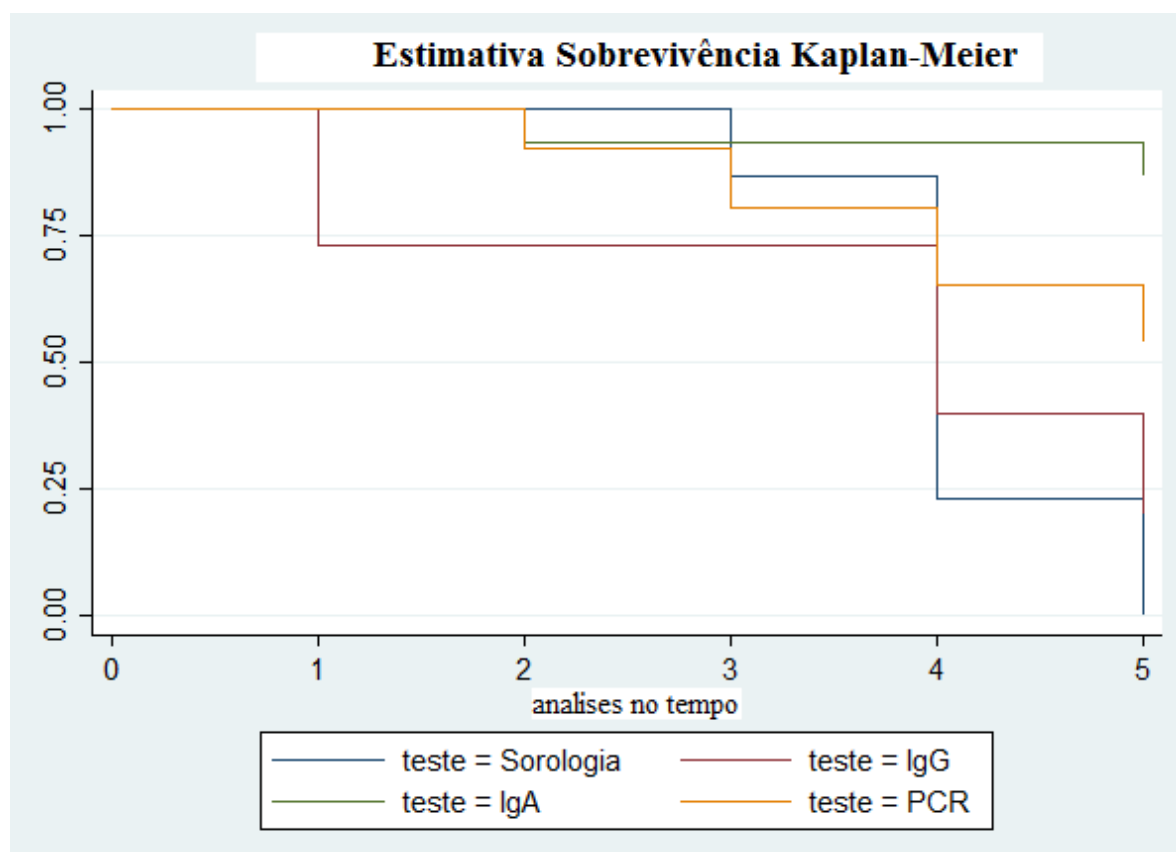


Figura 8. Análises de temporal de positividade de Kaplan Meier. 1 = início de creche, 2 = final de creche, 3 = recria, 4 = início de terminação, 5 = pré-abate.

Tabela 4. Porcentagem de Detecção na análise temporal de positividade de Kaplan Meier

	Início de creche	Final de creche	Recria	Início de terminação	Pré-abate
IgG Serum	0%	0%	13%	77%	100%
IgG FO	27%	27%	27%	60%	87%
IgA FO	0%	6%	6%	6%	20%
PCR	0%	7%	19%	34%	54%

Nos resultados da análise usando a regressão de Cox, a sorologia foi designada como a técnica padrão ouro para o diagnóstico *ante-mortem* de EPS e fez-se a comparação desse teste com à IgG em FO, IgA em FO e à PCR. Determinou-se que, comparados com a sorologia os testes de IgA em FO e PCR apresentaram valores de P de 0,000 e 0,004, respectivamente, indicando que estes dois testes têm diferença significativa e que a similaridade com a sorologia na capacidade de detecção de casos positivos é muito baixa. Ao comparar IgG em FO com a sorologia, o valor de P foi 0.447, demonstrando que este tipo de amostra não apresentou uma diferença significativa com relação à sorologia e que a capacidade diagnóstica de ambas é similar (Tab. 5).

Na regressão de Cox, através do valor Haz ratio, comprovou-se que existe pouca relação diagnóstica da sorologia com IgA em FO e a PCR, já que estes dois testes apresentaram velocidades de detecção mais lentas em relação à sorologia com valores de 91% e 63% respectivamente. Na relação entre sorologia e IgG no FO, a velocidade de detecção foi só do 19% mais lenta, demonstrando um comportamento similar destes dois tipos de amostras na detecção de animais positivos para *L. intracellularis*. (Tab. 5)

Tabela 5. Resultados da regressão de Cox avaliando as curvas de sobrevivência de cada teste

Teste	Haz. Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
IgG	.8104151	.223785	-0.76	0.447	.4716935	1.392371
IgA	.0872445	.0468951	-4.54	0.000	.0304233	.25019
PCR	.3684994	.1276171	-2.88	0.004	.1869185	.726476

6. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo na detecção de anticorpos contra *L. intracellularis* em FO em suínos ao nível de campo utilizando a técnica de IPMC. A técnica de IPMC é uma ferramenta diagnóstica, desenvolvida na University of Minnesota (Guedes *et al.*, 2002a), e utilizada na rotina do laboratório de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG no diagnóstico de EPS detectando IgG em soro. A técnica possui sensibilidade de 89% e especificidade de 100% (Guedes *et al.*, 2002a).

Nenhuma das granjas coletadas implementava protocolo vacinal contra EPS, conseqüentemente, os anticorpos detectados através da IPMC em soro e FO são resposta dos animais a exposição natural à bactéria ou o resultado da transferência passiva de anticorpos maternos no caso dos animais mais jovens.

Animais que tenham tido contato com *L. intracellularis*, desenvolvem anticorpos séricos de IgG específicos contra a bactéria (Walter *et al.*, 2004). Esses anticorpos são interpretados como uma exposição previa dos animais à bactéria já que a soroconversão geralmente acontece duas semanas depois do contato (Guedes *et al.*, 2002d). Posto que *L. intracellularis* é um microrganismo intracelular obrigatório, é pouco provável que a presença IgG sérica participe da defesa contra esta bactéria, diferente de IgA de mucosa e resposta imune celular que têm uma participação mais importante contra infecções de EPS (Guedes *et al.*, 2002d; Guedes *et al.*, 2003). Apesar da IgG não participar na proteção contra a infecção entérica da bactéria, este anticorpo é uma ferramenta útil no diagnóstico de exposição à *L. intracellularis* já que indica uma estimulação imune sistêmica (Guedes, 2004). IgG junto com IgA foram detectados também em amostras de FO em suínos experimentalmente infectados com a bactéria (Gabardo, 2015).

Esses achados de soroconversão na recria, aumentando na terminação e pré-abate são compatíveis com a dinâmica de infecção observada em rebanhos brasileiros é, possivelmente, justificada pelo manejo e uso de antimicrobianos no período de creche (Guedes *et al.*, 2002d; Kroll *et al.*, 2005a; Resende *et al.*, 2015). Esses anticorpos têm uma detecção máxima em animais com 18 a 26 semanas de idade e persistem de 2 a 3 semanas em condições de campo (Guedes *et al.*, 2002d).

A detecção de IgG em FO em 13 granjas e de IgA em 2 das 15 granjas, pode ser explicada pela difusão passiva destes anticorpos a partir do sistema circulatório para a cavidade oral, sendo esta a principal fonte de imunoglobulinas no FO (Brandtzaeg, 2007; Naumova *et al.*, 2013). Os anticorpos que foram detectados no FO nas idades de início de creche e final de creche em 4 das 15 granjas são interpretados como sendo anticorpos maternos, já que este tipo de imunoglobulinas persistem nos animais até as 5 ou 6 primeiras semanas de idade (Guedes *et al.*, 2002d; Kroll *et al.*, 2005a) e os quais apresentaram difusão passiva para a cavidade oral.

A presença da granjas positivas e negativas em FO nas duas primeiras faixas etárias pode ser dependente da quantidade de imunoglobulinas ingeridas e/ou absorvidas através do colostro pelos leitões na maternidade, o que pode influenciar a detecção no IPMC (Guedes *et al.*, 2002d; Kroll *et al.*, 2005a). No presente estudo, na primeira coleta de amostras, anticorpos possivelmente maternos foram somente detectados em FO, enquanto que na sorologia nenhum animal apresentou positividade na creche, sugerindo que possivelmente ocorra uma maior concentração de anticorpos maternos no FO do que no soro.

Nas três últimas faixas etárias amostradas, oito das 11 granjas com resultado positivo de IgG no FO tinham sinais clínicos sugestivos de EPS no momento da coleta. Dessas 8 granjas, 7 apresentaram detecção simultânea de IgG no soro e no FO. Considerando que animais doentes possuem uma concentração maior de imunoglobulinas totais em FO comparado a animais saudáveis (Escribano *et al.*, 2012), podemos concluir que animais com sinais clínicos sugestivos de EPS, apresentam uma maior concentração de IgG no sangue e, conseqüentemente, haverá uma maior capacidade de transferência dessa imunoglobulina para a cavidade oral, aumentando a capacidade de detecção de anticorpos no FO através do IPMC.

A granja número 15, que apresentou sinais clínicos agudos de EPS (enteropatia proliferativa hemorrágica) na última faixa etária no momento da coleta, foi a única que apresentou detecção simultânea de IgG no soro e no FO e IgA no FO na mesma idade. Considerando que animais de granjas com surto de enteropatia proliferativa hemorrágica desenvolvem títulos elevados de anticorpos séricos que permanecem por até 3 meses (Guedes *et al.*, 2002d), é esperado que a quantidade de destes anticorpos transferidos para a cavidade oral seja maior e que nesse caso a técnica do IPMC seja capaz de detectar IgG e IgA em FO de animais de baias atingidas pela bactéria.

A detecção de IgG no soro e no FO através do IPMC para o diagnóstico de EPS apresentou maiores níveis de concordância e porcentagens de detecção similares nas duas últimas faixas etárias, indicando que a detecção de IgG no FO através do IPMC é uma ferramenta no diagnóstico de *L. intracellularis* e é uma alternativa diagnóstica útil principalmente nos casos onde os animais estão apresentando sinais clínicos sugestivos ou característicos de EPS. Considerando que a obtenção de FO é muito mais simples e rápida do que o soro para sorologia, além de representar um número maior de animais, o primeiro torna-se atrativo para utilização mais ampla a campo.

Apesar da IgA ser normalmente encontrada em maior concentração na saliva (Humphrey e Williamson, 2001), a utilização deste anticorpo apresentou pouco valor diagnóstico para *L. intracellularis* em amostras de FO, devido à sua baixa capacidade de detecção no IPMC.

A similaridade entre as técnicas de PCR em amostras de fezes e detecção de IgG em fluido oral demonstrada no teste de McNemar, utilizando o primeiro como padrão ouro, poderia ser explicado pelo aparente atraso na detecção tanto da eliminação da bactéria nas fezes pela PCR (Guedes et al, 2002b), quanto da detecção de IgG em fluido oral em relação a soroconversão, como demonstrado no presente estudo. É importante considerar que tanto a sorologia quanto a detecção de anticorpos em FO são testes indiretos, enquanto a PCR detecta diretamente o agente eliminado nas fezes.

7. CONCLUSÃO

Veterinários e/ou produtores suínos realizam amostragem dos animais com o objetivo de confirmar ou não a circulação de *L. intracellularis* nas granjas, quando estão apresentando-se sinais clínicos sugestivos ou características de EPS nos animais. Assim sendo, baseado em nossos resultados, é possível sugerir o amostragem do FO como meio alternativo ao soro no diagnóstico de IgG contra esta bactéria através do IPMC. Além disso, amostras de FO é uma opção para ser utilizada na avaliação da cinética da infecção de *L. intracellularis* a campo.

Considerando que, em relação ao soro, a amostragem de FO apresenta várias vantagens, tais como: a coleta pode ser realizada várias vezes de maneira fácil e rápida, é uma técnica que não proporciona nenhum tipo de estresse aos animais, não são necessários materiais especiais de coleta e o pessoal que realiza o amostragem não precisa nenhum tipo de treinamento; o uso do FO no diagnóstico de EPS em populações suínas pode ser uma ferramenta útil e eficaz na detecção de anticorpos contra *L. intracellularis* e fornecer informação necessária para implementar programas de medicação ou vacinação em granjas suínas. Mais estudos tem de ser conduzidos com o intuito de determinar o número de baias por faixa etária deveriam ser utilizadas para uma melhor determinação da cinética de infecção de *L. intracellularis* em rebanhos de suínos com problema.

8. REFERENCIAS

ATKINSON, J.C., DAWES, C., ERICSON, T., FOX, P.C., GANDARA, B.K., MALAMUD, D., MANDEL, I.D., NAVAZESH, M., TABAK, L.A. Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v694, p.11-12. 1993.

BAE J. K.; WIELAND B.; SAIT M. et al. Risk Factors Associated with *Lawsonia intracellularis* in English Pig Farms. *The Veterinary Journal*. v.197 p.707-711, 2013.

BRANDTZAEG P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences*. v1098:288–311. 2007.

BUTLER, J.E., BROWN, W.R. The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 43, 5–12. 1994.

BUTLER, J.E., SUN, J., WERTZ, N., SINKORA, M. Antibody repertoire development in swine. *Developmental and Comparative Immunology*. 30, 199–221. 2006.

CASAGRANDE PROIETTI, P.; BIETTA, A.; BRACHELENTE, C.; LEPRI, E.; DAVIDSON, I.; FRANCIOSINI, M.P. Detection of *Helicobacter* spp. in gastric, fecal and saliva samples from swine affected by gastric ulceration. *J. Vet. Sci.* 11, 221-225. 2010.

CHALMERS, G. A., P. N. NATION, e J. PRITCHARD. Terminal ileitis in lambs. *Canadian Veterinary Journal*. 31:292-295. 1990.

COLLINS J.E.; LIBAL M.C.; BROST D. Proliferative enteritis in two pups. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 183 (8) p.886-889, 1983.

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. *Veterinary Microbiology*. v. 54 (1) p.47-62, 1997.

- CORTHER G, AYNAUD J. Comparison of the immune response in serum and buccopharyngeal secretions following immunization by different routes with a live hog cholera virus vaccine (Thiverval strain). *Annals of Veterinary Research*. 8:159-165. 1977.
- COX D.R. Regression Models on life tables. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 34:187-220. 1972.
- CROSS R.F.; SMITH C.K.; PARKER C.F. Terminal ileitis in lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 162 (7) p.564-566, 1973.
- DE BUYSSCHER E, DUBOIS R. Detection of IgA anti-Escherichia coli plasma cells in the intestine and salivary glands of pigs orally and locally infected with E. coli. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 107:593-600. 1978.
- DE BUYSSCHER, E.V.; BERMAN, D.T. Secretory immune response in intestinal mucosa and salivary gland after experimental infection of pigs with transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1214-1220. 1980.
- DEKKER, C.N.; BOUMA, A.; DAEMEN, A.J.; VAN LEENGOED, L.A.; JONKER, F.H.; WAGENAAR, J.A.; STEGEMAN, J.A. Homologous whole bacterin vaccination is not able to reduce Streptococcus suis serotype 9 strain 7997 transmission among pigs or colonization. *Vaccine*. 30: 1379-1387. 2012.
- DETMER, S.E., PATNAYAK, D.P., JIANG, Y., GRAMER, M.R., GOYAL, S.M. Detection of influenza A virus in porcine oral fluid samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v23, 241-247. 2011.
- DETMER, S.E.; PATNAYAK, D.P.; JIANG, Y.; GRAMER, M.R.; GOYAL, S.M. Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* v23: 241-247. 2011.
- DODDS MW, JONSON DA, YEH CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent*. 33: 223-33. 2005.
- DROLET R.; LAROCHELLE D.; GEBHART C.J.; Proliferative enteritis associated with Lawsonia intracellularis (ileal symbiont intracellularis) in white-tailed deer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 8 (2) p.250-253, 1996.

ERIKSEN, K., e T. LANDSVERK. Intestinal adenomatosis in the blue fox. *Nord Vet Med.* v37:254-255, 1985.

ESCRIBANO, D.; GUTIÉRREZ, A.M.; MARTÍNEZ SUBIELA, S.; TECLES, F.; CERÓN, J.J. Validation of three commercially available immunoassays for quantification of IgA, IgG, and IgM in porcine saliva samples. *Research in Veterinary Science.* v.93 p.682-687, 2012.

FANG ZENG, ZICONG LI, QINGCHUN ZHU, RUI DONG, CHENGCHENG ZHAO, GUOLING LI, GUOLI, WENCHAO GAO, GELONG JIANG, ENQIN ZHENG, GENGYUAN CAI. Production of functional human nerve growth factor from the saliva of transgenic mice by using salivary glands as bioreactors. *Sci Rep.* v7: 41270. 2017.

FOX J.G.; DEWHIRST F.E.; FRASER G.J.; et al. Intracellular Campylobacter-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *Journal of Clinical Microbiology.* v.32(5) p.1229-1237, 1994.

FRANA, T.; WARNEK, H.; STENSLAND, W.; et al. Comparative detection of *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella*, and *Brachyspira* from oral fluids and feces. In: 45nd Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, 2014, Dallas, Texas. *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians.* p. 67-69, 2014.

FRANÇA T.N.; RIBEIRO C.T.; BEZERRA JR P.S. et al. Surtos de Enteropatia Proliferativa Hemorrágica (*Lawsonia intracellularis*) em suínos no Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* v.28 (3) p. 174-182, 2008.

FRISK C e WAGNER J. Experimental hamster enteritis: an electron microscopic study. *American Journal of Veterinary Research* 38: 1861–1868. 1977.

GABARDO, M. P. *Lawsonia Intracellularis*: Estudo da Transmissão Interespécies e da Utilização do Fluido Oral na Detecção de Imunoglobulinas, Minas Gerais. 2015. 92f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GREABU, M., BATTING, M., MOHORA, M., TOTAN, A., DIDILESCU, A., SPINU, T., TOTAN, C., MIRICESCU, D., RADULESCU, R. Saliva – A diagnostic window to the body, both in health and disease. *Journal of Medicine and Life* 2, 124–132. 2009.

GUEDES R. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J Swine Health Prod.* V.12 (3) :134-138. 2004.

GUEDES R.M.C.; GEBHART C.J.; DEEN J.; WINKELMAN N.L. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* v.14 p.528-530, 2002a.

GUEDES R.M.C.; GEBHART C.J.; WINKELMAN N.L. et al. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *The Canada Journal of Veterinary Research.* v.66 p.99-107, 2002b.

GUEDES, R.M.C., GEBHART, C.J., WINKELMAN, N.A., MACKIE-NUSS, R. Comparative study of an indirect immunofluorescent test and the immunoperoxidase monolayer assay for diagnosing porcine proliferative enteropathy. *Vet. J. Diagn. Invest.* v14:420–423. 2002c.

GUEDES RMC, GEBHART CJ, ARMBRUSTER GA, ROGGOW BD. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative enteropathy. *Can J Vet Res.* v66:258–263. 2002d.

GUTIÉRREZ, A.M., MARTÍNEZ-SUBIELA, S., SOLER, L., PALLARÉS, F.J., CERÓN, J.J., Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* v132:218–223. 2009.

HOLYOAKE PK, CUTLER RS, CAPLEI W AND MONCKTON RP. Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring Ileal Symbiont intracellularis-specific immunoglobulin G response in sera of pigs. *Journal of Clinical Microbiology.* v32:1980–1985. 1994.

HOLYOAKE, P.K.; MULLAN, B.P.; CUTLER R.S. Prevalence of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in pig herds in Australia. *Aust. Vet J.* v.88, p.186-188, 2010.

HUMPHREY, S.P., WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. v85, 162–169. 2001.

JACOBSON M, ENGLUND S AND BALLAGI-PORDANY A. The use of a mimic to detect polymerase chain reaction inhibitory factors in faeces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v15: 268–273. 2003.

JACOBSON, M., FELLSTROM, C., JENSEN-WAERN, M. Porcine proliferative enteropathy: An important disease with questions remaining to be solved. *The Veterinary Journal*. v184:264–268. 2010.

JENSEN TK, MØLLER K, LESER TD, JORSAL SE. Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy. *Eur J Vet Pathol*. V.3 :115–123. 1997.

JEREMY J. KROLL, MICHAEL B. ROOF, LORRAINE J. HOFFMAN, JAMES S. DICKSON, D. L. HANK HARRIS. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Research Reviews*. v6(2); 173–197. 2005

JONES GF, WARD GE, MURTAUGH MP, LIN G, GEBHART CJ. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. v31:2611–2615. 1993a.

JORDAN DM, KNITTEL JP, ROOF MB, SCHWARTZ KJ, LARSON DJ AND HOFFMAN LJ. Detection of *Lawsonia intracellularis* in Iowa swine using polymerase chain reaction methodology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v11: 45–49. 1999.

KAPLAN E.L. e MEIER P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*. v53: 4457 – 4481. 1958.

KAUFMAN, E. E LAMSTER, I.B. The diagnostic applications of saliva: A review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. v13, 197-212. 2002.

KITAWORNAT, A., PRICKETT, J., WANG, C., OLSEN, C., IRWIN, C., PANYASING, Y., BALLAGI, A., RICE, A., MAIN, R., JOHNSON, J., et al. Detection of porcine reproductive and

respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v24, 262–269. 2012.

KITTAWORN RAT, A.; ENGLE, M.; PANYASING, Y.; OLSEN, C.; SCHWARTZ, K.; RICE, A.; LIZANO, S.; WANG, C.; ZIMMERMAN, J. Kinetics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) humoral immune response in swine serum and oral fluids collected from individual boars. *BMC Vet. Res.* v.9, 61. 2013.

KITTAWORN RAT, A.; ZIMMERMAN, J.J. Toward a better understanding of pig behavior and pig welfare. *Animal Health Research Reviews*. v.12 (1) p.25-32, 2010.

KLEIN E.C.; GEBHART C.J.; DUHAMEL G.E. Fatal out breaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony raised rhesus macaques. *Journal of Medical Primatology*. v. 28 (1) p.11–18, 1999.

KLINGENBERG B, AGRESTI A. Multivariate extensions of McNemar's test. *Biometrics*. v62:921–928. 2006.

KNITTEL JP e ROOF MB. United States patent for cultivation of ileal symbiont intracellularis propagation in suspended host cells. United States Patent No. 5,714,375. 1998.

KNITTEL JP e ROOF MB. United States patent for *Lawsonia intracellularis* cultivation, anti-*Lawsonia intracellularis* vaccines and diagnostic agents. United States Patent No. 8,885,823. 1999.

KNITTEL JP, JORDAN DJ, SCHWARTZ KJ, JANKE B, ROOF MB, MCORISTS AND HARRIS DL. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serological methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. *American Journal of Veterinary Research*. v59: 722–726. 1998.

KNITTEL JP, ROOF MB, SCHWARTZ KJ, MCORIST S e HARRIS DL. Diagnosis of porcine proliferative enteritis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. v19: S26–S29. 1997.

KRAUS F e KONNO J. Antibodies in saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v106: 311–329. 1963.

KROLL JJ, ROOF MB e MCORIST S. Maternal antibody exposure and vaccination with an oral avirulent live *Lawsonia intracellularis* vaccine (Enterisol Ileitis) in pigs. *Research in Veterinary Science*. 2005a.

KROLL JJ, EICHMEYER MA, SCHAEFFER ML, MCORIST S, HARRIS DL AND ROOF MB. Lipopolysaccharide-based enzyme-linked immunosorbent assay for experimental use in detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in pigs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v12: 693–699. 2005b.

LANDSVER K.T. Intestinal adenomatosis in a blue fox (*Alopex lagopus*). *Veterinary Pathology*. v.18 (2) p.275–278, 1981.

LAVOIE J.P.; DROLET R. Equine proliferative enteropathy: an emerging disease of foals. *Equine Veterinary Education*. v.21 (4) p.183-185, 2009.

LAWSON G.H.K., GEBHART CJ. Proliferative enteropathy. *Journal of Comparative Pathology* 122: 77–100. 2000.

LAWSON, G.H., MCORIST, S. The enigma of the proliferative enteropathies: A review. *Journal of Comparative Pathology*. 108, 41–46. 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*). *Veterinary Pathology*. v. 34 (2) p.152-156, 1997.

LIMA, D.P.; DINIZ, D.G.; MOIMAZ, S.A.S.; SUMIDA, D.H.; OKAMOTO, A.C. Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*. v14 p.184-188, 2010.

LLENA-PUY C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* v11: E449–455. 2006.

LOFTAGER, M.K.; ERIKSEN, L.; NIELSEN, R. Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* V.54, 57-62. 1993.

MAGTOTO R.L.; VEGI A.; WANG C. et al. Evaluation and use of a serological assay for the detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in swine. *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* v.2 p.109-113, 2014.

MCNEMAR Q. "Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages". *Psychometrika.* v12 (2): 153–157. 1947.

MCORIST S AND GEBHART CJ. Porcine proliferative enteropathies. In: Straw B, Mengeling W, D’Allaire S and Taylor D (eds) *Diseases of Swine*, 8th edn. Ames, IA, USA: Iowa State University Press, pp. 521–534. 1999.

MCORIST S, BARCELLOS D e WILSON R. Global patterns of porcine proliferative enteropathy. *The Pig Journal.* v51: 26–35. 2003.

MCORIST S, GEBHART CJ AND LAWSON GHK. Polymerase chain reaction for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology.* v41: 201–212. 1994

MCORIST S, GEBHART CJ, BOID R, et al. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int J Syst Bacteriol.* v45(4):820–825. 1995.

MCORIST S, GEBHART CJ. Proliferative enteropathy. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, et al, eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell: 811–820. 2012.

MCORIST S, SMITH SH e GREEN LE. Estimate of direct financial losses due to porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Record.* v140: 579–581. 1997.

MCORIST S. Prevalence and impact of proliferative enteropathy (ileitis) in East Asia. *Proceedings 2nd Asian Pig Vet. Soc. Cong.*, p.24-37, 2005.

MICHALSKI CW, DI MOLA FF, KU“MMEL K, et al. Human inflammatory bowel disease does not associate with *Lawsonia intracellularis* infection. *BMC Microbiol.* v6:81. 2006.

MORENO AM, BACCARO MR, COUTINHO LL. *Lawsonia intracellularis* detection in swine feces from important producing regions in Brazil. *Arquivo Instituto Biológico*. v69(3): 5-8. 2002.

MORIOKA, K.; FUKAI, K.; YOSHIDA, K.; YAMAZOE, R.; ONOZATO, H.; OHASHI, S.; TSUDA, T.; SAKAMOTO, K. Foot-and-mouth disease virus antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay using multiserotype-reactive monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* v47, 3663-3668. 2009.

NAGLER, R.M., HERSHKOVICH, O., LISCHINSKY, S., DIAMOND, E., REZNICK, A.Z., Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. *The Journal of Medical Investigation*. v50, 214–225. 2002.

NAUMOVA, E.A., DIERKES, T., SPRANG, J., ARNOLD, W.H. The oral mucosal surface and blood vessels. *Head. Face. Med.* Doi: 10.1186/1746-160x-9-8. 2013.

OLSEN, C.; KARRIKER, L.; WANG, C. et al. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *The Veterinary Journal* v.198 p.158-163, 2013.

PANYASING, Y. Influenza A virus antibody in porcine oral fluid and its diagnostic applications. Paper 13514. Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. 2013.

PRICKETT J, CUTLER S, KINYON J, NABERHAUS N, STENSLAND W, YOO KJ AND ZIMMERMAN JJ). Stability of PRRSV diagnostic targets in swine oral fluid samples. *Journal of Swine Health and Production* . 2010

PRICKETT J, KIM W, SIMER R, et al. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod.* v16 (2): 86–91. 2008a.

PRICKETT J, SIMER R, YOON K-J, KIM W-I AND ZIMMERMAN J. Surveillance of commercial growing pigs for PRRSV and PCV2 infections using pen-based oral fluid samples: A pilot study. *Journal of Swine Health and Production.* v16: 86–91. 2008b.

- PRICKETT, J.; ZIMMERMAN, J. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews*. v.11 (2) p.207-216, 2010.
- PRICKETT, J.R. Detection of viral pathogens of swine using oral fluid specimens. Paper 11013. Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. 2009.
- PUSTERLA N.; GEBHART C. Equine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Equine Veterinary Education*. v.21 (8) p.415-419, 2009.
- RAMIREZ, A.; WANG, C.; PRICKETT, J.R.; POGRANICHNIY, R.; YOON, K.J.; MAIN, R.; JOHNSON, J.K.; RADEMACHER, C.; HOOGLAND, M.; HOFFMANN, P.; KURTZ, A.; KURTZ, E.; ZIMMERMAN, J. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104, 292-300. 2012.
- RAMIREZ, A.; WANG, C.; PRICKETT, J.R. et al. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Preventive Veterinary Medicine*. v.104 p.292-300, 2012.
- REAL, C.A.P.; VANNUCCI, F.A.; PEREIRA DA SILVA, J.A.; GUEDES, R.M.C. Patogênese da Enteropatia Proliferativa Suína - Revisão de Literatura. *Veterinária e Zootecnia*. v.20 p.93-99, 2013.
- RESENDE, T.P.; REAL, C.P.; GABARDO M.; AMARAL J.P.; PORTELA Z.I.L. E GUEDES R.M.C. Serological profile, seroprevalence and riskfactors related to *Lawsonia intracellularis* infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. *BMC Veterinary Research*. v.11:306, 2015.
- ROWLAND A AND LAWSON GHK. Intestinal adenomatosis in the pig: immunofluorescent and electron microscopic studies. *Research in Veterinary Science*. v17: 323–330. 1974.
- ROWLAND A AND LAWSON GHK. Porcine proliferative enteropathies. In: Straw B, Mengeling W, D'Allaire S and Taylor D (eds) *Diseases of Swine*, 7th edn. Ames, IA, USA: Iowa State University Press, pp. 560–569. 1992.
- ROWLAND AC. Necrotic enteritis and regional ileitis in pigs at slaughter. *Veterinary Record*. v100: 338–339. 1978.

ROWLAND, A. C., E G. H. K LAWSON. Porcine proliferative enteropathies, p.560-569. In A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.). *Diseases of Swine*, 7 ed. Iowa State University Press, Ames, IA. 1992

SCHAEFER, R.; RECH, R.R.; SILVA, M.C.; GAVA, D.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. *Pesq. Vet. Bras.* v.33 (1) p.61-73, 2013.

SEDDON, Y.M.; GUY J.H.; EDWARDS S.A. Optimising oral fluid collection from groups of pigs: Effect of housing system and provision of ropes. *The Veterinary Journal.* v.193 p.180-184, 2012.

SHACKLEFORD J AND WILBORN WH. Structural and histochemical diversity in mammalian salivary glands. *The Alabama Journal of Medical Sciences.* v5: 180–203. 1968.

SMITH, D.G., LAWSON, G.H. *Lawsonia intracellularis*: Getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology.* v82, 331–345. 2001.

STEFAN MOISYADI, JOHANN URSCHITZ, HUAQIANG YANG, DEWU LIU e ZHENFANG WU, STEGE, H., JENSEN, T.K., MÖLLER, K., BAEKBO, P., JORSAL, S.E. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Preventive Veterinary Medicine.* v46, 279–292. 2000.

ŠTEMBÍREK, J., KYLLAR, M., PUTNOVÁ, I., STEHLÍK, L., BUCHTOVÁ, M. The pig as an experimental model for clinical craniofacial research. *Lab. Anim.* v46, 269-279. 2012.

UMEMURA T.; TSUCHITANI M.; TOTSUKA M.; et al. Histiocytic enteritis of rabbits. *Veterinary Pathology.* v.19 (3) p.326–329, 1982.

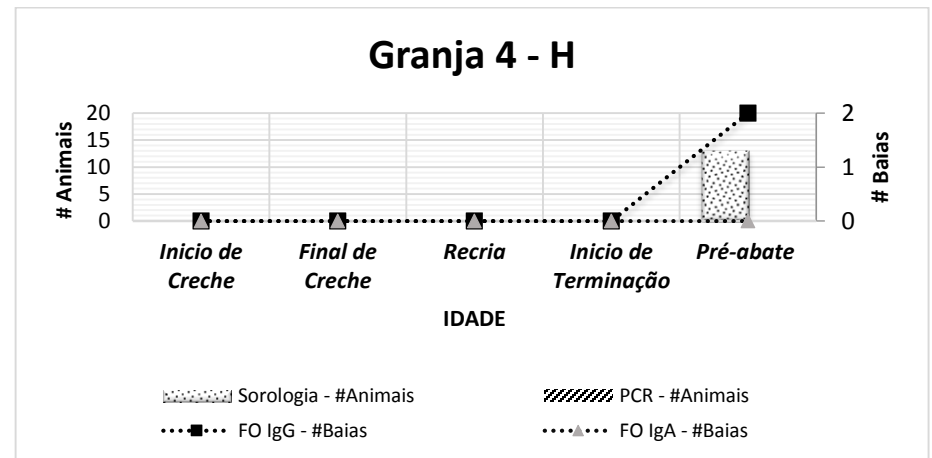
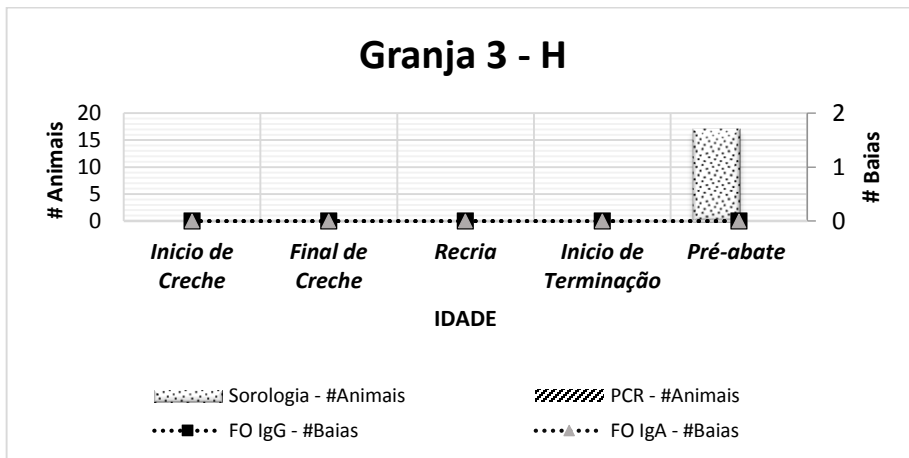
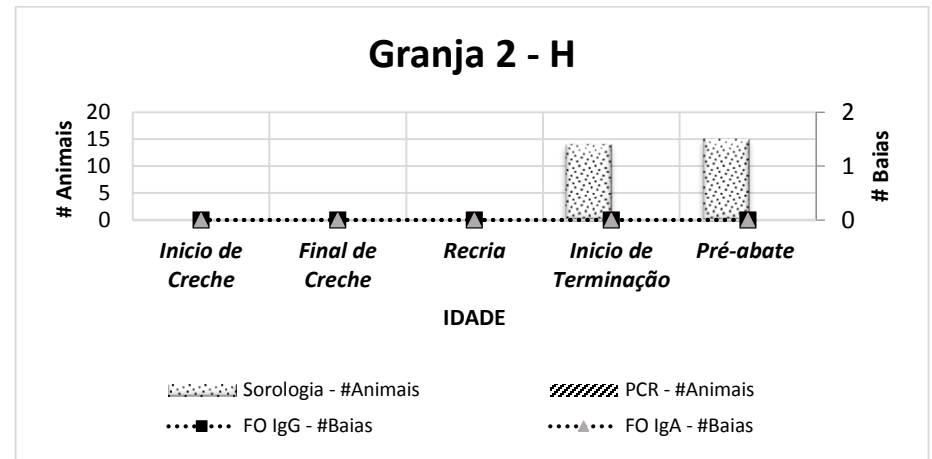
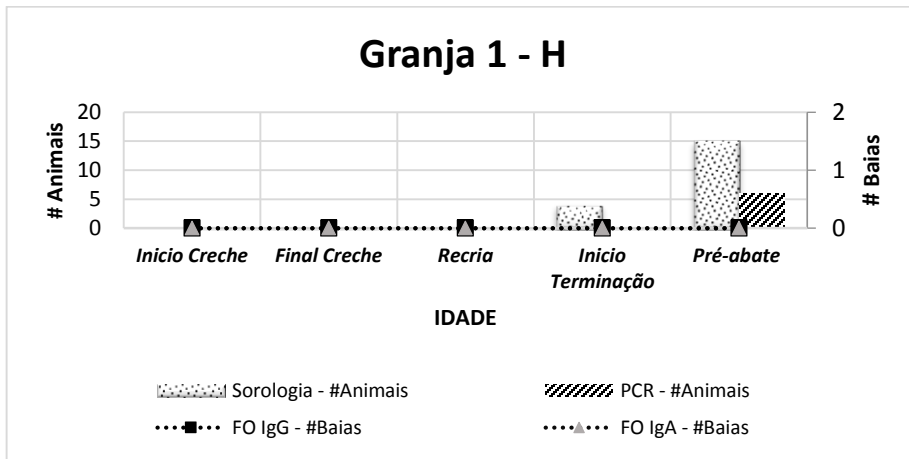
VAN DE WEERD HA, DOCKING CM, DAY JEL, AVERY PJ, EDWARDS SA. A systematic approach towards developing environmental enrichment for pigs. *Appl Anim Behav Sci.*, v84: 101-118. 2003.

VANDENBERGHE J.; MARSBOOM R. *Campylobacter*-like bacteria in adenocarcinomas of the colon in two Wistar rats. *Veterinary Record.* v.111 (18) p.416–417, 1982.

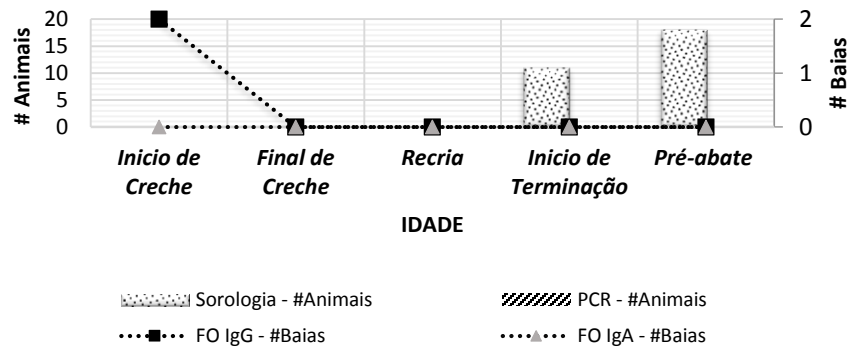
- VANNUCCI, F.A.; GEBHART C.J. F. A. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* Infections. *Veterinary Pathology*. v.51 (2) p.465-477, 2014.
- VANNUCCI, F.A.; WATTANAPHANSAK, S.; GEBHART C.J. An Alternative Method for Cultivation of *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Clinical Microbiology*. v.50 p.1070-1072, 2012.
- WALTER D, GEBHART CJ, KROLL J, HOLCK JT, CHITTICK W. Serologic profiling and vaccination timing for *Lawsonia intracellularis*. *J Swine Health Prod*. v12: 310–313. 2004.
- WANG, Z., XUE, C., LOU, W., ZHANG, X., ZHANG, E., WU, W., SHEN, G. Non-invasive immunodiagnosis of *Schistosomiasis japonica*: The detection of specific antibodies in saliva. *Chinese Medical Journal*. v115, 1460–1464. 2002.
- WARD GE AND WINKELMAN NL. Recognizing the three forms of PE in swine. *Veterinary Medicine*. v85: 197–203. 1990.
- WARD, G. E., e N. L. WINKLEMAN. Diagnosing, treating, and controlling proliferative enteritis in swine. *Veterinary Medicine*. March:312-318. 1990.
- WHITE, D.; ROTOLO, M.; OLSEN, C. et al. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *Journal of Swine Health and Production*. v.22 (3) p.138-141, 2014.
- WILLIAMS, N. M., L. R. HARRISON, AND C. J. GEBHART. Proliferative enteropathy in a foal caused by *Lawsonia intracellularis*-like bacterium. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*. 8:254-256. 1996.
- WINKELMAN NL. Ileitis: an update. *Comp Cont Educ Pract Vet*. 19: 519–525. 1996.
- WINKELMAN, N.L., DEE, S. Ileitis: an update. *Compendium of Continuing Education of Practicing Veterinarians*. 18, S19–S25. 1996.
- WU, Z.; LING, Y.; TIAN, D. et al. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* antibodies in intensive pig farms in China. *BMC Vet. Res.*, v.10, p1-5, 2014.

YATES, D.T., ROSS, T.T., HALLFORD, D.M., YATES, L.J., WESLEY, R.L. Technical note: Comparison of salivary and serum cortisol concentrations after adrenocorticotrophic hormone challenge in ewes. *Journal of Animal Science*. v88, 599–603. 2010.

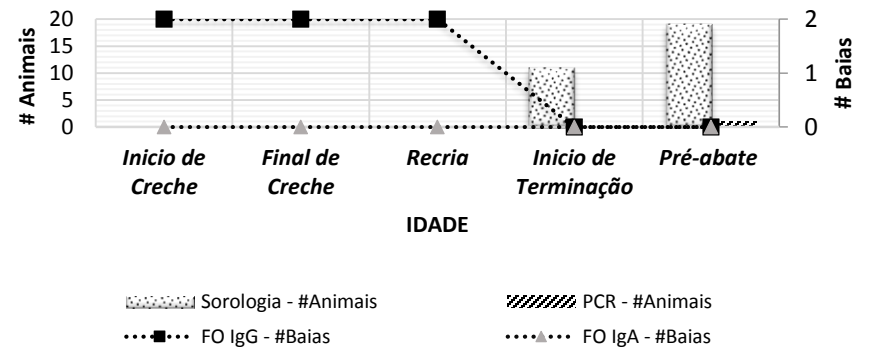
9. ANEXO



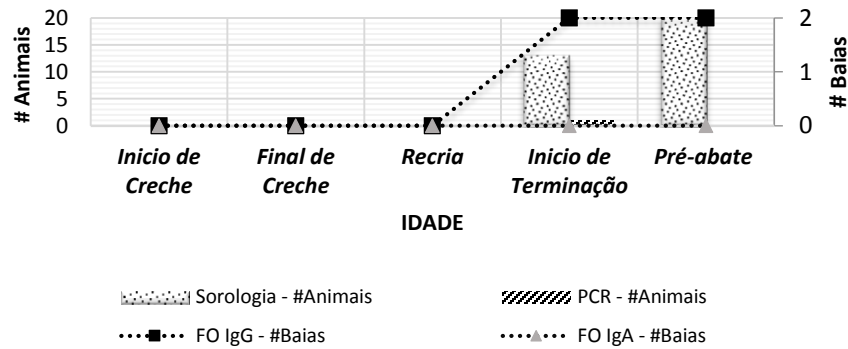
Granja 5 - H



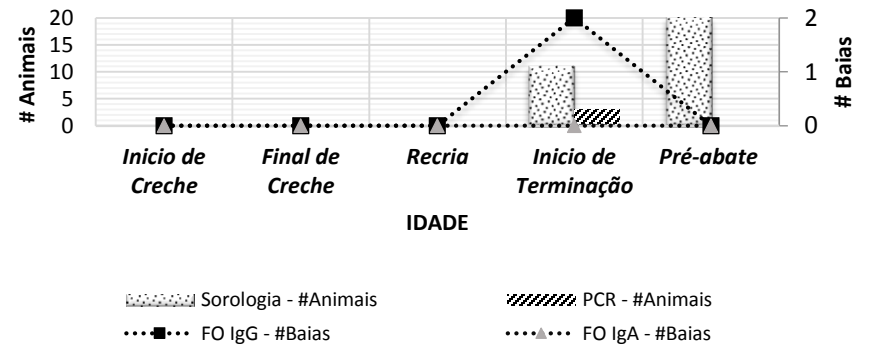
Granja 6 - H



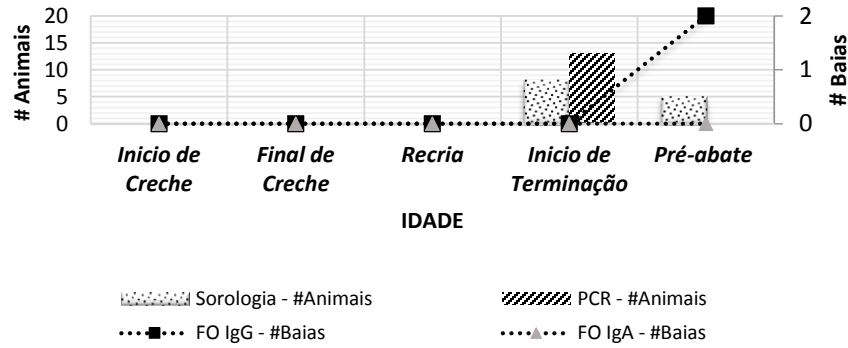
Granja 7 - D



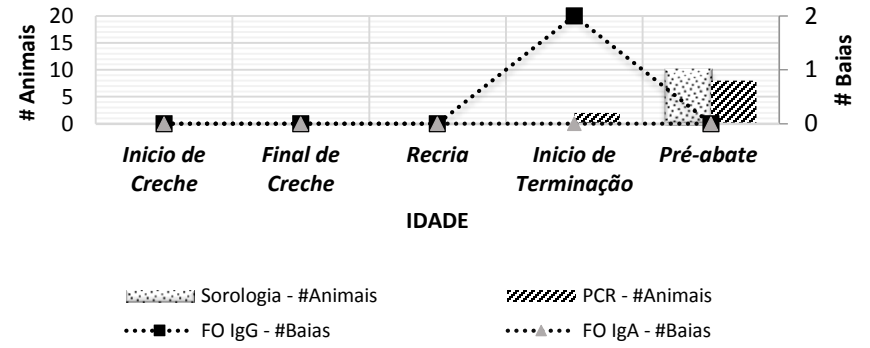
Granja 8 - D



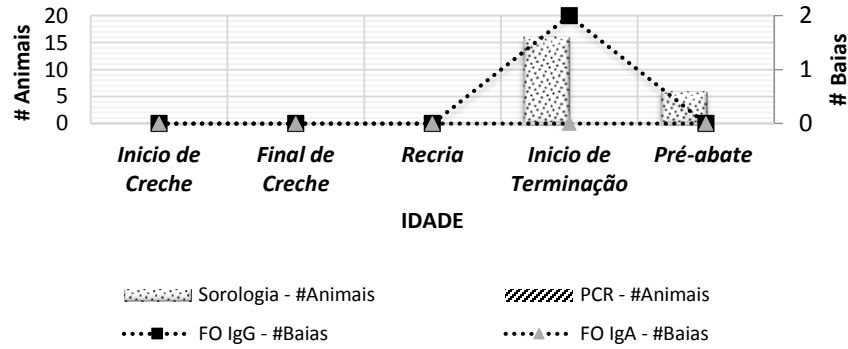
Granja 9 - D



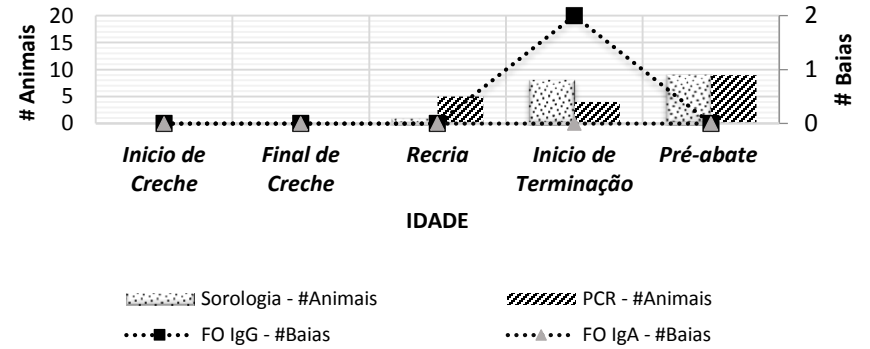
Granja 10 - D

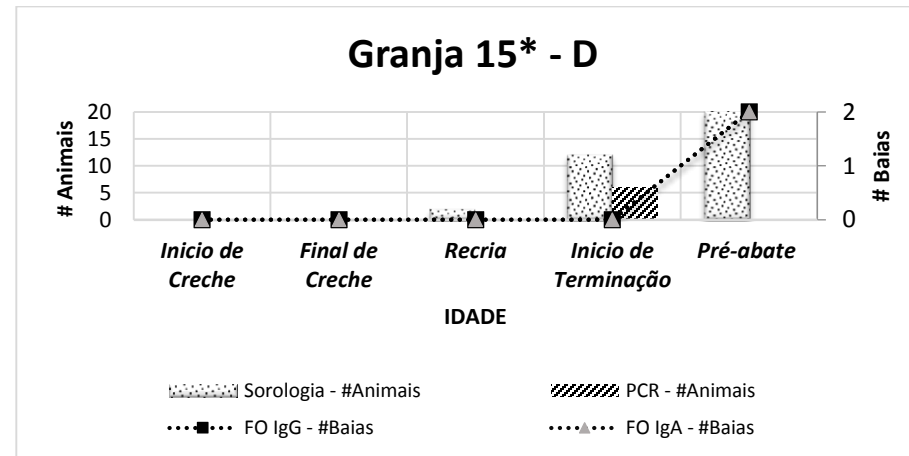
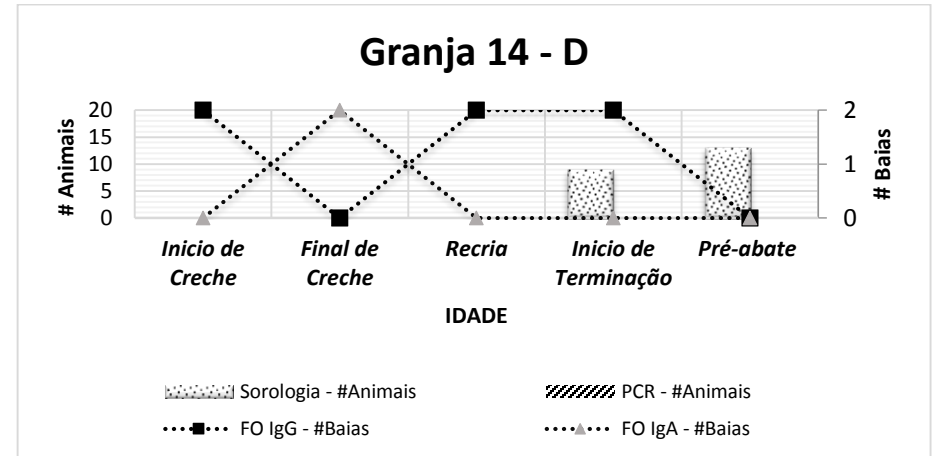
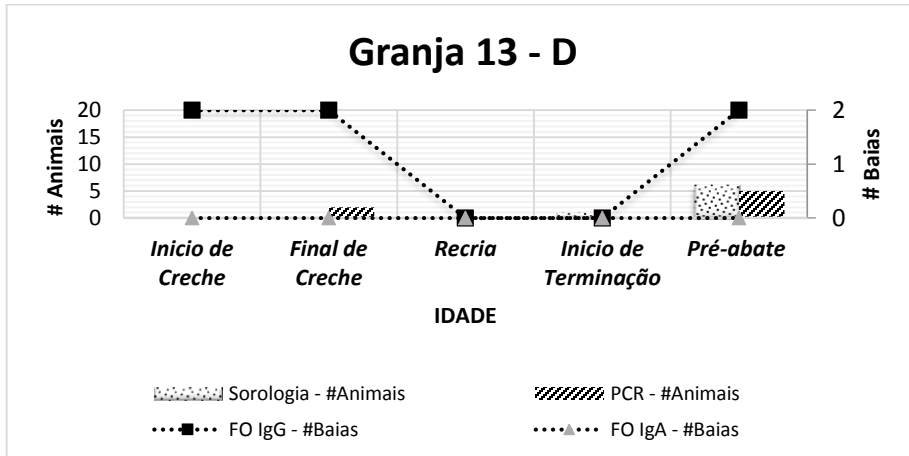


Granja 11 - D



Granja 12 - D





H = Granja com Histórico EPS, D = Granja com Sinais Clínicos EPS representados por diarreia, (*) = Granja com sinais clínicos característicos EPS aguda