

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

Patrícia Maria Braga Baptista Soares Xavier

**ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL DA ENTEROPATIA
PROLIFERATIVA EQUINA**

Belo Horizonte

2011

Patrícia Maria Braga Baptista Soares Xavier

**ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL DA ENTEROPATIA
PROLIFERATIVA EQUINA**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Prof^a. Maristela Silveira Palhares

Belo Horizonte

2011

Xavier, Patrícia Maria Braga Baptista Soares. 1984-

X3e Estudo Clínico e Laboratorial da Enteropatia Proliferativa Equina/ Patrícia Maria Braga Baptista Soares Xavier-2011.

98 f : il.

Orientadora: Maristela Silveira Palhares

Dissertação (Mestrado) – Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Bibliografia: f: 82 – 88.

Anexos: f: 89 – 98.

1. Equino – Doenças - Teses - 2. Equino- Doenças - Diagnostico -Teses – 3. Diarreia em animais – Teses – I. Palhares, Maristela Silveira – II.Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
 COLEGIADO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO
 Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 31270-901 - Belo Horizonte- MG
 FONES (31)-3409 2056 - 3409 2057 FAX (31) 3409 2059

www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao
 E-mail cap@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **PATRICIA MARIA BRAGA BAPTISTA SOARES XAVIER**
 Às 15:30 horas do dia 30 de setembro de 2011, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, indicado pelo Colegiado dos Cursos em 28/06/2011, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

Estudo clínico e laboratorial da enteropatia polifunção equina

_____, como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestrado em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina e Cirurgia Veterinárias**.

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof^a. Maristela Silveira Palhares, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Dr. <u>Adriana de Souza Coutinho</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>Heloisa Helena Copuano de Rezende</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>Renata de Fino Albuquerque Maranhão</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>Roberto Maurício Carvalho Mendes</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>Maristela Silveira Palhares</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): **Aprovado**
 Reprovado

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 08 volumes encadernados da versão final da dissertação, acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2011.

Assinatura dos membros da banca:

Adriana de Souza Coutinho _____
Heloisa Helena Copuano de Rezende _____
Renata de Fino Albuquerque Maranhão _____
Roberto Maurício Carvalho Mendes _____
Maristela Silveira Palhares _____

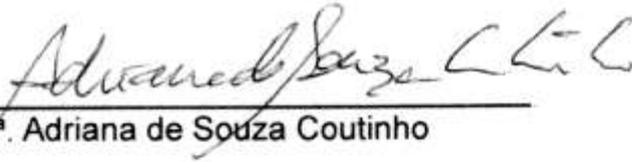
(Normas Regulamentares da defesa de dissertação no verso)
(Este documento não deverá conter rasuras)

(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)

Dissertação defendida e aprovada em 30 de setembro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof.^a Maristela Silveira Palhares
Presidente



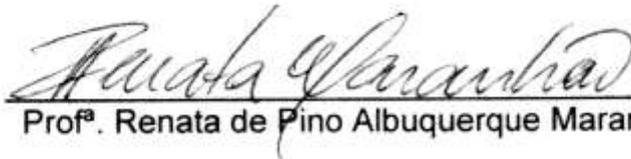
Prof.^a Adriana de Souza Coutinho



Prof. Roberto Mauricio Carvalho Guedes



Prof.^a Heloisa Helena Capuano de Rezende



Prof.^a Renata de Pino Albuquerque Maranhão

Dedico essa dissertação aos meus pais que sempre me incentivaram em minhas decisões.

À minha vó, que não está mais presente para dividir minhas alegrias. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus irmãos e à toda a minha família, pelo amor, carinho e apoio, mesmo de longe, porém, sempre perto.

À família Moura Lima, que me recebeu em Minas Gerais de braços abertos, sempre apoiando e comemorando minhas vitórias.

Ao meu namorado, Daniel, sempre presente em todas as decisões, criticando e apoiando meus passos nesse novo caminho.

À Professora Maristela Silveira Palhares, por ter me acolhido em meio a escuridão que me assombrava. Obrigada pelos puxões de orelha, sempre necessários!

À Professora Renata Maranhão, pelas conversas e ensinamentos.

Aos residentes da clínica de equinos, Livia e Filipe, sempre dispostos a ajudar.

À Juliana Saes, aluna do mestrado em patologia veterinária, por me ajudar nas técnicas de sorologia e PCR.

Ao Professor Roberto Guedes, por disponibilizar sua experiência na leitura das placas, o laboratório de patologia e sua aluna de mestrado.

À Professora Fabíola Paes Leme, pelos ensinamentos e disponibilidade.

Aos bolsistas do projeto carroceiro, Luan, Renato e Rafael, sempre me ajudando nas coletas, processamento, análise e armazenamento das amostras de sangue.

À Cintia, por me ajudar com a bioquímica mesmo estando em experimento.

À Karita, por ajudar na técnica de eletroforese das proteínas.

À Priscila, por sempre estar disponível e pela amizade construída.

À Isabel, pelas coletas e pelo apoio em todas as horas “meissmo”.

À equipe do Colegiado de Pós-Graduação e do Departamento de Clínica e Cirurgia da EV-UFGM pelo incessante trabalho.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida no segundo ano do mestrado.

Aos proprietários, médicos veterinários, gerentes e funcionários dos Haras visitados pelo apoio.

Aos funcionários, professores da EV e todas as pessoas que não foram aqui citadas que de forma direta ou indireta contribuíram de alguma forma para minha conquista.

Muito Obrigada!

"A vida não se mede pelo número de vezes que respiramos, mas pelos momentos que nos tiram a respiração" (Mafalda Veiga).

RESUMO

A enteropatia proliferativa (EP) é uma doença entérica transmissível causada pela *Lawsonia intracellularis*. Apesar de em suínos ter distribuição mundial, há relatos descrevendo a presença da EP em equinos nas Américas, Europa, Austrália e Japão, acometendo principalmente potros até 12 meses. Há três formas de se detectar a *L. intracellularis*, através da sorologia, da imunistoquímica de tecidos intestinais e através da reação em cadeia da polimerase (PCR). As principais alterações clínicas descritas são depressão, anorexia, letargia, diarreia, cólica e esporadicamente a morte. Esse estudo foi dividido em duas etapas, primeiramente foram comparadas as técnicas sorológicas, a imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMA) e a imunoperoxidase em lâmina de vidro (IPX), a fim de se obter a concordância destas técnicas em equinos. Na segunda parte, foi realizado um estudo clínico e laboratorial de equídeos acometidos pela EP. Foram coletadas amostras sanguíneas e fecais de 315 equinos, muares e asininos de diferentes idades e sexo. Foi realizado o hemograma completo, contagem diferencial de leucócitos, proteinograma, concentração de fibrinogênio, e concentração de alanino aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, creatina quinase, gama glutamil transpeptidase, uréia e creatinina séricas, além da contagem de ovos por grama para diagnóstico diferencial, e para confirmação da EP foi realizada a análise da sorologia pela técnica da IPMA e a PCR das fezes para pesquisa de soropositividade e eliminação das bactérias, respectivamente. A técnica de IPMA foi mais sensível com alta especificidade e obteve concordância discreta com a técnica de IPX. Doze (3,81%) animais foram positivos pela PCR, 51 (16,19%) pela sorologia e dois (0,63%) em ambas as técnicas. Tanto potros lactentes quanto éguas adultas foram positivos para o agente. Muitos animais não apresentaram alterações clínicas demonstrando a exposição prévia à bactéria ou presença da forma subclínica da doença.

Palavras-Chave: equino, *Lawsonia intracellularis*, diarreia, PCR, IPMA.

ABSTRACT

Proliferative enteropathy (EP) is a contagious enteric disease caused by *Lawsonia intracellularis*. Despite having worldwide distribution in porcine, there are reports describing the presence of EP in horses in America, Europe, Australia and Japan, affecting mostly foals up to 12 months of age. There are three techniques to diagnose *L. intracellularis*, serology, immunochemistry of tissue samples and polymerase chain reaction (PCR). Main clinical signs described are depression, anorexia, lethargy, diarrhea, colics and occasionally death. The present study was divided into two parts, in the first part, two serology tests (immunoperoxidase monolayer assay and slide immunoperoxidase assay) were compared to determine the agreement between them. On the second part, clinical and laboratorial findings of EP affected horses were evaluated. Blood and stool samples of 315 animals of different age and gender were analysed. Whole blood count, leukocyte count, determination of protein and fibrinogen levels and creatine kinase, gama glutamyl transpeptidase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, urea and creatinine serum levels were performed. For differential diagnosis, eggs per gram (OPG) were realized. To confirm EP, serology through IPMA and PCR in fecal samples were performed. IPMA detected more positives than IPX. There was a fair agreement between IPMA and IPX. Twelve (3,81%) horses were positive by PCR in fecal samples, 51 (16,19%) in IPMA and two (0,63%) in both tests. Many positive horses did not have any clinical changes or laboratorial findings, showing previous contact to bacteria or presence of a subclinical disease.

Key-Words: equine, *Lawsonia intracellularis*, diarrhea, PCR, IPMA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Lâmina com 12 poços para teste de imunoperoxidase em lâmina de vidro...	44
Figura 2	Controle positivo da sorologia por IPX	44
Figura 3	Controle negativo da sorologia por IPX	44
Figura 4	Placa de 96 poços onde era realizada a sorologia IPMA	44
Figura 5	Controle positivo de soro equino utilizado para a sorologia IPMA. Observar as bactérias coradas fortemente em tom rosa amarronzado dentro das células de McCoy.....	44
Figura 6	Controle negativo para a sorologia IPMA. Observar que não há nenhuma célula corada.....	44
Figura 7	Coleta e processamento do material. A: coleta de fezes de potro diretamente da ampola retal; B: coleta de sangue; C: amostras de sangue; D: separação do soro para congelamento.....	46
Figura 8	Termociclador. Máquina onde há a amplificação de produtos de PCR.....	48
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR	48
Figura 10	Máquina de processamento de amostras para análise da bioquímica sérica.....	51
Figura 11	Realização de eletroforese de proteínas em filme de agarose	51
Figura 12	Resultado da leitura do gel de agarose da reação em cadeia de polimerase dos animais 552 a 562. As amostras 558 e 559 marcaram com 319bp, assim como o controle positivo (CP). As amostras 552 a 557 e 560 a 562 não marcaram, igualmente ao controle negativo(CN), sendo negativas para <i>Lawsonia intracellularis</i> (PM – peso molecular).....	58
Figura 13	Leitura da lâmina na técnica sorológica de imunoperoxidase em placa de monocamada de células para detecção de <i>Lawsonia intracellularis</i> . A - Observar a presença de bactérias coradas em tom marrom-avermelhado, gerando uma leitura com resultado positivo. B – células fracamente coradas gerando leitura de resultado negativo	58
Figura 14	Diagrama demonstrando a proporção de animais positivos x negativos durante os períodos de seca e chuva.....	64
Figura 15	Diagrama representando a distribuição por gênero entre os animais que testaram positivo somente para a reação em cadeia da polimerase (n=12), somente para a técnica de imunoperoxidase em monocamada de células (n=51), e em ambos testes (n=2).....	65
Figura 16	Imagens de ovos de parasitas intestinais encontrados nas fezes de potros: A – ovo de <i>Strongylus</i> sp.; B – ovo de <i>Parascaris equorum</i>	67
Figura 17	Gráfico demonstrando os sinais clínicos que foram apresentados pelos equídeos coletados neste estudo.....	68
Figura 18	Esfregaço sanguíneo de veia jugular externa. A: <i>Babesia caballi</i> e neutrófilo hipersegmentado; B: <i>Theileria equi</i> em formação de cruz de malta e hemácias crenadas; C: linfócito reativo; D: plaquetas ativadas; E: basófilo e linfócito; F: eosinófilo e macroplaqueta (seta). Coloração panótico, aumento 1000x (imersão).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sinais clínicos observados no levantamento realizado por Wilson e Gebhart (2008).....	20
Tabela 2	Alterações laboratorias observadas no levantamento realizado por Wilson e Gebhart (2008).....	24
Tabela 3	Distribuição de frequência de resultados das provas sorológicas IPX e IPMA para <i>L. intracellularis</i> em potros e éguas de propriedades da região metropolitana de Belo Horizonte – MG (2007-2008).....	53
Tabela 4	Distribuição de acordo como local de origem das amostras positivas para <i>L. intracellularis</i> , pelas técnicas de IPX e IPMA.....	55
Tabela 5	Distribuição de acordo com o resultado obtido das amostras utilizadas nas duas técnicas sorológicas (IPMA e IPX).....	56
Tabela 6	Dados clínicos dos animais positivos (pos) na IPMA e/ou PCR, relacionadas às informações: origem, idade, diarreia e aspecto das fezes no momento da coleta.....	59
Tabela 7	Distribuição (% - n) da <i>L. intracellularis</i> de acordo com a propriedade na região metropolitana de Belo Horizonte - MG.....	60
Tabela 8	Distribuição dos animais testados (total de positivos em ambas técnicas) para <i>L. intracellularis</i> de acordo com a localização das propriedades.....	63
Tabela 9	Características clínicas dos animais testados para <i>L. intracellularis</i>	66
Tabela 10	Distribuição (% - n) dos achados clínicos no momento do exame em animais testados para <i>L. intracellularis</i>	69
Tabela 11	Distribuição (% - n) dos achados clínicos, no momento do exame, em animais testados como positivos e negativos para <i>L. intracellularis</i>	69
Tabela 12	Distribuição (% - n) dos achados clínicos no momento do exame em animais testados para <i>L. intracellularis</i>	70
Tabela 13	Valores do hemograma (média \pm erro padrão), em animais testados para <i>L. intracellularis</i>	73
Tabela 14	Valores do hemograma (média \pm erro padrão), de animais testados para <i>L. intracellularis</i>	74
Tabela 15	Valores da bioquímica sérica (média \pm erro padrão), em animais testados para <i>L. intracellularis</i>	76
Tabela 16	Valores da bioquímica sérica (média \pm erro padrão), em animais testados para <i>L. intracellularis</i> *.....	77
Tabela 17	Valores da bioquímica sérica (média \pm erro padrão), em animais testados para <i>L. intracellularis</i>	78
Tabela 18	Valores do resultado da eletroforese de proteínas séricas (média \pm erro padrão), em animais testados para <i>L. intracellularis</i>	79
Tabela 19	Valores do resultado da eletroforese de proteínas séricas (média \pm erro padrão), em animais testados para <i>L. intracellularis</i> *.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	3-amino-9-etil-carbazol
ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
BID	Duas vezes ao dia
Bp	Pares de base
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CK	Creatina quinase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EP	Enteropatia proliferativa
EPE	Enteropatia proliferativa equina
EV-UFMG	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
FALC	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamil transpeptidase
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
He	Hemácias
IFN- γ	Interferon gama
IPMA	Imunoperoxidase em monocamadas de células
IV	Intravenoso
Kg	Quilogramas
μ L	Microlitros
mL	Mililitros
mg	Miligramas
mM	Milimols
OPG	Ovos por grama
PBS	Solução tampão salina fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PO	Via oral
QID	Quatro vezes ao dia
RDW	Índice de anisocitose
SID	Uma vez ao dia
TID	Três vezes ao dia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VG	Hematócrito
VGM	Volume globular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. HISTÓRICO	17
2.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	18
2.3. ETIOPATOGENIA	18
2.4. SINAIS CLÍNICOS	20
2.5. ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	23
2.6. DIAGNÓSTICO	29
2.7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	31
2.8. TRATAMENTO.....	33
2.8.1. Medidas de Suporte	33
2.8.2. Terapêutica	35
2.8.2.1. Macrolídeos	35
2.8.2.2. Tetraciclínas	36
2.8.2.3. Rifampicina	37
2.8.2.4. Cloranfenicol	37
2.8.2.5. Metronidazol	38
2.8.2.6. Outros	38
2.9. PROFILAXIA	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. EXPERIMENTO I – ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNOPEROXIDASE EM LÂMINA DE VIDRO (IPX) E DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADAS DE CÉLULAS (IPMA) NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR <i>Lawsonia intracellularis</i> EM EQUINOS.....	41
3.1.1. Caracterização dos animais testados	41
3.1.2. Técnicas sorológicas	42
3.1.2.1. Técnica de imunoperoxidase em lâminas de vidro (IPX).....	42
3.1.2.2. Técnica de imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMA).	45
3.2. EXPERIMENTO II – AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E DA BIOQUÍMICA SÉRICA DE EQUINOS TESTADOS PARA <i>Lawsonia intracellularis</i> EM AMOSTRAS SOROLOGIA (IPMA) E POR PCR EM FEZES..	45
3.2.1. Caracterização dos animais testados	45
3.2.2. Coleta do material	47

3.2.3. Identificação de animais positivos	47
3.2.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	47
3.2.3.2. Sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMA)	48
3.2.4. Hemograma	49
3.2.5. Proteína total e Fibrinogênio	49
3.2.6. Bioquímica Sérica	50
3.2.7. Eletroforese de Proteínas Séricas	50
3.2.8. Ovos por grama (OPG) de fezes	51
3.2.9. Análise estatística	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. EXPERIMENTO I – ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNOPEROXIDASE EM LÂMINA DE VIDRO (IPX) E DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADAS DE CÉLULAS (IPMA) NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR <i>Lawsonia intracellularis</i> EM EQUINOS.....	53
4.2. EXPERIMENTO II – AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E DA BIOQUÍMICA SÉRICA DE EQUINOS TESTADOS PARA <i>Lawsonia intracellularis</i> EM AMOSTRAS SOROLOGIA (IPMA) E POR PCR EM FEZES.....	57
4.2.1. Epidemiologia	57
4.2.2. Avaliação clínica e laboratorial de potros testados para <i>L. intracellularis</i>	64
4.2.3. Sinais clínicos	68
4.2.4. Alterações laboratoriais	71
4.2.5. Alterações bioquímicas	76
4.2.6. Alterações na eletroforese de proteínas séricas	78
5. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	89
ANEXO I – Ficha de coleta dos dados clínicos dos animais	90
ANEXO II – Ficha anamnese	91
ANEXO III – Protocolo para eletroforese de proteínas séricas.....	92
ANEXO IV – Protocolo para sorologia IPMA	93
ANEXO V – Protocolo para isolamento de DNA para PCR de fezes.....	95
ANEXO VI – Protocolo para amplificação de DNA	97
ANEXO VII – Protocolo para eletroforese em gel de agarose para produtos de PCR....	98

1. INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa (EP) é uma doença entérica transmissível causada pela *Lawsonia intracellularis*, uma bactéria intracelular que se encontra nas células epiteliais das criptas intestinais. Apesar de ser distribuída mundialmente em suínos (Lawson e Gerbhart, 2000), há relatos descrevendo a presença da enteropatia proliferativa em equinos (EPE) na América, Europa, Austrália e Japão, acometendo principalmente potros desmamados de até 12 meses de idade.

Há três formas de se detectar a *L. intracellularis*, por meio da sorologia (Guedes et al., 2002a), da imunoistoquímica de cortes histológicos (Guedes e Gebhart, 2003a) e através do PCR das fezes (Jones et al., 1993).

As principais alterações clínicas descritas são depressão, anorexia, letargia e diarreia (Lavoie et al., 2000), ocorrendo esporadicamente a morte (Williams et al., 1996).

Em relação aos achados laboratoriais, há discrepância nos valores relacionados a leucócitos, eritrócitos e proteína, porém, a maioria dos relatos apresentava hipoalbuminemia (McClintock e Collins, 2004; Wuersch et al., 2005; Atherton e McKenzie III, 2006; Dauvillier et al., 2006; Kimberly et al., 2007; Frazer, 2008; Allen et al., 2009; Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009).

A presença da infecção por *L. intracellularis* em equinos foi recentemente descrita em Minas Gerais (Guimarães-Ladeira et al., 2008). Entretanto, não foi realizado um perfil clínico, hematológico e bioquímico dos animais acometidos. Estudos são necessários para determiná-los com o objetivo de auxiliar a detecção deste agente que, possivelmente, é sub-diagnosticado no Brasil.

Os objetivos desta dissertação foram avaliar concordância entre dois testes sorológicos para *L. intracellularis* em equinos, a técnica de imunoperoxidase em lâmina de vidro (IPX) e de imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMA), além disto, descrever achados do exame físico e exames laboratoriais hemograma, fibrinogênio, eletroforese de proteínas e bioquímica sérica de equinos positivos na sorologia pela técnica de IPMA e/ou PCR das fezes para *L. intracellularis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

Os primeiros relatos sugestivos da enteropatia proliferativa datam de 1931, quando Biester e Schwarte (1931) descreveram a presença de diarreia em uma porca e enterite em outras duas, sendo encontrado tecido adenomatoso proliferativo no exame histológico. O *Campylobacter mucosalis* foi isolado nas lesões proliferativas por Rowland et al. (1972), após a descrição da presença de bactérias curvas em células alteradas do intestino.

Lawson et al. (1985), ao imunizarem coelhos com a bactéria extraída do intestino com alterações, obtiveram resultados inesperados: os anticorpos produzidos não reagiram com nenhuma das campilobactérias isoladas, mas reagiram com o microorganismo intracelular presente em tecidos de suínos e hamsters. Assim, foram desenvolvidos métodos imunológicos para a descoberta da bactéria que mais tarde passou a ser chamada de *Lawsonia intracellularis* (McOrist et al., 1995).

A EPE foi primeiramente descrita por Duhamel e Wheeldon (1982), em um potro árabe com seis meses de idade. O relato descreve brevemente, o histórico de anorexia, depressão e diarreia. A avaliação anatomopatológica revelou aumento da espessura da parede do intestino delgado e hiperplasia de criptas intestinais. O achado mais importante foi a presença de um microorganismo curvo no citoplasma apical de enterócitos. Quinze anos mais tarde, Williams et al. (1996) usaram técnicas moleculares para identificar o agente causal de EPE, a *L. intracellularis*. Finalmente, em 2003, Al-Ghamdi (2003) reproduziu a doença em potros utilizando inoculação experimental com culturas puras de *L. intracellularis*. Recentemente, foi realizado um estudo no Brasil em que se relatou a presença da *L. intracellularis* em equinos (Guimarães-Ladeira et al., 2009).

2.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A doença já foi descrita em várias espécies animais, incluindo suíno (McOrist e Gebhart, 2006), hamster (Frisk e Wagner, 1977), veado (Drolet et al., 1996), cão (Collins et al., 1983), raposa (Eriksen et al., 1990), cobaio (Elwell et al., 1981), rato (Vandenberghe et al., 1985), furão (Fox e Lawson, 1988), macaco rhesus (Klein et al., 1999), coelho (Moon et al., 1974), emu (Lemarchand et al., 1997), avestruz (Cooper et al., 1997) e o equino (Williams et al., 1996).

Em suínos, esta enfermidade tem distribuição mundial, sendo uma doença importante economicamente, causadora de diarreia, diminuição da taxa de crescimento e alta mortalidade (Lawson e Gebhart, 2000). Em equinos, já foi relatada algumas vezes nas Américas (Williams et al., 1996; Frank et al., 1998; Brees et al., 1999; Lavoie et al., 2000; Bihl, 2003; Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006; Kimberly et al., 2007; Frazer, 2008; Guimarães-Ladeira et al., 2008), Europa (Sainty, 2002; Deprez et al., 2005; Wuersch et al., 2006; Allen et al., 2009; van Ree et al., 2009), Austrália (McClintock e Collins, 2004) e Japão (Shimizu et al., 2010). Muito provavelmente, a EPE é subestimada ou não diagnosticada, não só pela dificuldade de acesso aos exames, bem como, pelo desconhecimento da afecção por médicos veterinários. Al-Ghamdi (2003) ao analisar amostras de soro e fezes de potros encaminhados ao laboratório central de Diagnóstico da Universidade de Minnesota, relatou uma positividade de 50,27% (94/187) em amostras de soro e 32,14% (9/28) em amostras de fezes no teste de reação em cadeia de polimerase (PCR).

A maioria dos relatos de EPE tem sido de casos individuais, com exceção de dois surtos em haras, um no Canadá (Lavoie et al., 2000; Kimberly et al., 2007) e outro nos Estados Unidos (Merlo et al., 2009).

2.3. ETIOPATOGENIA

A EP é uma doença entérica causada pela *L. intracellularis*. Esta bactéria é intracelular obrigatória, flagelada, gram-negativa que se cora fracamente pela coloração de gram, não

forma esporos e cresce *in vitro* somente no citoplasma de células em cultivos celulares (Lawson e Gebhart, 2000).

A localização das lesões é característica em cada espécie em que a doença ocorre. Como animais de um mesmo grupo, geralmente, são afetados por uma mesma forma da doença, as alterações clínicas podem ser bem diferentes entre os surtos (Lawson e Gebhart, 2000).

Em equinos, a maioria das lesões está localizada no intestino delgado e se caracteriza pelo espessamento da mucosa intestinal, consequência da hiperplasia de enterócitos infectados pela bactéria (Duhamel e Wheeldon, 1982; Williams et al., 1996; Frank et al., 1998; Brees et al., 1999).

Áreas afetadas do intestino podem demonstrar edema sub-seroso com pouca quantidade de material necrótico na superfície da mucosa espessada. Em casos brandos, as lesões podem ser evidenciadas isoladamente e, com a evolução e severidade, estas se tornam confluentes apresentando superfície nodular ou pregueada (Lawson e Gebhart, 2000).

Nas áreas afetadas do intestino, as vilosidades são perdidas e repostas por tecido adenomatoso glandular. As criptas afetadas se tornam aumentadas e ramificadas, com perda das células caliciformes e proliferação acentuada das células epiteliais, com células em mitose aparentes. A lâmina própria apresenta uma população mista de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos sem aparente infiltração para a mucosa e criptas (McOrist et al., 1993).

Para que ocorra a entrada da *L. intracellularis* nas células do hospedeiro, é necessária sua adesão aos receptores específicos dos enterócitos, sendo um fator importante para patógenos intracelulares obrigatórios. Os organismos parecem entrar nas células individualmente, porém, ao entrarem, se localizam dentro de vacúolos, onde se multiplicam. Ao se multiplicarem, os vacúolos se dividem e as bactérias se mantêm no citoplasma. As células infectadas se dividem e migram para o ápice da vilosidade, tornando-o colonizado pela *L. intracellularis*. A mitose das células infectadas é três vezes maior quando comparada à da mucosa normal. Esse efeito estimulante da bactéria na divisão celular não persiste após o desenvolvimento da lesão, apesar da presença da bactéria. A persistência da *L. intracellularis* é facilitada pela ausência de inflamação significativa e resposta imune limitada, visto que a localização intracelular da bactéria a protege de respostas imunes (Smith e Lawson, 2001).

O modo da infecção ainda é desconhecido, mas pressupõe-se que ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes de animais domésticos ou selvagens seja a fonte primária (Pusterla et al., 2008ab). Assim, como no suíno, alguns fatores podem predispor ao desenvolvimento da doença em potros, como o desmame, transporte, super-lotação, diminuição de anticorpos específicos, alterações na dieta e doenças concomitantes como o parasitismo e pneumonia (Lavoie e Drolet, 2007).

2.4. SINAIS CLÍNICOS

Grande parte da literatura se refere à descrição de relatos de casos clínicos isolados, com exceção de um levantamento realizado por Wilson e Gebhart (2008) e outro por Pusterla e Gebhart (2009).

Wilson e Gebhart (2008) analisaram dados clínicos e laboratoriais de 116 casos descritos. Em relação à sintomatologia clínica, os autores observaram a presença de 82% de perda de peso, 43% de diarreia ou fezes amolecidas e 13% de sinais de cólica (Tab.1).

Tabela 1 - Sinais clínicos observados no estudo realizado por Wilson e Gebhart (2008).

SINAL CLÍNICO	PORCENTAGEM	CASOS
Perda de peso	82	43/51
Depressão e/ou letargia	76	44/58
Edema	63	73/116
Diarréia ou fezes amolecidas	43	50/116
Apetite ruim ou anorexia	41	23/56
Desidratação	32	18/57
Febre	16	17/104
Cólica	13	15/116

Em animais acometidos pela EPE, tanto a hipertermia (Frank et al., 1998; McClintock e Collins, 2004; Atherton e Mckenzie III, 2006; Sampieri et al., 2006; Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009; Pusterla et al., 2010a) quanto a hipotermia (Sampieri et al., 2006; Wuersch

et al., 2006; Kimberly et al., 2007) já foram relatadas. A síndrome da doença inflamatória sistêmica se caracteriza quando pelo menos duas de quatro alterações estão presentes: hipertemia ou hipotermia; taquicardia; taquipnéia e leucocitose ou leucopenia. A sepse ocorre quando essas alterações são consequência de um processo infeccioso (Matos e Victorino, 2004). Nos episódios de hipertermia, mediadores inflamatórios atingem o centro termorregulador do hipotálamo, elevando o limiar térmico e desencadeando respostas metabólicas de produção e conservação de calor (vasoconstrição periférica, tremores, aumento do metabolismo basal). Quando a temperatura corporal ultrapassa esse novo limiar são desencadeados mecanismos de dissipação de calor (sudorese, vasodilatação periférica e taquipnéia) que tendem a reduzi-la novamente (Voltarelli, 1994).

No momento do exame físico muitos animais apresentam letargia ou depressão (Allen et al., 2009; Wong et al., 2009; Pusterla et al., 2010a), condição corpórea ruim (Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007; Wong et al., 2009) e histórico ou a presença de perda de peso (Sampieri et al., 2006; Wong et al., 2009; Shimizu et al., 2010). Esta perda de peso pode ser consequência da diarreia, má-absorção ou pela inapetência ou anorexia apresentadas (Wong et al., 2009; Pusterla et al., 2010a; Shimizu et al., 2010), além do parasitismo gastrointestinal concomitante. Os parasitas podem competir diretamente pelos nutrientes do lúmen intestinal e a má absorção pode ser resultante de falta de integridade da mucosa, diminuição no tamanho e número de vilosidades intestinais e diminuição das enzimas digestivas que se originam na mucosa. A diarreia crônica resulta em inapetência ou anorexia, o que contribui diretamente para a perda de peso. O tempo de trânsito intestinal mais rápido resulta em perdas aumentadas de alimentos da dieta incompletamente digeridos. Se a ingestão e absorção dos alimentos são adequadas, deve-se suspeitar de doença hepática, pela utilização inadequada de aminoácidos e açúcares resultando em inapetência e levando à perda de peso (Reed e Bayly, 2000).

O edema torácico ventral ou periférico foi relatado em alguns potros (Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009; Pusterla et al., 2010a). A alteração do equilíbrio coloidosmótico leva à perda de líquido dos capilares para o interstício, principalmente pela diminuição da concentração de proteínas que regulam a pressão plasmática, levando ao acúmulo excessivo de líquido no interstício e edema (Reed e Bayly, 2000).

Foram observadas alterações no exame clínico da cavidade oral, como a presença de mucosa congesta (Allen et al., 2009) e hiperêmica (Kimberly et al., 2007; Merlo et al., 2009), tempo de preenchimento capilar (TPC) ligeiramente aumentado (Allen et al., 2009; Merlo et

al., 2009), podendo ser associados à taquicardia (Kimberly et al., 2007), visto que estes dois últimos sinais estão relacionados com a perda aguda de sódio e fortemente associados à hipovolemia, obtendo como consequência à taquicardia, a diminuição da pressão arterial, o retardo no preenchimento da jugular e o aumento de TPC (Kaneko et al., 2008).

A desidratação foi descrita em alguns casos (Frank et al., 1998; Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007; Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009). Ela ocorre quando a perda de fluido corporal excede a ingestão (DiBartola, 2007). Quando uma porção substancial de água perdida é consumida, a concentração de sódio e a osmolaridade caem e uma desidratação hipotônica e hipovolêmica se desenvolve. Os sinais clínicos da desidratação incluem a perda de peso, alteração do turgor da pele, retração do globo ocular, diminuição da umidade das mucosas, aumento do TPC, além do aumento sérico de creatinina, proteína e do hematócrito. Se o controle renal está normal há diminuição do volume urinário. As consequências clínicas da desidratação dependem mais do padrão de perda de eletrólitos do que do déficit absoluto da água (Kaneko et al., 2008). Com a perda de líquidos para o trato gastrointestinal, os animais podem parecer desidratados e ocorre azotemia (Frazer, 2007).

Nos casos de EPE foram descritos sinais clínicos de alterações gástricas, úlceras (Bihl, 2003; Pusterla e Gebhart, 2009), presença de *Gasterophilus* sp. (Dauvillier et al., 2006) e bruxismo (Allen et al., 2009). A sintomatologia clínica tipicamente associada à úlcera gástrica em potros inclui o bruxismo, decúbito dorsal, salivação, amamentação interrompida e cólica (Reed e Bayly, 2000) e alterações gastrointestinais como o aumento de motilidade (Sampieri et al., 2006), cólica (Pusterla e Gebhart, 2009) e alterações na consistência fecal (Wong et al., 2009; Shimizu et al., 2010; Pusterla et al., 2010a). Na diarreia, há passagem de fezes fluidificadas com frequência e/ou volume aumentados, causada por aumento da taxa de trânsito intestinal, diminuição da absorção intestinal por causas inflamatórias, atrofia dos vilos, linfomas, alterações nas células da mucosa ou aumento da secreção intestinal de água e eletrólitos (Reed e Bayly, 2000).

A fraqueza generalizada (Kimberly et al., 2007; Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009), andar cambaleante (Wuersch et al., 2006) e decúbito prolongado (Kimberly et al., 2007; Allen et al., 2009; Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009) foram relatados nos casos de EPE. Equinos com fraqueza generalizada podem tropeçar, cair ou entrar em colapso. A profundidade e

duração da inconsciência podem variar, mas geralmente dura alguns minutos, por resultar de três fatores: anoxia, anemia ou isquemia (Reed e Bayly, 2000).

Nos casos de EPE, há a presença concomitante de doenças do trato respiratório (Pusterla e Gebhart, 2009) como pneumonia (Dauvillier et al., 2006) e rodococose (Shimizu et al., 2010), além de parasitas entéricos (Dauvillier et al., 2006; Pusterla e Gebhart, 2009; Shimizu et al., 2010), o que pode levar a um aumento de eosinófilos na circulação. Esta célula tem capacidade de defender o organismo contra parasitas helmínticos e participa, junto aos basófilos e mastócitos, na inflamação mediada por células, tendo capacidade de destruir tecidos do próprio organismo. Assim, os eosinófilos são importantes na função homeostática e imune, especialmente na imunidade de mucosa do trato gastrointestinal (Weiss e Wardrop, 2010).

Com o espessamento da mucosa entérica, pela proliferação das criptas, é possível visualizar imagens de alças abdominais com paredes espessadas por meio de exame ultrassonográfico da cavidade abdominal (Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009; Pusterla et al., 2010a).

2.5. ALTERAÇÕES LABORATORIAIS

No levantamento realizado por Wilson e Gebhart (2008), em relação aos dados laboratoriais, foi encontrada a presença de dados controversos como leucopenia (4%) e leucocitose (58%), sendo que em 100% dos casos havia a descrição de hipoproteinemia (Tab.2).

A hipoproteinemia é uma alteração comumente descrita (McClintock e Collins, 2004; Atherton e McKenzie III, 2006; Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006; Divers, 2008; Allen et al., 2009; Merlo et al., 2009). A perda de proteína ocorre pela proliferação das células da cripta e inflamação da lâmina própria na porção distal do intestino delgado (Divers, 2008). Outras causas potenciais incluem fatores hepáticos, renais e entéricos (Bihr, 2003). As proteínas estão envolvidas na nutrição, manutenção da pressão osmótica, tamponamento, transporte de íons e moléculas pequenas, homeostasia e resistência à infecção (Jain, 1986). A proteína total no corpo representa um equilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo. A

concentração plasmática das proteínas reflete um equilíbrio entre a filtração para tecidos, pelos capilares, e o retorno dos tecidos, pela linfa. Este equilíbrio depende da pressão coloidosmótica e da dinâmica da circulação. A tendência do sangue em atrair fluidos dos tecidos, por causa da pressão oncótica coloidal e a pressão hidrostática, contrária à do sangue, tende a forçar o fluido para o espaço tissular (Jain, 1986, 1993). A alteração na concentração das proteínas se deve ao aumento ou diminuição das frações de albumina e/ou globulina. Porém, essas alterações nas frações nem sempre provocam oscilação na concentração das proteínas. Assim, a interpretação dessas alterações deve contemplar a associação da avaliação das frações de albumina e globulina, além da concentração de proteína total (Thrall, 2007).

Tabela 2 - Alterações laboratoriais observadas no levantamento realizado por Wilson e Gebhart (2008).

DADOS LABORATORIAIS	PORCENTAGEM	CASOS
Hipoalbuminemia	100	81/81
Hipoproteinemia	82	89/108
Espessamento de mucosa (US)	62	18/29
Leucocitose	58	57/98
Hiperfibrinogenemia	38	28/73
Anemia	20	9/45
Leucopenia	4	4/98

O fracionamento das proteínas ocorre pelo eletroforetograma com densitometria para determinar a proporção das proteínas encontradas nas frações em conjunto com a concentração total de proteínas. O perfil eletroforético de um equino hígido consiste de seis frações incluindo a albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β_1 -globulina, β_2 -globulina e γ -globulina (Kaneko et al., 2008).

A hipoalbuminemia é descrita na maioria dos casos de EPE (Frank et al., 1998; McClintock e Collins, 2004; Atherton e McKenzie III, 2006; Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006; Divers, 2008; Frazer, 2008; Allen et al., 2009; Merlo et al., 2009; Pusterla et al., 2010a). A albumina é a proteína mais abundante das proteínas plasmáticas, constituindo cerca de 35 a 50% da proteína sérica em diferentes animais. Por ser uma molécula grande, normalmente é retida pelos capilares e a primeira a ser perdida. Atua na regulação e manutenção da pressão oncótica do sangue, no transporte de ácidos graxos livres, ácidos biliares, bilirrubina, porfirinas, cetoesteróides, alguns fármacos como as penicilinas,

barbitúricos, histamina, cátions e de elementos como o cálcio, cobre e zinco. A albumina é produzida no fígado e catabolizada em diversos tecidos. Sua síntese é influenciada pelo estado nutricional, equilíbrio hormonal, condição geral do fígado, estresse e pela concentração extracelular (Jain, 1986, 1993). Pode haver diminuição da produção de albumina em casos de insuficiência hepática, inanição, parasitismo gastrointestinal, má absorção intestinal, insuficiência pancreática exócrina e maior perda em casos de doença glomerular (Thrall, 2007).

A hipoglobulinemia foi descrita apenas por Frank et al. (1998) e Allen et al. (2009). Contudo, foi relatada a hiperglobulinemia levando à normoproteinemia (Sampieri et al., 2006). A ocorrência simultânea de hipoalbuminemia e hipoglobulinemia pode se dever à hiperhidratação, seja por fluidoterapia em excesso ou ingestão de grande volume de água. A perda proporcional de albumina e globulina pode ocorrer nos casos de hemorragia, derrame, dermatite exudativa, queimaduras graves e enteropatia com perda de proteína. Esta última, ocorre em várias lesões intestinais, inclusive com infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e submucosa e obstrução da drenagem linfática, com dilatação de vasos linfáticos. Assim, as frações que extravasam da parede para o lúmen intestinal são digeridas ou excretadas (Thrall, 2007).

A elevação da concentração de fibrinogênio plasmático foi relatada em animais acometidos pela EPE (Frank et al., 1998; Atherton e McKenzie III, 2006; Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006; Divers, 2008; Allen et al., 2009; Pusterla e Gebhart, 2009). O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda, na maioria das espécies, aumentando em condições inflamatórias, supurativas, traumáticas e neoplásicas. A síntese aumentada pelos hepatócitos ocorre por estímulo de mediadores inflamatórios como a interleucina 1 e 6 e fator de necrose tumoral, que induzem a ativação do sistema fagocítico monocitário. Assim, a hiperfibrinogenemia é o melhor indicador de doença inflamatória que a neutrofilia, em bovinos e equinos (Jain, 1986, 1993).

Em resposta à infecção ou lesão, as proteínas de fase aguda são rapidamente lançadas na circulação e sua concentração está diretamente correlacionada à severidade da condição causal. Porém, se a inflamação não é detectada ou não é demonstrada por meio de sinais clínicos, pode resultar em infecções subclínicas que tem como consequência a diminuição do crescimento ou do desempenho (Crisman et al., 2008).

Dentre as alterações do eritrograma, foram descritas a presença de policitemia (Dauvillier et al., 2006) e anemia (Wong et al., 2009). Muitas infecções bacterianas e virais podem causar anemia, direta e indiretamente. A maioria delas são consequências da reação inflamatória. Os agentes infecciosos, seus produtos ou a resposta específica do animal ao agente pode causar a anemia via três processos: hemácias lesadas levando à hemólise intra ou extravascular; danos aos precursores eritróides causando hipoplasia eritróide; ou danos às células hematopoiéticas ou estrômicas, causando hipoplasia medular total. A policitemia ou eritrocitose refere-se ao aumento no número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito ou volume globular médio (VGM) e se desenvolve devido à diminuição do volume plasmático ou perda de fluidos (desidratação associada à êmese, diarreia ou poliúria sem a ingestão de água adequada). Em equinos e caninos, a policitemia pode ocorrer por contração esplênica associada à excitação ou ansiedade, já que as catecolaminas promovem a liberação das células armazenadas no baço (Weiss e Wardrop, 2010).

Em relação ao leucograma, foi relatada a presença tanto de leucocitose (Frank et al., 1998; Bihl, 2003; McClintock e Collins, 2004; Atherton e McKenzie III, 2006; Sampieri et al., 2006; Dauvillier et al., 2006; Divers, 2008; Allen et al., 2009; Wong et al., 2009) quanto de leucopenia (Dauvillier et al., 2006; Pusterla 2010a), presença de neutropenia (Pusterla et al., 2010a) ou neutrofilia (McClintock e Collins, 2004; Dauvillier et al., 2006; Divers, 2008; Wong et al., 2009). O aumento do número de bastonetes e presença de alterações tóxicas nos neutrófilos foram descritas (Frank et al., 1998; Bihl, 2003). Os neutrófilos contribuem com a primeira linha de defesa contra bactérias, fungos, protozoários e alguns vírus, auxiliam no trauma tecidual ou na liberação de sinais inflamatórios. A presença de numerosos receptores de membrana e sinalização celular subsequente, com os constituintes citoplasmáticos específicos dentro dos grânulos (Weiss e Wardrop, 2010). A denominação dos neutrófilos depende de sua fase de maturação. Mielócitos e metamielócitos são estágios prematuros que, em equinos, raramente se encontram na circulação. Bastonetes são a forma imatura antecedente aos segmentados. Os bastonetes não possuem segmentação, porém, possuem quase todas as características dos segmentados. Os neutrófilos segmentados representam o estágio final de maturação dessa linhagem de células, com o aumento da contração nuclear, os segmentos são conectados por finas pontes de cromatina. Seu citoplasma possui grânulos, que dependendo da coloração, podem se tornar rosa ou violeta claros. O número de segmentos aumenta com a idade da célula, sendo que a maioria deve possuir entre dois a três segmentos. Acima de quatro segmentos, ou hipersegmentação, significa que a célula está há bastante

tempo na circulação e pode ocorrer por deficiência de ácido fólico e vitamina B12, além de infecção crônica ou corticoterapia (Theml et al., 2004).

As alterações inflamatórias no leucograma têm diferentes aspectos, dependendo da gravidade e duração da infecção, da lesão ou da condição que causou a reação. Um desvio à esquerda é uma característica de inflamação, com aumento de neutrófilos bastonetes. Se essa população for maior que a população madura de neutrófilos, há um desvio à esquerda degenerativo, pois neutrófilos imaturos e neutrófilos com alterações tóxicas têm diminuição da sua função. As alterações tóxicas são causadas pela aceleração da produção e maturação durante o desenvolvimento na medula óssea, influenciadas por inúmeros mediadores inflamatórios, citocinas e produtos de agentes infecciosos. A leucocitose normalmente é acompanhada por neutrofilia; quando a medula óssea está repleta, pelo aumento da granulopoiese, as células são liberadas na circulação e a produção é maior que o gasto (Weiss e Wardrop, 2010).

A leucopenia é um achado significativo e, normalmente, vem acompanhada pela neutropenia. A neutropenia pode predispor o paciente a infecções e ser resultante de três fatores: produção insuficiente; redistribuição do “pool” circulante para o marginal após exposição às endotoxinas, estas levam a um aumento da adesão dos neutrófilos às células endoteliais, e, assim que cessa a exposição às endotoxinas há um rebote neutrofílico; em terceiro lugar, gasto maior que a capacidade de produção da medula óssea (Weiss e Wardrop, 2010).

A linfocitose foi relatada em três casos de EPE, descritos por Frank et al. (1998), Dauvillier et al. (2006) e Wong et al. (2009). Quando células imaturas são liberadas na circulação, possuem núcleo pequeno, com formato oval ou arredondado, com cromatina densa e não podem ser diferenciados morfológicamente em células T ou B, que apenas se transformam devido a um estímulo imunológico específico (Theml et al., 2004). A linfocitose pode ocorrer após a exposição antigênica (Weiss e Wardrop, 2010).

Nos casos de EPE, foram relatadas alterações na bioquímica sérica e equilíbrio hidroeletrólítico, levando à acidose metabólica (Bihr, 2003), azotemia (Frank et al., 1998; Bihr, 2003; Sampieri et al., 2006; Wong et al., 2009), aumento da uréia (Allen et al., 2009; Wong et al., 2009), da creatinina (Frank et al., 1998; Sampieri et al., 2006; Wong et al., 2009), da creatina quinase (CK) (Sampieri et al., 2006; Divers, 2008), da aspartato aminotransferase

(AST) (Divers, 2008) e do fosfato (Bihl, 2003) e diminuição das concentrações séricas de cloro (Sampieri et al., 2006; Dauvillier et al., 2006; Divers, 2008; Wong et al., 2009), bicarbonato (Sampieri et al., 2006), sódio (Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006; Divers, 2008; Wong et al., 2009), potássio (Bihl, 2003), magnésio (Bihl, 2003; Wong et al., 2009) e cálcio (Sampieri et al., 2006; Divers, 2008). A hipocalcemia ocorre como consequência da hipoalbuminemia, por ser seu principal carreador na circulação (Divers, 2008).

As anormalidades de hidroeletrólíticas sanguíneas associadas à diarreia incluem depleção de volume, hiponatremia ou hipernatremia, hipocalemia e acidose metabólica pela perda de bicarbonato. Na hipocalemia, os animais podem demonstrar fraqueza muscular, poliúria, polidipsia e diminuição da capacidade de concentrar a urina. Na enteropatia por perda de proteínas, são observadas também a hipocalcemia e hipomagnesemia. A água presente nas fezes contém concentração de potássio maior do que a de sódio e o aumento da concentração de potássio nas fezes pode resultar em diarreia grave e prostração. A perda gastrointestinal é quase sempre de natureza hipotônica. A depleção de volume reduz a taxa de filtração glomerular e exacerba a reabsorção isosmótica de sódio e água nos túbulos proximais, diminui a liberação de fluido tubular aos locais de diluição distal e estimula a liberação de vasopressina, prejudicando a excreção de água, além da ingestão de água apenas diluir o fluido intravascular (DiBartola, 2007). Os animais afetados podem apresentar acidose metabólica, devido à perda de bicarbonato pelo trato gastrointestinal. A azotemia aparece devido às perdas de líquido pelo trato gastrointestinal, sendo necessário o acompanhamento pela uréia e creatinina séricas (Frazer, 2007).

Na enzimologia, a atividade da alanino aminotransferase (ALT) é encontrada em diversos órgãos. Em cães e gatos, sua atividade aumentada está relacionada com lesão hepática, porém, o mesmo não ocorre em equinos e ruminantes. O aumento da atividade da ALT ocorre devido a diferentes desordens, como a hipóxia secundária à anemia, doenças metabólicas como a lipidose, desordens nutricionais como a intoxicação por cobre, doenças inflamatórias ou infecciosas e lesão traumática ao fígado. A atividade da aspartato aminotransferase (AST) é relativamente alta no fígado, músculo cardíaco e esquelético e não se pode distinguir a lesão entre os dois tecidos quando ela se encontra aumentada. A atividade da AST também é alta no rim, coração, músculos, pâncreas e eritrócitos. Para marcador de lesão hepática, a AST é menos específica que a ALT. A gama glutamil transpeptidase (GGT)

se encontra em maior concentração tecidual no rim, pâncreas, intestino e glândulas mamárias de cães e ruminantes. Menor atividade é encontrada no fígado, baço, pulmões e vesículas seminais. Equinos e ruminantes apresentam maior atividade hepática da enzima, sendo um indicador de colestase ou doença hepática. A GGT demonstrou ter sensibilidade para detecção de lesão hepática secundária à enterite proximal em equinos. A fosfatase alcalina (FA) tem maior atividade nas células do fígado, ossos, rim, mucosa intestinal e placenta. Entretanto, a fração intestinal não é encontrada no soro e o fígado, que tem uma atividade de FA relativamente baixa, contribui com mais da metade da atividade sérica. A maior concentração de atividade de CK ocorre no músculo esquelético, seguido pelo músculo cardíaco, diafragma, músculo liso e cérebro. Sua avaliação é utilizada principalmente na lesão muscular associada ao trauma, miopatia nutricional, lesão muscular induzida pelo exercício ou miopatias congênitas. Em grandes animais, o aumento de atividade de CK também pode ser causado por decúbito prolongado ou pressão necrótica no músculo. Na doença muscular, a AST e CK devem estar aumentadas. No trauma agudo, há o aumento de CK anterior ao de AST e sua diminuição ocorre antes da queda de AST. A uréia e creatinina são duas moléculas utilizadas como marcadores da função renal. A creatinina é produzida através da degradação da creatina e da creatina-fosfato, formas de armazenamento de energia principalmente presentes nos músculos esqueléticos. É filtrada pelos glomérulos e secretada pelos túbulos renais, podendo ser rapidamente eliminada do plasma pela urina. A uréia é sintetizada no fígado, a partir do bicarbonato e amônia, sendo a principal forma de excreção do nitrogênio. É filtrada pelos glomérulos e reabsorvida do túbulo coletor, sendo sua reabsorção maior quando o fluxo de urina no túbulo está reduzido. Outra fonte importante da uréia é o catabolismo de aminoácidos que irão formar as proteínas, principal fonte de amônia para a síntese de uréia (Kaneko et al., 2008).

2.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da EP pode ser realizado através da associação de sinais clínicos e de três técnicas: a imunoistoquímica em fragmentos de intestino suspeitos coletados na necropsia (Guedes e Gebhart, 2003a), moleculares, através da PCR de amostras fecais (Jones et al.,

1993) e sorológicas (Guedes et al., 2002a; Al-Ghamdi, 2003). Estas três técnicas foram testadas e validadas em potros por Al-Ghamdi (2003).

Para a técnica de imunoistoquímica, realizada como diagnóstico *post mortem*, existem anticorpos monoclonais e policlonais específicos para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003a), sendo um teste de alta sensibilidade, cerca de 98% (Guedes et al., 2002b). Wuersch et al. (2006) relatam ser a imunoistoquímica o teste de maior sensibilidade, quando comparado a outras técnicas. Segundo Guedes et al. (2002b), este método é mais sensível que a coloração histológica de hematoxilina-eosina, pela coloração da prata e a PCR de amostras fecais.

A PCR de amostras fecais é um teste qualitativo para determinar se há disseminação da bactéria para o ambiente. É sensível e específico quando realizado em mucosa intestinal infectada, entretanto, ao ser realizado em fezes esta técnica perde sensibilidade, podendo ocorrer resultados falso-negativos (Knittel et al., 1998; Jacobson et al., 2004), sendo reportada para detecção da eliminação da bactéria nas fezes de potros enfermos (Lavoie et al., 2000). Pusterla et al. (2010b) descreveram a utilização da PCR quantitativa para avaliar a disseminação da *L. intracellularis* pelas fezes, detectando maior eliminação de bactérias nas fezes de um potro que apresentou sinais clínicos mais pronunciados em relação a outros do mesmo grupo.

No estudo realizado por Pusterla et al. (2010a), foi demonstrado que o *swab* retal de potros infectados pode ser utilizado quando há diminuição ou ausência de fezes. A taxa de detecção por PCR de 76% e 79% para os *swabs* retais e fezes, respectivamente, aumentou para 90% quando foram associadas as duas formas de coleta.

Jacobson et al. (2004) testaram diferentes métodos para detecção da *L. intracellularis* e indicaram que a forma mais eficaz de detecção da bactéria é por meio de PCR das amostras de fezes ou tecidos, apesar da técnica de “nested” PCR demonstrar melhores resultados. Porém, a “nested” PCR não é um exame adequado para ser realizado na rotina clínica. Os autores afirmaram que amostras preparadas para PCR, por meio de kit comercial, que inativa as substâncias inibitórias, seria o mais preferível.

A sorologia tem sido realizada como uma ferramenta de diagnóstico barata e fácil para se obter o estado da doença e a epidemiologia de diferentes agentes infecciosos no sistema de produção de suínos. A titulação de anticorpos em amostras de soro pode ser realizada por diferentes técnicas, tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA) com boa sensibilidade e

especificidade é uma possibilidade de diagnóstico alternativo da EP em suínos (Boesen et al., 2005; Wanttanaphansak et al., 2008), já tendo sido desenvolvido um ensaio imunoenzimático com bloqueio monoclonal (blocking-ELISA) validado por Jacobson et al. (2011). Porém, as técnicas mais utilizadas são a imunofluorescência indireta (IFAT) (Lavoie et al., 2000), com 91% de sensibilidade e 97% de especificidade (Knittel et al., 1998), imunoperoxidase em lâmina de vidro (IPX) e imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA) (Guedes et al., 2002ab; Al-Ghamdi, 2003; Atherton e McKenzie III, 2006; Kimberly et al., 2007). Em suínos, os testes sorológicos de IPMA apresentam sensibilidade alta, cerca de 90% e especificidade de 100% nas diluições a partir de 1:30 e não fazem reação cruzada com outras espécies de bactérias (Guedes et al., 2002b). Ao ser comparada à IFAT, a IPMA demonstrou ter a mesma sensibilidade e custo, porém é um teste que pode ser mantido por mais tempo, com armazenamento dos tampões por longos períodos a -20°C e necessita, somente, de um microscópio de luz invertida para sua leitura (Guedes et al., 2002c), sendo considerada o padrão ouro para o diagnóstico *antemortem* da EPE quando associada à PCR das fezes.

2.7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Vários são os agentes etiológicos envolvidos em processos de diarreias em potros e todos devem ser levados em consideração no diagnóstico diferencial, incluindo as doenças parasitárias (*Strongylus* spp., *Strongyloides westeri*), bacterianas (*Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Rhodococcus equi*, *Mycobacterium* spp., *Neorickettsia risticii*, *Escherichia coli*, *Anaplasma phagocitophilum*), virais (rotavírus, coronavírus, adenovírus e parvovírus), protozoárias (*Criptosporidium* spp., *Giardia*) (Bihl, 2003) e outros agentes que resultem em enterocolites ou enterites (Frank et al., 1998; Brees et al., 1999; Lavoie et al., 2000; Bihl, 2003).

A realização do diagnóstico diferencial para doenças renais, hepáticas e entéricas, deve incluir a bioquímica de sangue (Bihl, 2003).

O diagnóstico das infecções parasitárias e protozoárias pode ser realizado por exame de flutuação fecal ou através do exame direto das fezes para visualização. Na infecção protozoária do intestino, pode haver invasão intracelular dos enterócitos, resultando em morte

celular, perda das vilosidades, má digestão e má absorção, estímulo à secreção entérica e contribuição nas alterações da consistência fecal. Nos casos de estrongilose, o animal apresenta depressão, cólica moderada a grave e febre, sendo a diarreia menos frequente. Alterações hematológicas incluem leucocitose neutrofílica e eosinofilia, com hiperfibrinogenemia e aumento das α e β -globulinas e de IgG (Reed e Bayly, 2000).

Nas infecções virais do intestino, ocorre a invasão das células epiteliais que revestem as vilosidades, causando má digestão, pela perda de enzimas por secreção, e má absorção pela perda da superfície absorptiva. Isto ocasiona um aumento de partículas osmóticas no lúmen, o que resultará no influxo de líquido e eletrólitos para dentro do lúmen intestinal, com piora do quadro clínico pela adição de um componente secretor. As diarreias causadas por rotavírus são mais frequentes em potros mais velhos, quando comparada à diarreia do cio do potro, que ocorre em potros entre quatro a 15 dias de idade. O rotavírus acomete potros entre uma a quatro semanas de vida, na forma de diarreia aquosa, abundante (Reed e Bayly, 2000).

Nas infecções bacterianas, o diagnóstico pode ser realizado por meio do isolamento ou cultivo, métodos sorológicos ou moleculares. Na anaplasmose, ocorre invasão da mucosa gastrointestinal, com ruptura das vilosidades colônicas. Os animais infectados apresentam anorexia, depressão e febre, diminuição da motilidade do trato gastrointestinal e diarreia profusa. Alterações hematológicas refletem a endotoxemia, desidratação e sepse, assim como descrito para a salmonelose. Na salmonelose, os primeiros sinais são febre e anorexia, podendo apresentar cólica, mucosa oral pálida e com halo cianótico, e, em casos graves, pode-se observar fraqueza, fasciculações musculares, extremidades frias e outros sinais de hipertermia e choque. Desidratação leve pode ser observada antes do aparecimento da diarreia, que varia de aquosa à líquida, com odor fétido. As alterações hematológicas iniciais incluem leucopenia com neutropenia e linfopenia moderadas a graves, desvio à esquerda e alterações tóxicas dos neutrófilos. Pode haver trombocitopenia, hemoconcentração moderada a grave e hiperfibrinogenemia. A bioquímica sérica apresenta alterações, tais como: azotemia, aumento da atividade da GGT diminuição das proteínas plasmáticas, com hipoalbuminemia e hipoglobulinemia moderadas a graves, hiponatremia, hipocalemia, hipocloremia, hipocalcemia e acidose metabólica (Reed e Bayly, 2000).

Nas clostridioses, os animais podem apresentar febre, anorexia e depressão, com sinais agudos de cólica e diarreia grave desidratante, que normalmente é escura e de odor fétido. As

alterações hematológicas e bioquímicas se assemelham às das salmoneloses (Reed e Bayly, 2000).

Na rodococose, potros entre três semanas a seis meses de idade são os mais acometidos. A manifestação mais comum é a broncopneumonia com abscessos. Os sinais clínicos mais frequentes são taquipnéia, tosse e secreção nasal mucóide a mucopurulenta e mucosa. Quando há envolvimento intestinal, os principais sinais clínicos manifestados são cólica e diarréia. As principais alterações laboratoriais são leucocitose neutrofílica com ou sem monocitose, hiperfibrinogenemia e trombocitose (Hines, 2007).

A micobacteriose é rara em equinos, e quando ocorre, é diagnosticada apenas quando a doença já está instalada. Ocorre em animais com mais de um ano de idade, com histórico de curso da doença variando entre dois meses a um ano. Os sinais clínicos são inespecíficos, como depressão, febre intermitente e perda de peso. Muitos animais apresentam uma discreta neutrofilia e, poucos, anemia. Uma das mais consistentes apresentações da doença é a de diarréia crônica, com envolvimento de intestino delgado, ceco ou cólon. Muitos desses equinos têm hipoalbuminemia, devido à má-absorção e perdas de proteínas por enteropatia, resultando em ascite, efusão pleural e edema (Oaks, 2007).

2.8. TRATAMENTO

Para o tratamento da enteropatia proliferativa, os objetivos são eliminar a bactéria e fornecer medidas de suporte (Frazer, 2007).

2.8.1. Medidas de Suporte

Medidas de suporte consistem em fluidos intravenosos para corrigir desidratação, desequilíbrios eletrolíticos e azotemia (Frazer, 2007). A correção do desequilíbrio hidro-eletrolítico inclui a administração de fluidos poliônicos (Frank et al., 1998; Bihl, 2003; Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007; Divers, 2008; Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009; Page et al., 2011a), gluconato de cálcio

(Sampieri et al., 2006; Merlo et al., 2009), cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e sulfato de magnésio (Sampieri et al., 2006).

A solução para nutrição parenteral ou a administração de dextrose foi realizada por Atherton e McKenzie III (2006) e Wong et al. (2009). Se o animal está debilitado e em anorexia, a administração de dextrose ou de alimentação parenteral pode ser utilizada (Frazer, 2007).

A utilização da transfusão de plasma (Frank et al., 1998; Bihr, 2003; Atherton e McKenzie III, 2006; Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007; Divers, 2008; Frazer, 2008; Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009; Page et al., 2011a) e de colóides sintéticos como o hetastarch (Atherton e McKenzie III, 2006; Sampieri et al., 2006; Divers, 2008; Frazer, 2008; Allen et al., 2009; Merlo et al., 2009; Page et al., 2011a) foram descritos. A administração de soluções coloidais é importante pela perda profunda de albumina. A transfusão de plasma pode ser útil para estabilizar a pressão oncótica assim como a utilização de colóides sintéticos (Frazer, 2007).

Se necessário, podem ser utilizados o plasma hiperimune (Kimberly et al., 2007; Allen et al., 2009) e solução salina hipertônica (Kimberly et al., 2007). O plasma hiperimune é utilizado para reduzir os efeitos das endotoxinas (Moyer et al., 2008), fornecendo anticorpos e repondo proteínas plasmáticas. A dose recomendada é de 1,5ml/ kg, intravenosa (IV), diluído em solução salina isotônica ou em solução Ringer Lactato (1:10 a 1:20), administrado em uma a duas horas, com finalidade de redução das reações de hiper-sensibilidade imunomediadas (Robinson, 2003).

Sampieri et al. (2006) descreveram a utilização de antiinflamatórios não esteroidais, principalmente a flunixinina meglumine (0,25-1,1mg/kg -BID-QID, por via IV) (Frank et al., 1998; Atherton e McKenzie III, 2006; Dauvillier et al., 2006; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007; Page et al., 2011a), assim como a utilização de corticosteróides, como a dexametasona (0,1-0,5mg/kg, SID, por via IV) (Frank et al., 1998; Bihr, 2003; Atherton e McKenzie III, 2006) ou prednisolona (0,5-1,0mg/kg, SID-BID,PO) (Frank et al., 1998; Bihr, 2003; Atherton e McKenzie III, 2006; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007). Já Frazer (2007) não recomenda a utilização de corticoesteróides por falta de componentes inflamatórios no exame histopatológico.

Animais com exames coproparasitológicos positivos para ovos de vermes foram medicados com ivermectina (0,2mg/kg, PO - Bihr, 2003; Merlo et al., 2009) ou febendazole (50mg/kg, PO - McClintock e Collins, 2004; Atherton e McKenzie III, 2006).

Para prevenção ou tratamento de úlceras gástricas, foram utilizados gastroprotetores como antagonistas do receptor H₂ (Sampieri et al., 2006), omeprazol (2-4mg/kg, SID, PO; Atherton e McKenzie III, 2006), ranitidina (6,6mg/kg, TID, PO; Kimberly et al., 2007; Merlo et al., 2009), cimetidina (4,4-18mg/kg, TID-QID, PO; Frank et al., 1998; Bihr 2003; Dauvillier et al., 2006) e sucralfato (2mg/kg, TID, PO; Bihr, 2003).

2.8.2. Terapêutica

A eliminação da bactéria necessita de um antibiótico com boa penetração celular. Apesar da penicilina e ampicilina proverem adequada concentração intracelular, o espectro para bactérias gram-positivas faz com essas drogas sejam menos eficazes que um antibiótico com um maior espectro para gram-negativas (Frazer, 2007).

2.8.2.1. Macrolídeos

Os macrolídeos impedem a síntese protéica bacteriana, são antibióticos bacteriostáticos. São drogas com espectro de ação intermediário, ativos contra bactérias gram-positivas e possuem boa atividade contra bactérias anaeróbias. São moléculas bastante lipossolúveis e atravessam as barreiras celulares com facilidade. São bem absorvidos quando administrados por via oral (Spinosa et al., 2006).

Nesse grupo, foi descrita a utilização de eritromicina (25-37,5mg/kg, BID-TID, PO; Bihr, 2003; McClintock e Collins, 2004; Dauvillier et al., 2006; Kimberly et al., 2007; Allen et al., 2009), claritromicina (7,5mg/kg, BID, PO; Atherton e McKenzie III, 2006; Frazer, 2007, 2008; Page et al., 2011a) e azitromicina (10 mg/kg, SID, PO; Atherton e McKenzie III, 2006).

A administração de eritromicina em potros deve ser realizada com cautela risco de induzirem à colite e diarreia secundária (Papich, 2003).

2.8.2.2. Tetraciclina

As tetraciclina inibem a síntese protéica dos microorganismos sensíveis, ligando-se aos ribossomas, impedindo sua ligação com o RNA-transportador. Têm largo espectro de ação, atuando em bactérias gram-positivas e gram-negativas, clamídias, riquetsias e até sobre alguns protozoários. As tetraciclina podem ser administradas tanto por via oral quanto por via parenteral. A injeção intramuscular provoca dor local. A presença de alimentos no trato digestivo pode prejudicar a absorção das tetraciclina administradas por via oral com exceção da doxiciclina. As tetraciclina formam quelatos insolúveis com o cálcio, magnésio, zinco, ferro e alumínio. A presença de leite e derivados, preparações vitamínicas, antiácidos e catárticos podem diminuir a absorção desse grupo de fármacos. As concentrações plasmáticas são alcançada cerca de uma a três horas após a administração oral. A excreção ocorre por filtração pelos glomérulos renais (Spinosa et al., 2006).

A utilização de tetraciclina é eficaz com baixa incidência de efeitos colaterais e mais barato quando comparado à terapia com macrolídeos (Sampieri et al., 2006). A utilização de oxitetraciclina (6,6-18 mg/kg, SID-BID, IV ou infusão; Sampieri et al., 2006; Frazer, 2007; Divers, 2008; Merlo et al., 2009; Wong et al., 2009; Page et al., 2011a) deve ser realizada com cuidado, pois pode ser nefrotóxica. A função renal deve ser monitorada, já que a droga se liga à albumina, que está normalmente baixa em animais com EP, fazendo com que se tenha altas concentrações circulantes da droga, aumentando sua nefrotoxicidade. Sua administração deve ser por meio de infusão lenta para evitar quelar cálcio e causar complicações cardiovasculares (Frazer, 2007). Uma alternativa é a administração da doxiciclina (10-20 mg/kg, SID-BID, PO; Atherton e McKenzie III, 2006; Sampieri et al., 2006; Frazer, 2007; Divers, 2008; Merlo et al., 2009).

2.8.2.3. Rifampicina

O espectro de ação antimicrobiana das rifamicinas pode ser considerado intermediário. A rifampicina possui o maior espectro de ação, atuando sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, micobactérias, estafilococos e tem certa atividade sobre vírus e fungos. Inibem a atividade enzimática bacteriana. Tem ação primariamente bacteriostática, porém observa-se efeito bactericida, devido aos microorganismos apresentarem sensibilidade a concentrações muito baixas deste antibiótico (Spinosa et al., 2006).

Pode ser utilizado na EP em associação aos macrolídeos na dose de 5-10 mg/kg, BID-TID, PO (Bihar, 2003; McClintock e Collins, 2004; Atherton e McKenzie III, 2006; Kimberly et al., 2007; Divers, 2008; Page et al., 2011a).

2.8.2.4. Cloranfenicol

O cloranfenicol é um antibiótico de largo espectro de ação, atuando sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, riquetsias, espiroquetas e micoplasma. Ele atua inibindo a síntese de proteínas e é bacteriostático. Deve ser utilizado com cautela por também inibir a síntese proteica mitocondrial das células da medula óssea de mamíferos. Nos monogástricos, sua absorção é boa no trato digestivo, liga-se a proteínas plasmáticas e se distribui relativamente bem em todos os tecidos. O cloranfenicol é biotransformado no fígado, sendo eliminado conjugado com o ácido glicurônico. Parte pode ser excretada de forma intacta pela urina ou pela bile (Spinosa et al., 2006).

Pode ser utilizado na EP com bons resultados na dose de 20-50 mg/kg, TID-QID, PO (Atherton e McKenzie III, 2006; Frazer, 2007, 2008; Kimberly et al., 2007; Page et al., 2011a).

2.8.2.5. Metronidazol

O metronidazol é um quimioterápico usado no tratamento de infecções causadas por bactérias anaeróbias, com ação também em protozoários. É biotransformado no fígado, por oxidação e conjugação por glicuronídeo, com parte sendo excretada na urina (Spinosa et al., 2006).

Pode ser utilizado associado a outros antibióticos na EP na dose de 10-20 mg/kg, BID-QID, PO (Dauvillier et al., 2006; Frazer, 2007, 2008; Divers, 2008).

2.8.2.6. Outros

Foi descrita a administração de enrofloxacin (7,5 mg/kg, SID, PO) com ou sem associação à penicilina potássica (20000 U/kg, QID, IV), em casos de EPE (Page et al., 2011a).

A enrofloxacin é uma quinolona de segunda geração, um antimicrobiano bactericida. O uso de cloranfenicol (inibidor de síntese protéica) ou rifamicina (inibidor da síntese de DNA), concomitantemente ao uso das quinolonas, produzirá efeito antagônico, pois é necessário haver produção de RNA e síntese de proteínas para que a quinolona desempenhe seu efeito bactericida. É rapidamente absorvida por via oral, atinge seu pico em meia hora em equinos, tem ampla distribuição e tem baixa ligação às proteínas plasmáticas. A utilização em potros deve ser realizada com cautela por ter efeito adverso em cartilagens articulares (Spinosa et al., 2006).

As penicilinas impedem a síntese de parede celular, são bactericidas, têm espectro de ação pequeno, atuam principalmente em bactérias gram-positivas. Se distribuem pelo organismo, não são biotransformadas, sendo eliminadas pelos rins, 90% por secreção tubular e 10% por filtração glomerular (Spinosa et al., 2006).

2.9. PROFILAXIA

Atualmente estão sendo realizadas pesquisas em relação a vacinação. Em suínos já estão sendo desenvolvidas vacinas com cepas vivas avirulentas administradas por via oral junto à fonte de água com bom índice de proteção, diminuindo o estresse da manipulação para vacinação (Kroll et al., 2004).

Pusterla et al. (2009a) avaliaram a resposta imune de potros vacinados por via oral e retal de uma cepa viva avirulenta. Neste estudo, foi constatada a presença das cepas nas fezes do grupo de animais vacinados por via retal, indicando a possibilidade da contaminação do ambiente e da disseminação da doença. Entretanto, os animais que foram administrados omeprazol três dias antes da administração da vacina obtiveram uma resposta humoral precoce e mais forte que os potros que não receberam nenhum tipo de gastroprotetor.

Pusterla et al. (2009b) ao compararem dois tipos de vacinas administradas via retal, congelada e liofilizada, concluíram que ambas mostraram potencial similar em termos de respostas sorológicas. Porém, a vacina congelada obteve soroconversão 30 dias antes da liofilizada, mas os autores constataram que a liofilizada era mais prática de ser aplicada, pois a congelada deve ser descongelada sob um protocolo severo, além de ser mantida à temperatura de -80°C.

Nogradi et al. (2011) avaliaram a eficácia da cepa viva avirulenta em uma fazenda com conhecido surto anual da doença e constataram que ao vacinarem 50% dos potros, por via retal, a prevalência diminuiu. Os autores especularam que as cepas eliminadas pelos animais vacinados podem ter gerado alguma resistência no grupo controle, visto que ambos grupos permaneceram no mesmo local, e, ainda que pela vacinação destes potros, a contaminação ambiental também diminuiu, por diminuir a quantidade de animais que eliminariam *L. intracellularis* após a exposição natural.

Em um estudo conduzido por Pusterla et al. (2009c), éguas gestantes foram vacinadas por via retal para avaliar a eliminação das cepas nas fezes e se a imunidade foi transferida aos potros. Oito éguas foram vacinadas, seis soroconverteram, e apenas duas éguas apresentaram anticorpos no colostro. Seis potros apresentaram titulação entre 60 e 120. Assim, os autores

comprovaram que há transferência passiva de anticorpos específicos para *L. intracellularis*, com a vacinação das éguas três a cinco semanas pré-parto.

Em todos os estudos supracitados, foram recomendadas a administração de duas doses com intervalo mínimo de 30 dias, nenhum animal apresentou a forma clínica da doença por causa da vacina e nos animais em que a vacina foi administrada por via retal, foi observada a eliminação de cepas avirulentas pelas fezes.

Em suínos foi estudada a relação da resposta mediada por células e resposta imune humoral com a vacinação e com o desafio com um isolado de *L. intracellularis*. A titulação sérica foi maior em suínos desafiados que nos vacinados, assim como as respostas imune mediada por células e humoral apresentaram-se mais retardadas no grupo vacinado. Em ambos grupos foram detectadas respostas 13 semanas após a exposição. A maior produção de interferon gama (IFN- γ) foi no grupo desafiado, seguido pelo vacinado (Guedes e Gebhart, 2003b).

Em potros, a expressão do IFN- γ foi estudada em animais vacinados e expostos naturalmente (Pusterla et al., 2011). A expressão do IFN- γ foi significativamente maior nos potros vacinados nos dias 60-180 após a primeira administração da vacina, quando comparados ao grupo controle. Quando comparada entre o grupo vacinado e o grupo naturalmente exposto, houve diferença significativa apenas no dia da exposição/vacinação.

Em um estudo para caracterizar a resposta do IFN- γ à *L. intracellularis*, foi observada uma menor expressão do IFN- γ em animais que apresentaram a doença na forma clínica (Page et al., 2011b). Animais que não foram afetados pela doença ou apresentaram a forma subclínica demonstraram uma expressão significativa maior do IFN- γ no 20º dia após o desafio, indicando assim uma função protetora à essa citocina na EP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EXPERIMENTO I – ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNOPEROXIDASE EM LÂMINA DE VIDRO (IPX) E DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADAS DE CÉLULAS (IPMA) NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Lawsonia intracellularis* EM EQUINOS.

3.1.1. Caracterização dos animais testados

Foram utilizadas 223 amostras de soro de equídeos de diferentes raças, na maioria de criatórios de animais para exposição ou trabalho, criados em sistema extensivos, oriundos de nove propriedades particulares e do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG (HV-EV-UFMG). As de propriedades estão localizadas nos municípios de Lagoa Santa, Pedro Leopoldo, Caeté, Nova Lima e Inhaúma. Os animais oriundos do HV-EV-UFMG foram aqueles nascidos na Escola de Veterinária e potros internados com diarreia e sem diagnóstico etiológico, oriundos do município de Nova Lima.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética (CETEA-UFMG). O material foi coletado durante os anos de 2007 a 2008. Em cada local visitado, eram obtidas informações sobre a propriedade, identificação, idade e sexo dos animais, histórico de diarreia e outras afecções, período de ocorrência e característica das fezes. O exame clínico foi realizado e os dados anotados em ficha própria (anexo I e II).

As propriedades utilizadas neste estudo foram aquelas em que o proprietário e/ou veterinário relatou problemas de diarreia. Dentre os animais utilizados, 206 eram potros e 17 éguas adultas lactantes. A idade média dos potros era de $9,65 \pm 0,33$ meses. O objetivo não era de coletar animais adultos, somente eram coletadas as respectivas mães dos potros que estavam em amamentação. Se havia um animal que tinha histórico de diarreia, todos os animais daquele lote eram coletados.

De acordo com o resultado da sorologia (IPX e/ou IPMA) para *Lawsonia intracellularis*, os animais foram divididos em positivos e negativos. Os animais positivos

foram agrupados em positivos na técnica de IPX, positivos na técnica de IPMA, ou, simultaneamente em ambas as técnicas IPX e IPMA.

3.1.2. Técnicas sorológicas

As técnicas sorológicas utilizadas foram descritas por Al-Ghamdi (2003). Foram utilizadas duas cepas de *L. intracellularis* (VPB4 e 15540). A VPB4 era proveniente de um isolado de suíno, mantido e propagado no Laboratório de Enteropatia Proliferativa da University of Minnesota, Estados Unidos. A cepa foi cedida pela Dra. Connie J. Gebhart, da University of Minnesota. A 15540 é uma cepa utilizada na vacina comercial Enterisul Ileitis* propagada no Laboratório de Patologia Molecular da EV da UFMG.

As avaliações dos dois testes sorológicos foram realizadas por diferentes indivíduos.

3.1.2.1. Técnica de imunoperoxidase em lâminas de vidro (IPX)

Uma suspensão (10 µL de suspensão contendo $1,5 \times 10^6$ bactérias/mL, cepa VPB4) foi adicionada a cada uma das 12 concavidades de uma lâmina de vidro¹ (Fig.1). Estas lâminas foram secas em estufa (37°C) e, posteriormente, fixadas em acetona a -20°C, por 20 segundos. As amostras de soro foram diluídas em tampão salino fosfatado (PBS), em diluições seriadas (1:30 e 1:60). Após rehidratação das lâminas com PBS, 10 µl das amostras diluídas foram adicionados a cada concavidade. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, por 45 minutos à 37°C, e lavadas em PBS. Em seguida, 10 µL de anticorpo anti-IgG de equino, conjugado com peroxidase², diluído em uma solução de PBS, leite em pó desnatado e Tween 20, foram adicionados a cada concavidade e a lâmina foi incubada por 45 minutos, em câmara úmida à 37°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e adicionada uma solução de AEC (3-amino 9-etil carbazol), diluída em tampão acetato e peróxido de hidrogênio, de acordo com as recomendações do fabricante², e mantidas à

¹ Perfecta, São Paulo - SP

² Sigma, St. Louis, MO, USA

temperatura ambiente, por cinco minutos. As lâminas foram montadas com meio de montagem aquoso³ e examinadas em microscópio óptico. As amostras foram consideradas positivas quando da visualização de bactérias nas preparações, na diluição 1:60. Em cada lâmina, foi adicionado controle positivo (Fig.2) e negativo (Fig.3). No controle positivo, foram utilizadas amostras de soro equino positivo, cedidas pela Dra. Connie J. Gebhart, da University of Minnesota, nas mesmas diluições usadas para as amostras a serem testadas (1:30 e 1:60). O controle negativo foi a solução de PBS, leite em pó desnatado e Tween 20 em substituição ao soro, na primeira incubação.

3.1.2.2. Técnica de imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMA)

A *L. intracellularis* foi adicionada ao meio de cultura de células de McCoy, como antígeno para crescer como descrito por Guedes et al. (2002a). As células foram fixadas na placa pela adição da solução 1:1 metanol-etanol por 20 segundos. Após rehidratação das placas com PBS, as amostras de soro foram diluídas em PBS a 1:60 e 100µL das amostras diluídas foram adicionadas a cada poço, incubadas em câmara úmida por 30 minutos e enxaguadas três vezes com PBS. Foram adicionados 95µL de um conjugado de peroxidase (Sigma⁴) com soro fetal bovino (FBS), Tween 20 e com anti-IgG equino, diluído 1:4000, em cada poço e incubado em câmara úmida, à 37°C por 45 minutos. Após incubação, as placas foram lavadas em PBS e foram adicionados 100µL de solução de AEC diluída em tampão acetato e peróxido de hidrogênio, sendo incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. As placas, então, foram lavadas três vezes com água destilada e secas em estufa, à 37°C por 20 minutos. As placas foram examinadas em microscópio óptico invertido. Foram utilizados controles positivos (Fig.5) e negativos (Fig.6) em cada placa. Para controle positivo, foram utilizadas amostras de soro positivo, na mesma diluição usada para as amostras testadas (1:60). O controle negativo foi a solução de PBS, leite em pó desnatado e Tween 20 em substituição ao soro, na primeira incubação. As amostras foram consideradas positivas quando da visualização das bactérias nas preparações.

³ Dako Faramount Aqueous Mounting Medium

⁴ Sigma, St. Louis, MO, USA

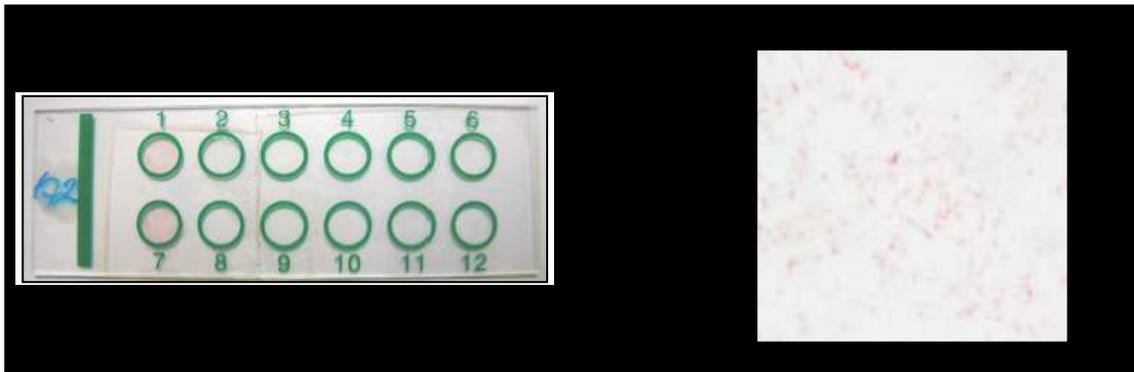


Figura 1 – Lâmina com 12 poços para teste de IPX.

Figura 2 – Controle positivo da sorologia por IPX.



Figura 3 – Controle negativo da sorologia por IPX .

Figura 4 - Placa de 96 poços para a realização da sorologia IPMA.

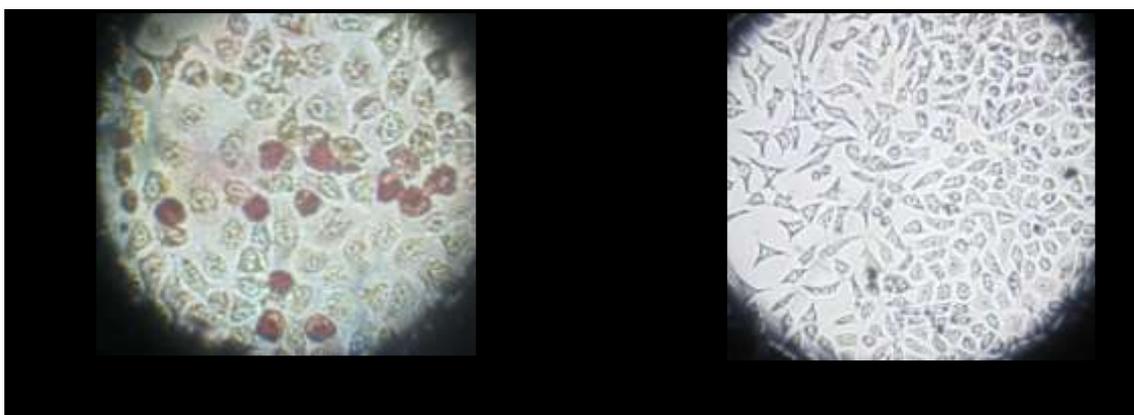


Figura 5 – Controle positivo de soro equino utilizado para a sorologia IPMA. Observar as bactérias coradas fortemente em tom rosa amarronzado dentro das células de McCoy.

Figura 6 – Controle negativo para a sorologia IPMA. Observar que não há nenhuma célula corada.

3.2. EXPERIMENTO II – AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE EQUINOS TESTADOS PARA *Lawsonia intracellularis* EM AMOSTRAS DE SOROLOGIA (IPMA) E PCR EM FEZES.

3.2.1. Caracterização dos animais testados

As propriedades utilizadas neste estudo foram aquelas em que o proprietário e/ou veterinário relatou problemas de diarreia.

Foram utilizadas amostras de 315 animais, sendo 62,86% (198/315) do sexo feminino e 37,14% (117/315) do sexo masculino. Os potros incluídos neste estudo (n = 298) possuíam idade média de $9,34 \pm 0,30$ meses. Foram também avaliadas 17 éguas adultas que estavam em lactação durante a coleta dos dados. Os animais eram oriundos de 13 propriedades localizadas no estado de Minas Gerais, incluindo o Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG (HV-EV-UFMG). Os haras visitados para a coleta de amostras estavam localizados na região metropolitana de Belo Horizonte, incluindo os municípios de Caeté, Confins, Conselheiro Lafaiete, Inhaúma, Jequitibá, Lagoa Santa, Matozinhos e Nova Lima. Os animais avaliados no HV-UFMG, localizado no município de Belo Horizonte, foram aqueles potros nascidos no Hospital Veterinário (n = 7) e seis potros internados com sinais clínicos de distúrbios gastrintestinais e sem diagnóstico etiológico. Os potros internados no HV-UFMG eram oriundos de propriedades localizadas nos municípios de São Sebastião das Águas Claras, Nova Lima, Esmeraldas, Entre Rios de Minas e Pedro Leopoldo.

O material foi coletado durante os anos de 2007 a 2011. Em cada local visitado, eram obtidas informações sobre a propriedade, identificação, idade e sexo dos animais, histórico de diarreia e outras afecções, período de ocorrência e característica das fezes. O exame físico foi realizado e os dados anotados em ficha própria (anexo I e II).

Pelo resultado do estudo realizado no Experimento I a técnica de sorologia por IPMA foi escolhida por ser mais prática na execução da técnica para o número de amostras coletadas, além de possuir a sensibilidade adequada para equinos como relatada na literatura para diagnóstico do contato com o agente. A PCR foi escolhida para diagnóstico da eliminação do agente pelas fezes.

De acordo com o resultado da sorologia (IPMA) e da PCR, para *L. intracellularis*, os animais foram divididos em positivos e negativos. Os animais positivos foram agrupados em positivos no exame de PCR, positivos no exame de sorologia (IPMA) ou, simultaneamente no exame de PCR e IPMA.

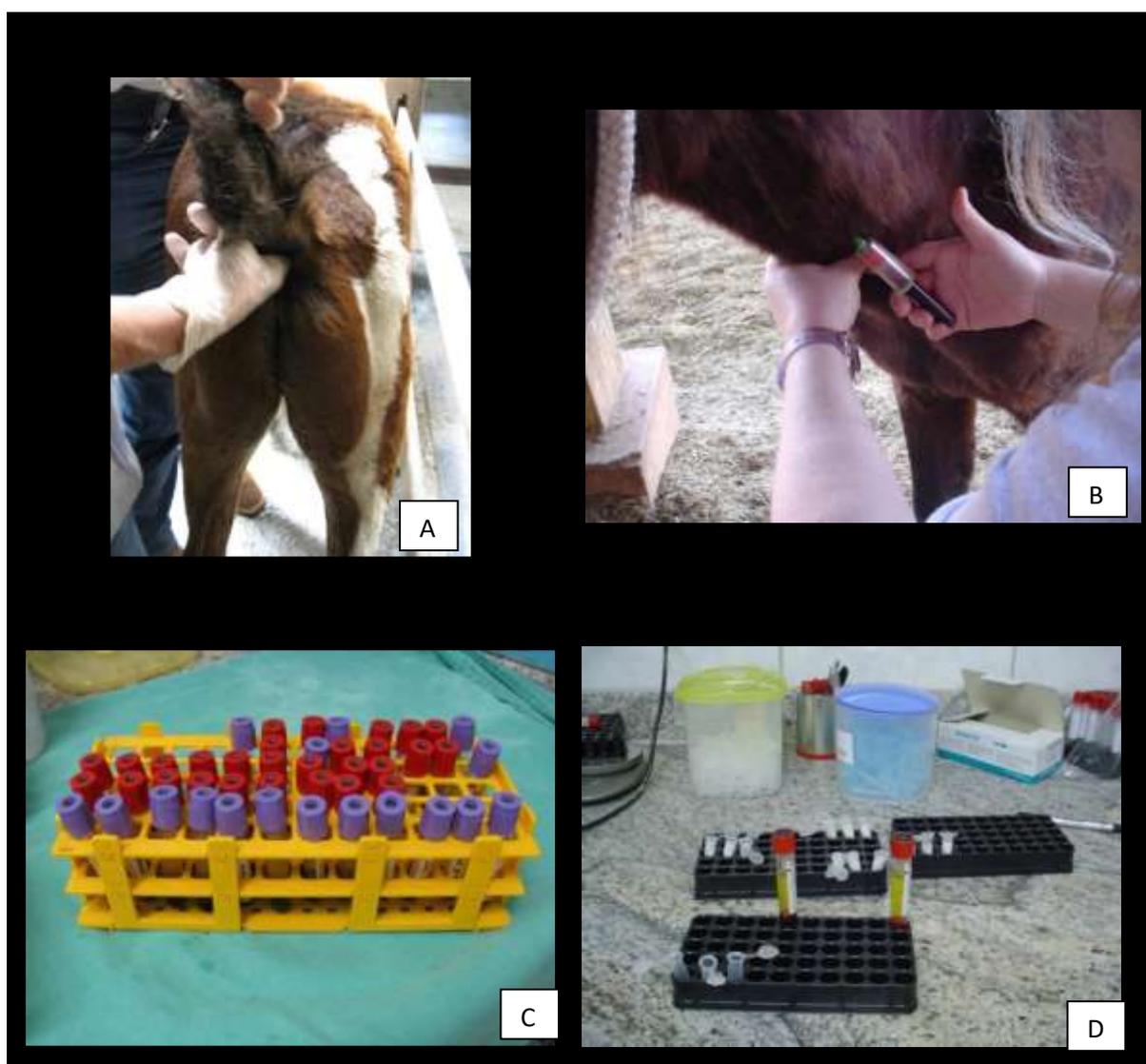


Figura 7 - Coleta e processamento do material. A: coleta de fezes de potro diretamente da ampola retal; B: coleta de sangue; C: amostras de sangue; D: separação do soro para congelamento.

3.2.2. Coleta do material

As amostras de fezes foram obtidas diretamente na ampola retal (Fig. 7A) e armazenadas em sacos plásticos. Para o exame de ovos por grama de fezes (OPG) as amostras foram processadas no dia da coleta e para a extração do DNA foram congeladas a -20°C , até o processamento. As amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular, em frascos contendo anticoagulante (EDTA) e sem anticoagulante. Os hemogramas foram realizados no dia da colheita do material. Para exames sorológicos, a amostra de sangue do tubo sem anticoagulante foi centrifugada à 5000 rpm, por cinco minutos, e o soro obtido foi acondicionado em seis flaconetes de 0,5 mL congelados à -20°C até o processamento.

3.2.3. Identificação dos animais positivos

3.2.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A extração de DNA foi realizada utilizando um Kit comercial de extração de DNA de fezes, QIAmpDNA Stool Mini Kit⁵, de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados iniciadores A e B, complementares à região específica do cromossomo da *L. intracellularis* com a seqüência de nucleotídeos 5' TATggcTgTcAAAcAcTccg 3'(A) e 5' TgAAggTATTggTATTcTcc 3' (B) (Jones et al., 1993). As ampliações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, em termociclador MiniCycler MJ Research⁶ (Fig. 8).

Para a reação de PCR, foram adicionados 25 μL em um microtubo de 1,5 mL: 1 μL de DNA bacteriano, 14,4 μL de água milique autoclavada, 2,5 μL de tampão de PCR, 50 mM de MgCl_2 , 2 mM de cada dNTP⁷, que são os quatro nucleotídeos do DNA – adenina, citosina, guanina e timina, 20 mM de cada iniciador, e 5 U/mL de Taq DNA polimerase⁸). Água milique autoclavada foi usada como controle negativo da PCR e, para o controle positivo, 200

⁵ #51504, QIAGEN, Valencia, CA, USA

⁶ Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA

⁷ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

⁸ Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil

mL de uma suspensão contendo 5×10^6 organismos de *L. intracellularis* por mL, adicionada a 0,18g de fezes de equinos negativos para *L.intracellularis*. A suspensão utilizada no controle positivo foi obtida de mucosa intestinal de suínos afetados pela EP.

O programa de amplificação utilizado seguiu o seguinte ciclo: 15 minutos à 95°C, para ativar a Taq polimerase; 40 ciclos à 94°C por 30 segundos, para desnaturação; 56°C por 2 minutos, para anelamento; e 72°C por 30 segundos, para alongamento. As amostras amplificadas foram separadas por eletroforese (Fig. 9) em gel de agarose à 2%, com 0,004 % de brometo de etídio e, posteriormente, visualizados em transiluminador com luz ultravioleta.

Os iniciadores utilizados foram derivados de um segmento de DNA cromossomal clonado e uma porção de 16 rDNA para isolados de suínos de *L. intracellularis*.



Figura 8 – Termociclador. Máquina onde há a amplificação de produtos de PCR.



Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR.

3.2.3.2.Sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMA)

Esta técnica foi descrita anteriormente, no item 3.1.2.2.

3.2.4. Hemograma

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção central na jugular, em frasco a vácuo⁹, contendo sal dissódico do ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), para a realização do hemograma, sendo o esfregaço sanguíneo realizado logo após a coleta. Todos os hemogramas foram processados eletronicamente¹⁰. O eritrograma incluiu a contagem total de eritrócitos, além da determinação do hematócrito, hemoglobina e dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), todos determinados em aparelho automático de contagem de células sanguíneas. O leucograma incluiu a contagem global de leucócitos, também realizada pelo mesmo aparelho de contagem de células sanguíneas. Para a contagem diferencial de leucócitos, preparou-se esfregaço sanguíneo, empregando-se coloração rápida de Romanowsky¹¹, para também verificar a morfologia celular e a busca de hemoparasitos. A leitura foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 400 e 1000x (imersão). A contagem de plaquetas foi realizada no mesmo aparelho automático de contagem de células sanguíneas.

3.2.5. Proteína total e Fibrinogênio

As amostras contendo sangue com EDTA foram homogeneizadas e alíquotas foram retiradas em três tubos capilares. Cada tubo foi centrifugado em centrífuga de microcapilar¹², a 12000rpm, por cinco minutos. Para o microhematócrito, o tubo capilar foi colocado na escala de leitura e verificado o valor. Para proteína total, um capilar foi quebrado e o plasma colocado no refratômetro¹³ clínico portátil manual para leitura. Já para o fibrinogênio, um capilar era colocado em termobloco à 56°C por três minutos e centrifugado novamente, sendo o plasma resultante colocado para leitura no refratômetro. O valor do fibrinogênio foi considerado pela diferença obtida entre as duas leituras.

⁹ Vacuetter, Greiner Bio-One Brasil – Americana-SP

¹⁰ Abacus Junior Vet – Hematology Analyser, Diatron

¹¹ Panótico – Laborclin – Produtos para laboratórioLTDA, Pinhais - PR

¹² Centerbio - Taiwan

¹³ Atago – Ribeirão Preto – SP.

3.2.6. Bioquímica Sérica

Foi coletada uma amostra de sangue total em frasco a vácuo sem anticoagulante⁹. Cada amostra ficou em repouso por no mínimo 30 min para retração do coágulo, centrifugada à 3000RPM por 10 minutos e o soro separado e as mensurações realizadas em aparelho semi-automático¹⁴ (Fig. 10). Foram avaliadas as concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST), lactato aminotransferase (ALT), uréia, creatinina, gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e creatina quinase (CK). Foram empregados processamentos bioquímicos de kits comerciais¹⁵ e as pipetagens e soluções eram realizadas de acordo com os protocolos de cada kit.

3.2.7. Eletroforese de Proteínas Séricas

Foi coletada uma amostra de sangue total em frasco a vácuo sem anticoagulante⁹. Cada amostra ficou em repouso por no mínimo 30 minutos para retração do coágulo, centrifugada à 3000RPM por 10 minutos, e o soro, alíquotado em seis flaconetes de 0,5mL, foi armazenado a -20°C até o processamento.

Foi realizado o preenchimento das cubas com 80mL de tampão tris, pH 9,5, e pipetado 0,4 µL de cada amostra em filme de agarose¹⁶, utilizando-se a voltagem de 90V, por 36 minutos (Fig. 8). O filme foi mergulhado em corante negro de amido, à 0,1% e ácido acético, à 5% por 5 minutos. À seguir, o filme foi imerso, por mais 5 minutos em solução descorante, em ácido acético à 5%. O filme foi seco por ar aquecido produzido por secador de cabelos e imerso na solução descorante, até o fundo ficar transparente, e, novamente, seco com secador de cabelos (anexo III).

¹⁴ Bioclin - Mindray BA 88A, Belo Horizonte - MG

¹⁵ Bioclin. Belo Horizonte - MG

¹⁶ CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios, Barueri – SP.

As bandas eletroforéticas foram escaneadas¹⁷ e posteriormente lidas e quantificadas pelo programa de leitura densitométrica¹⁸ para fornecimento das frações proteicas (albumina, α , β , e γ globulinas).



Figura 10 - Máquina de processamento de amostras para análise da bioquímica sérica.



Figura 11 - Realização de eletroforese de proteínas em filme de agarose.

3.2.8. Contagem de ovos por grama (OPG) de fezes

Para a realização da contagem do número de OPG, foram pesados dois gramas de fezes frescas e misturados à 28 mL de solução salina hipertônica. A mistura foi filtrada em gaze e permaneceu em repouso por 10 minutos, para flutuação dos ovos. Em seguida, a câmara de McMaster foi preenchida e levada ao microscópio óptico, para leitura em aumento de 100x. O número de ovos contados foi multiplicado pelo fator de correção 100, para obtenção do número de ovos por grama de fezes.

3.2.9. Análise estatística

Os dados coletados foram tabulados em fichas próprias e posteriormente tabulados em planilhas no programa Microsoft Excel (versão 2003).

Experimento I:

¹⁷ Canon – CanoScan Lide 100, Vietnam.

¹⁸ CELM, programa de *software* SDS-60 do sistema SE-250 – Barueri, SP.

Os dados do foram analisados pelo programa disponibilizado pelo Laboratório de Epidemiologia e Estatística (Lee, 2011). A concordância entre os dois testes sorológicos utilizados (IPX e IPMA) foi realizada pelo teste de Kappa e classificada de acordo com o proposto por Landis e Koch (1977). As análises contemplaram uma significância de 95% ($p < 0,05$).

Experimento II:

Os animais foram agrupados de acordo com o resultado do teste utilizado (PCR ou IPMA) Desta forma, foram formados quatro grupos (PCR positivo, IPMA positivo, PCR + IPMA positivo e PCR + IPMA negativo). Os dados proporcionais foram avaliados por dispersão de frequência (Qui-quadrado) e os dados numéricos (valores absolutos do hemograma, fibrinogênio, bioquímica sérica, eletroforese de proteínas e OPG) foram submetidos à transformação logarítmica. Os dados percentuais (valores relativos do leucograma) foram transformados pelo arco seno \sqrt{x} . Após transformação os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Student Newman Keuls (para três ou mais médias) ou pelo teste T de Student (para duas médias). A distribuição dos animais de acordo com o local de origem foi descritiva. Os dados não paramétricos (score e TPC) foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis (três ou mais comparações) e de Wilcoxon (duas comparações), analisados pelo programa Statistical Analyses System (SAS, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO I – ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE IMUNOPEROXIDASE EM LÂMINA DE VIDRO (IPX) E DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADAS DE CÉLULAS (IPMA) NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Lawsonia intracellularis* EM EQUINOS.

Os animais testados neste estudo, 206 potros e 17 éguas adultas, eram mantidos em propriedades e não foi possível prever a forma de infecção pela *Lawsonia intracellularis*. Desta forma, o tempo decorrido entre a infecção e o diagnóstico não pôde ser determinado. Em estudo realizado com infecção experimental, Al-Ghamdi (2003) relatou a ocorrência de soroconversão 14 dias após a inoculação, sem que potros apresentassem sinais clínicos da doença. Em suínos, Guedes et al. (2002b) relataram uma frequência abaixo de 75% de animais apresentando sinais clínicos após a infecção experimental. Em equinos, as informações sobre a duração dos anticorpos séricos são restritas. Da mesma forma, as reações sorológicas cruzadas, entre a *L. intracellularis* e outros agentes causadores de diarreia em equinos, não foram descritas. Estas reações poderiam induzir a resultados falso-positivos. Ressalta-se, ainda, o fato da *L. intracellularis* ser uma bactéria intracelular obrigatória, que permanece no citoplasma dos enterócitos, com diminuição da relação esperada entre os níveis séricos de IgG e proteção. Por outro lado, a resposta celular imuno-mediada e a concentração de IgA na mucosa intestinal estaria mais envolvida nos mecanismos de defesa, não sendo diretamente ligada à *L. intracellularis*, mas ao agente causador da diarreia. Mesmo assim, a detecção sérica de IgG contra *L. intracellularis* pode ser interpretada como um indicativo de exposição prévia à bactéria (Guedes et al., 2002).

Nas 223 amostras testadas, 206 eram de potros, com idade média de $9,65 \pm 0,33$ meses, e 17 eram de fêmeas adultas lactantes. Dentre os potros, observou-se uma positividade de 7,77% (16/206) pela técnica de IPX e 14,08% (28/206) pela técnica de IPMA. Já para as éguas adultas, 29,41% (5/17) foram positivas pela técnica de IPX e 35,29% (6/17) pela IPMA (Tab.3). Foram positivos simultaneamente nas técnicas de IPX e IPMA, três éguas adultas e cinco potros. Apesar de a EPE acometer mais frequentemente potros entre quatro a seis meses de idade (Pusterla et al., 2008a), a infecção já foi relatada em animais adultos (Guimarães-

Ladeira et al., 2009). Neste estudo foram coletadas apenas as mães dos animais que apresentaram atualmente ou tinham histórico de diarreia, não podendo realizar um levantamento por amostragem dos animais adultos do plantel.

Tabela 3 – Distribuição de frequência de resultados das provas sorológicas IPX e IPMA para *L. intracellularis* em potros e éguas de propriedades da região metropolitana de Belo Horizonte – MG (2007-2008).

	Éguas	Potros	Total
IPX Positivo	05 (29,41%)	16 (7,77%)	21 (9,42%)
IPX Negativo	12 (70,59%)	190(92,23%)	202 (90,58%)
IPMA Positivo	06 (35,29%)	28 (13,59%)	34 (15,25%)
IPMA Negativo	11 (64,71%)	178 (86,41%)	189 (84,75%)
IPX e IPMA Positivo	03 (17,65%)	05 (2,43%)	08 (3,59%)
Negativos	09 (52,94%)	166 (80,58%)	176 (78,92%)
Total	17 (100%)	206 (100%)	223 (100%)

A distribuição dos animais testados, de acordo com a propriedade e o resultado pelas técnicas de IPX e IPMA, está descrita na Tab. 4. Em todas as propriedades foram detectados animais sorologicamente positivos, inclusive aqueles coletados no HV-UFGM, seja pela técnica de IPX ou pela de IPMA. Desta forma, foram encontrados 21,1% (47/223) de animais positivos. O percentual de animais positivos variou, entre propriedades, de 5,26% (1/19) a 41,67% (10/24). Esse fato demonstra a presença difundida do agente pelas propriedades visitadas e a importância do seu conhecimento para o uso no diagnóstico diferencial das enfermidades gastrintestinais de potros.

A transmissão da *L. intracellularis* ocorre por meio da ingestão de alimentos ou água contaminada por fezes de animais domésticos ou silvestres (Lavoie et al., 2000; Lavoie and Drolet, 2007; Pusterla et al., 2008b). De maneira semelhante ao que ocorre em suínos, é possível que a infecção em potros seja ocasionada por outros equinos, não sendo possível excluir fontes potenciais de infecção oriunda de animais silvestres, tais como roedores, coelhos, esquilos e raposas (Shimizu et al., 2011). O grande volume de entrada e saída de animais, principalmente éguas, durante a estação de monta nas propriedades, associado a um controle inadequado, por quarentena e isolamento, pode ser um fator adicional à disseminação da *L. intracellularis* em equinos.

Tabela 4 - Distribuição de acordo como local de origem das amostras positivas para *L. intracellularis*, pelas técnicas de IPX e IPMA

Local de origem	Amostra	IPX	IPMA	Local de origem	Amostra	IPX	IPMA
1 (n=13)	1	Positivo	Negativo	7 (n=16)	77	Negativo	Positivo
	11	Negativo	Positivo		Mãe 79	Negativo	Positivo
2 (n=10)	17	Negativo	Positivo		79	Negativo	Positivo
3 (n=19)	28	Negativo	Positivo		Mãe 83	Positivo	Positivo
	41	Negativo	Positivo		Mãe 89	Negativo	Positivo
4 (n=28)	42	Positivo	Negativo		94	Positivo	Negativo
	47	Negativo	Positivo		95	Negativo	Positivo
	214	Positivo	Negativo		97	Positivo	Negativo
5 (n=9)	216	Positivo	Negativo		98	Negativo	Positivo
	217	Positivo	Negativo		99	Negativo	Positivo
	179	Negativo	Positivo		8 (n=24)	102	Positivo
182	Negativo	Positivo	104			Negativo	Positivo
184	Negativo	Positivo	106			Negativo	Positivo
187	Positivo	Negativo	107			Negativo	Positivo
188	Negativo	Positivo	110			Positivo	Negativo
189	Negativo	Positivo	9 (n=12)			Mãe 121	Positivo
6 (n=38)	191	Positivo		Positivo	130	Positivo	Negativo
	196	Negativo	Positivo	141	Positivo	Negativo	
	197	Negativo	Positivo	157	Positivo	Positivo	
	210	Negativo	Positivo	10 (n=54)	160	Negativo	Positivo
	Mãe 201	Positivo	Positivo		167	Negativo	Positivo
	Mãe 202	Positivo	Negativo		172	Positivo	Positivo
	Mãe 203	Positivo	Negativo		176	Positivo	Positivo
	Mãe 204	Negativo	Positivo				

O índice de animais sorologicamente positivos foi de 15,18% (34/223) pela técnica IPMA e 9,28% (21/223) no teste IPX. Dos animais positivos, ocorreu uma associação de 23,53% (8/34) dos testes IPX e IPMA, simultaneamente. A concordância geral, pelo teste Kappa foi significativa ($p=0,002$) e apresentou um valor de 0,324 (Tab. 5). De acordo com a classificação de Landis e Koch (1977), o valor de 0,324 é considerado de concordância discreta, em uma classificação de 1 a 6 (< 0 - ausência de concordância; 0 a 0,19 - pobre; 0,20 a 0,39 - discreta; 0,40 a 0,59 - moderada; 0,60 a 0,79 - forte e 0,91 a 1,0 - excelente). Possivelmente, a concordância poderia ser maior neste estudo, caso o ponto de corte, em ambas as técnicas, escolhido fosse uma diluição menor (1:15 ou 1:30), isto estaria em concordância ao estudo realizado por Al Ghandi (2003).

O ponto de corte, em ambas as técnicas de IPX e IPMA, utilizado neste estudo foi a diluição de 1:60, conforme descrito por Guimarães-Ladeira (2008), que usou essa diluição como ponto de corte na técnica de IPX por a diluição de 1:30 apresentar marcações inespecíficas mesmo no controle negativo. Na diluição de 1:30, foram observadas nove amostras positivas. Entretanto, apenas uma destas amostras foi positiva à diluição de 1:60, pela técnica de IPMA. Por isso, não se pode obter resultados sobre a concordância destas

amostras, já que a diluição de 1:30 na técnica de IPMA não foi realizada. Al Ghamdi (2003), ao realizar a comparação pelo teste de Kappa entre IPX, IPMA e IFAT, observou concordância de 100% entre as três técnicas utilizadas, porém, o ponto de corte utilizado foi a diluição de 1:30. Quando o ponto de corte da diluição aumentou, a concordância diminuiu. Da mesma forma, Guedes et al. (2002a) observaram, em suínos, uma especificidade de 100%, e a diluição de 1:15 foi a que apresentou maior sensibilidade (90,7%), quando comparada à diluição de 1:120 (75,9%), levando à conclusão que diluições mais baixas, como 1:15 revelam a presença de imagens distorcidas no fundo da placa, o que poderia interferir na interpretação dos resultados.

Tabela 5 – Distribuição de acordo com o resultado obtido das amostras utilizadas nas duas técnicas sorológicas (IPMA e IPX)

	IPMA		
	Positivo	Negativo	Total
IPX Positivo	08	13	21
IPX Negativo	26	176	202
Total	34	189	223

Valor Kappa = 0,324; p = 0,002

O IPX pode ser mantido à temperatura ambiente, e é um teste útil na rotina de diagnóstico. Necessita de uma menor quantidade de antígeno fixada na lâmina. O IPMA requer o crescimento de bactérias em placas, que demora uma semana para a colonização das células de McCoy, e ainda, um dia congelado a -20°C, antes da utilização para a realização da sorologia. Quando há necessidade de se realizar o teste em uma quantidade maior de amostras, a técnica de IPX não é vantajosa, pois apenas poucas amostras podem ser testadas por lâmina, havendo maior gasto de controles positivos, que devem estar presentes em todas as lâminas, enquanto, no IPMA, podem ser testadas 94 amostras por placa. Além disso, a IPMA necessita da utilização de microscópio de luz invertida, a IFAT necessita de um com fluorescência e a IPX de um microscópio óptico comum. Para leitura dos resultados, há necessidade de um treinamento específico. No presente estudo, todas as amostras foram lidas por um técnico com experiência comprovada. Para Page et al. (2011b), apesar da sensibilidade da IPMA ser alta, o método requer interpretação visual das amostras, sendo, dessa forma, necessário um técnico com experiência para realizá-lo.

Sumariamente, entre as vantagens e desvantagens de cada técnica, a IPMA seria melhor utilizada em surtos em grandes propriedades e para casos isolados e auxiliar à clínica, a IPX.

Apesar da técnica de IPX ser utilizada em bastantes publicações com boa sensibilidade/especificidade, a técnica de IPMA foi escolhida como o teste sorológico padrão ouro neste experimento por apresentar maior sensibilidade na titulação das amostras.

4.2. EXPERIMENTO II – AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE EQUINOS TESTADOS PARA *Lawsonia intracellularis* EM AMOSTRAS DE SOROLOGIA (IPMA) E PCR EM FEZES.

4.2.1. Epidemiologia

As propriedades visitadas para a realização deste estudo tinham histórico de problemas de diarreia em potros, sem que um diagnóstico etiológico tivesse sido realizado. Os animais oriundos do HV-UFMG incluídos nas amostras e tinham a mesma característica ou haviam nascido no local. Todas as amostras dos animais utilizados no experimento I foram utilizadas no experimento II.

Dos 315 animais testados para EP, 14 foram positivos pela técnica de PCR (4,44%), 51 foram positivos pela técnica de sorologia pela IPMA (16,19%) e apenas dois animais foram positivos pelas duas técnicas (0,63%) (Tab.4).

Para a realização dos testes, a coleta do material, em todos os animais, foi realizada apenas uma vez, o que pode ter sido insuficiente para detectar a eliminação da *L. intracellularis* pelas fezes, visto que em suínos há disseminação intermitente. Além disso, não foram feitas coletas em conjunto com *swabs* retais o que poderia aumentar a eficiência do diagnóstico pela PCR, como demonstrado por Pusterla et al. (2010a).



Figura 12 - Resultado da leitura do gel de agarose da reação em cadeia de polimerase dos animais 552 a 562. As amostras 558 e 559 marcaram com 319bp, assim como o controle positivo (CP). As amostras 552 a 557 e 560 a 562 não marcaram, igualmente ao controle negativo(CN), sendo negativas para *Lawsonia intracellularis* (PM – peso molecular)

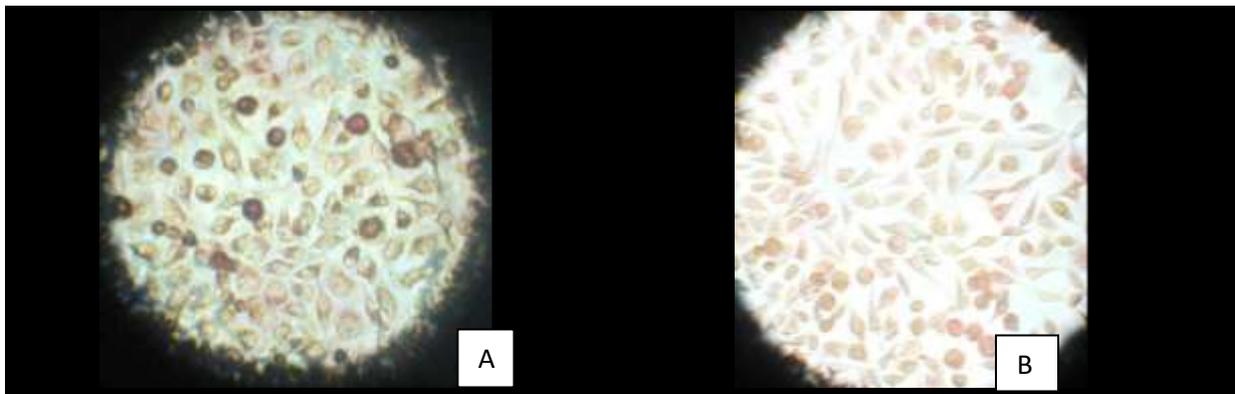


Figura 13 – Leitura da lâmina na técnica sorológica de imunoperoxidase em placa de monocamada de células para detecção de *Lawsonia intracellularis*. A - Observar a presença de bactérias coradas em tom marrom-avermelhado, gerando uma leitura com resultado positivo. B – células fracamente coradas gerando leitura de resultado negativo.

Tabela 6 – Dados clínicos dos animais positivos (pos) na IPMA e/ou PCR, relacionadas às informações: origem, idade, diarreia e aspecto das fezes no momento da coleta

Propriedade	Amostra	Sexo	Idade (meses)	Histórico Diarreia	Aspecto das Fezes	Resultado	
						IPMA	PCR
1 (n = 13)	11	F	5	Não	Normais	Pos	neg
2 (n = 10)	17	F	7	Não	Pastosas	Pos	neg
3 (n = 19)	28	M	7,5	Cio do potro	Amareladas	Pos	neg
	39	F	7,5	Cio do potro	Normais	Neg	pos
4 (n = 28)	41	M	9	Não	Pastosas	Pos	neg
	47*	M	8,5	Não	Pastosas	Pos	pos
	52	F	7,5	Não	Normais	Neg	pos
	179	F	24	Com 5 meses	Normais	Pos	Neg
6 (n = 38)	182	M	15	Não	Normais	Pos	Neg
	184	M	12	Não	Pastosas	Pos	Neg
	188	F	17	Não	Normais	Pos	Neg
	189	M	15	Não	Normais	Pos	Neg
	191	M	17	Com 2,5 meses	Normais	Pos	Neg
	196	M	16	Não	Pastosas	Pos	Neg
	197	F	14	Não	Normais	Pos	Neg
	Mãe 201	F	Adulto	Não	Normais	Pos	Neg
	Mãe 204	F	adulto	Não	Normais	Pos	Neg
	210	F	6	Não	Pastosas	Pos	Neg
7 (n = 16)	77	M	2	Cio do potro	Normais	Pos	neg
	Mãe 79	F	adulto	Não	Normais	Pos	neg
	79	M	3	Não	Normais	Pos	neg
	Mãe 83	F	adulto	Não	Normais	Pos	neg
	Mãe 89	F	adulto	Não	Normais	Pos	neg
8 (n = 24)	92	F	12	Não	Normais	Neg	pos
	93	F	13	Não	Normais	Neg	pos
	95	F	14	Não	Normais	Pos	neg
	98	F	14	Com 2,5 meses	Normais	Pos	Neg
	99	F	17	Com 3 meses	Normais	Pos	Neg
	102	F	5,5	Não	Normais	Pos	neg
	104	F	16	Não	Normais	Pos	Neg
	106	F	17	Não	Normais	Pos	Neg
107*	F	16	Não	Normais	Pos	Pos	
9 (n = 17)	Mãe 121	F	adulto	Não	Normais	Pos	Neg
	124	F	6	Não	Normais	Neg	Pos
10 (n = 54)	157	M	6	Não	Normais	Pos	Neg
	160	F	6	Não	Normais	Pos	Neg
	167	F	19	Não	Normais	Pos	Neg
	172	M	14	Não	Normais	Pos	Neg
	176	F	8	Não	Normais	Pos	Neg
11 (n = 38)	501	F	16	Não	Normais	Pos	Neg
	502	F	18	Não	Normais	Pos	Neg
	503	F	18	Não	Normais	Pos	Neg
	509	F	18	Não	Normais	Pos	Neg
	510	F	18	Não	Normais	Pos	Neg
	516	F	6	Não	Normais	Pos	Neg
	518	M	6	Não	Normais	Pos	Neg
	522	M	6	Não	Normais	Pos	Neg
	523	M	6	Não	Normais	Pos	Neg
	524	M	18	Não	Normais	Pos	Neg
	525	M	18	Não	Normais	Pos	Neg
	526	M	18	Não	Normais	Pos	Neg
	527	M	18	Não	Normais	Pos	Neg
532	M	18	Não	Normais	Pos	Neg	
12 (n = 19)	534	F	4	Atual	Pastosas	Pos	Neg
	540	F	18	Com 16 meses	Pastosas	Pos	Neg
	558	F	7	Não	Normais	Neg	Pos
	559	F	1	Atual	Pastosas	Neg	Pos
	561	F	7	Não	Normais	Pos	Neg
13 (n = 26)	567	F	5	Com 2 meses	Ressecada	Neg	Pos
	573	M	5	Não	Normais	Neg	Pos
	578	F	5	Não	Normais	Neg	Pos
	579	F	5	Não	Pastosas	Neg	Pos
	582	M	5	Não	Pastosas	Neg	Pos

Em estudos como este, realizados a campo, com o objetivo de levantamento epidemiológico, vários fatores podem interferir nos resultados de prevalência da afecção. Dentre estes, destacam-se: diferenças de manejo entre propriedades, desconhecimento da época e fonte de infecção, variabilidade de sobrevivência da *L.intracellularis* no ambiente, irregularidade da presença da bactéria nas fezes, por possuir liberação intermitente, ausência de sinais clínicos específicos, falta de controle do trânsito de animais positivos da propriedade, variação no tempo de permanência de títulos sorológicos, variação da fonte de infecção, uso de diferentes antimicrobianos, além da variação entre idade dos animais e época do desmame.

Para se julgar se um rebanho de suínos é livre da doença, recomenda-se a utilização da sorologia ou exames sucessivos das fezes por PCR ou a associação destes exames (Jacobson et al., 2004). Quando se analisa as Tab. 6 e 7, é possível observar a grande variação de animais PCR positivos para *L. intracellularis* entre propriedades. Apenas cinco propriedades, das 13 amostradas, apresentaram animais positivos. Na propriedade 13, onde foram amostrados 26 animais, 19,23% (5/26) foram positivos na PCR. Da totalidade dos animais positivos no exame da PCR (n = 14) esta propriedade participou com 37,71% (5/14). O percentual de animais positivos para PCR, nas propriedades 4, 8, 9 e 12 foi, respectivamente, 10,71% (3/28), 12,50% (3/24), 5,88% (1/17) e 10,53% (2/19). Já nas propriedades 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10 e 11 não foram detectados animais PCR positivos.

Tabela 7 - Distribuição (% - n) da *L. intracellularis* de acordo com a propriedade na região metropolitana de Belo Horizonte - MG.

Local de origem	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>				Total % (n)
	Positivos % (n)			Negativos % (n)	
	PCR	IPMA	PCR e IPMA		
1	0,00 (0/13)	7,69 (1/13)	0,00 (0/13)	92,31(12/13)	4,13 (13/315)
2	0,00 (0/10)	10,00 (1/10)	0,00 (0/10)	90,00 (9/10)	3,17 (10/315)
3	0,00 (0/19)	5,26 (1/19)	0,00 (0/19)	94,74 (18/19)	6,03 (19/315)
4	10,71 (3/28)	7,14 (2/28)	3,57 (1/28)	85,71 (24/28)	8,89 (28/315)
5	0,00 (0/13)	0,00 (0/13)	0,00 (0/13)	100,00(13/13)	4,13 (13/315)
6	0,00 (0/38)	28,95 (11/38)	0,00 (0/38)	71,05 (27/38)	12,06(38/315)
7	0,00 (0/16)	31,25 (5/16)	0,00 (0/16)	68,75 (11/16)	5,08 (16/315)
8	12,50 (3/24)	29,17 (7/24)	4,17 (1/24)	62,50 (15/24)	7,62 (24/315)
9	5,88 (1/17)	5,88 (1/17)	0,00 (0/17)	88,24 (15/17)	5,40 (17/315)
10	0,00 (0/54)	9,26 (5/54)	0,00 (0/54)	90,74 (49/54)	17,14(54/315)
11	0,00 (0/38)	36,84 (14/38)	0,00 (0/38)	63,16 (24/38)	12,06(38/315)
12	7,69 (2/26)	11,54 (3/26)	0,00 (0/26)	80,77 (21/26)	8,25 (26/315)
13	26,32 (5/19)	0,00 (0/19)	0,00 (0/19)	73,68 (14/19)	6,03 (19/315)
Total	4,44 (14/315)	16,19 (51/315)	0,63 (2/315)	80,00 (252/315)	100,00 (315/315)

Todos os animais PCR positivos eram potros, o que pode indicar que as fêmeas adultas, mesmo sorologicamente positivas, não eram a fonte primária de contaminação dos potros, por não estarem eliminando a bactéria no momento da colheita das fezes em quantidade detectável, porém poderiam ter eliminado em outro momento, mantendo o ciclo com hospedeiros selvagens. Entretanto, vale lembrar que os estudos mostrando a liberação de PCR pelas fezes foram realizados em animais jovens e, portanto, não se conhece o padrão de liberação da *L. intracellularis* em animais adultos.

O percentual de animais positivos por PCR na propriedade 13 (26,32%) condiz com a presença de uma infecção ativa, uma vez que a *L. intracellularis* pode sobreviver nas fezes, ou no ambiente, por uma a duas semanas, como demonstrado por Collins et al. (2000). Apesar disto, nenhum animal foi positivo para o teste sorológico da IPMA, já que os anticorpos não são detectáveis em suínos antes de duas semanas da infecção (Jacobson et al., 2004). De forma oposta, onde não foram detectados animais PCR positivos, as propriedades 1, 2, 3, 6, 7, 10 e 11 apresentaram animais com reação sorológica no teste da IPMA (título 1:60), em percentuais de 7,69% (1/13), 10,00% (1/10), 5,26% (1/19), 7,14% (2/28), 21,95% (13/38), 36,84% (14/38), respectivamente. Este achado indica exposição à bactéria e não necessariamente doença seja clínica ou subclínica. Não foi possível determinar a época de contato com a *L. intracellularis* nestes animais, mas, certamente, foi anterior a 14 – 21 dias do exame, tempo necessário para detecção dos anticorpos séricos em suínos (Jacobson et al., 2004). Outra possibilidade a ser levantada, para a ausência de sinais clínicos indicativos da infecção por *L. intracellularis* seria a possibilidade de contaminação dos animais por cepas ambientais avirulentas, que também, provavelmente, induziram menor produção de anticorpos séricos (Nogradi et al., 2011).

Em estudo como este, realizados a campo, com o objetivo de levantamento epidemiológico, vários fatores podem interferir nos resultados de prevalência da afecção. Dentre estes destacam-se: diferenças de manejo entre propriedades, desconhecimento da época e fonte de infecção, variabilidade de sobrevivência da *L. intracellularis* no ambiente, irregularidade da presença da bactéria nas fezes por possuir liberação intermitente, ausência de sinais clínicos específicos, falta de controle do trânsito de animais positivos da propriedade, variação no tempo de permanência de títulos sorológicos, variação da fonte de infecção, uso de diferentes antimicrobianos, além da variação entre idade dos animais e época do desmame.

Nas 12 propriedades visitadas, foi observada a inadequação do manejo. A higienização dos currais se restringia à varreção ou à lavagem com água, sem limpeza de cochos de alimentação e água. Outras espécies de animais (domésticos e silvestres) foram observadas transitando nos piquetes e nos currais das propriedades visitadas, como cão, gato, bovino, galinha, galinha-da-angola, pato, ganso, siriema e passarinhos. As baias onde os animais doentes eram mantidos não sofriam uma desinfecção adequada, após o retorno do animal ao seu piquete.

O manejo alimentar era peculiar em cada propriedade. A ração era fornecida em cochos, nos próprios piquetes, ou as éguas eram trazidas, diariamente, junto com seus potros para o curral, para serem utilizadas na reprodução, sem a preocupação de separação por lotes de animais doentes e sadios. Os animais mantidos em piquetes tinham contato casual com seres humanos e os cochos não eram higienizados de forma adequada, além de serem de fácil acesso a qualquer outra espécie presente no haras.

A região metropolitana de Belo Horizonte possui um relevo acidentado e os currais geralmente são construídos na parte mais plana do terreno, muitas vezes em um nível superior ao dos piquetes, sem a preocupação com a drenagem dos dejetos de forma adequada. Na maioria das vezes, os currais são apenas varridos ou lavados com água sobre pressão. Assim, durante a limpeza ou ao chover, todos os resíduos presentes nos currais eram drenados aos piquetes, que estavam no entorno. De acordo com Collins et al. (2002) a limpeza das instalações, para suínos, deveria ser realizada com a lavagem com água em jatos, sob pressão, seguida da desinfecção com amônio quaternário ou solução de povidine e, após 20 minutos, nova lavagem com água sob pressão. O vazio sanitário, em rebanhos onde a *L. intracellularis* fosse detectada, deveria ser de duas semanas.

Na maioria dos locais, após o desmame, os potros eram separados em lotes de machos ou fêmeas, com idade variando entre quatro a 18 meses. Éguas lactantes poderiam estar juntas de éguas no pré-parto, mas sempre separadas dos animais de serviço ou éguas solteiras.

Apesar do grande fluxo de animais nas propriedades visitadas, em nenhum dos locais foi observada área de quarentena. Algumas propriedades exigiam atestado de saúde dos animais que chegavam à propriedade. Ao desembarcarem, os animais eram imediatamente alocados em piquetes, junto com os animais residentes na fazenda, sem que um exame clínico ou laboratorial fosse realizado.

Tabela 8 - Distribuição dos animais testados (total de positivos em ambas técnicas) para *L. intracellularis* de acordo com a localização das propriedades.

Local	Cidade de origem	Distância de Belo Horizonte (km)	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>	
			Positivos	Negativos
1	Confins	40	7,69 (1/13)	92,31(12/13)
2	Lagoa Santa	35	10,00 (1/10)	90,00 (9/10)
3	Lagoa Santa	35	5,26 (1/19)	94,74 (18/19)
4	Lagoa Santa	35	14,29 (4/28)	85,71 (24/28)
5	Belo Horizonte	0	0,00 (0/13)	100,00(13/13)
6	Nova Lima	31	28,95 (11/38)	71,05 (27/38)
7	Nova Lima	31	31,25 (5/16)	68,75 (11/16)
8	Inhaúma	96	37,75 (9/24)	62,50 (15/24)
9	Caeté	44	23,53 (4/17)	76,47 (13/17)
10	Jequitibá	105	9,26 (5/54)	90,74 (49/54)
11	Conselheiro Lafaiete	102	36,84 (12/38)	63,16 (24/38)
12	Matozinhos	49	19,33 (5/26)	80,77 (21/26)
13	Inhaúma	96	26,32 (5/19)	73,68 (14/19)

A maior prevalência de animais positivos foi encontrada em uma propriedade em Inhaúma com 37,75% (9/24) e a menor foi o HV-UFMG, sem nenhuma confirmação por PCR ou sorologia (Tab. 8)

Apesar de a maior prevalência ter ocorrido em uma propriedade em Inhaúma, o maior número de potros positivos foi encontrada em Conselheiro Lafaiete com 12 animais, seguido por uma propriedade em Nova Lima, com 11 animais. Em ambas as propriedades os animais foram diagnosticados pela técnica de IPMA. As três propriedades com menor número de positivos foram em Confins e Lagoa Santa, cada uma com um animal confirmado pela IPMA.

Em equinos, não há estudo em relação à sobrevivência da *L. intracellularis* em fezes ou no ambiente, na forma infectante. Em suínos, Collins et al. (2000) relataram a sobrevivência da *L. intracellularis*, nas fezes ou no ambiente, a uma temperatura ambiente entre 5 e 15°C, por uma a duas semanas.

O inverno no estado de Minas Gerais se caracteriza pela redução da temperatura, da umidade relativa do ar e do índice pluviométrico. As amostras foram coletadas durante o período de seca e de chuva. Na seca, foram observados 18,37% (45/245) animais positivos contra 25,71% (18/70) no período de chuva (Fig.14). Apesar da diferença percentual, não houve diferença ($p>0,05$) entre os períodos das coletas. Porém, ao se observar a disseminação

pelas fezes, dos 14 animais positivos na PCR, 71,43% (10/14) eliminaram bactéria durante o período da seca. À semelhança do encontrado neste estudo, Pusterla et al. (2008b) demonstraram uma grande variação entre fazendas endêmicas para a EPE, com uma variação entre 29,7% (outubro) e 33,8% (dezembro) de animais positivos pela IPMA. Os autores descreveram, ainda, um percentual de 45,5% em outra propriedade.

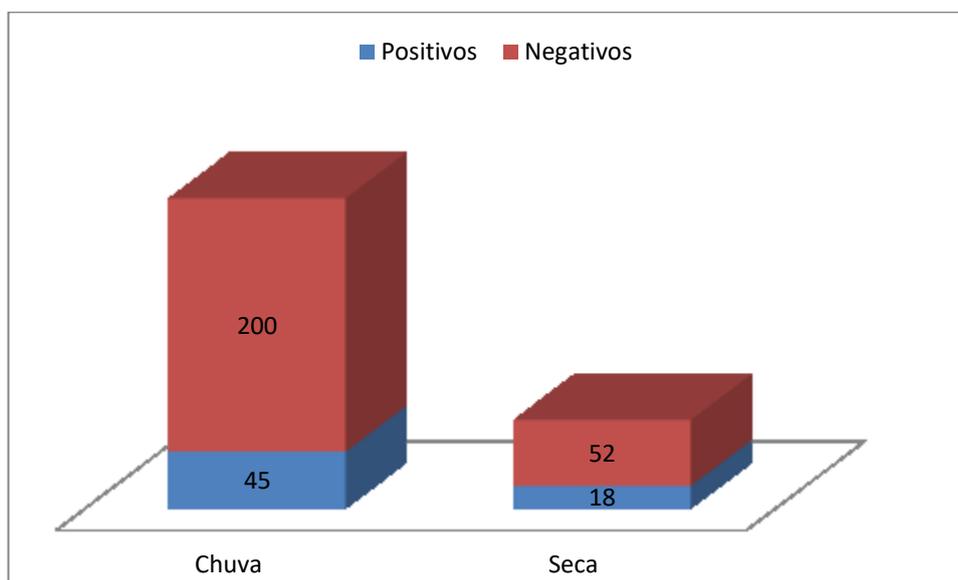


Figura 14 – Diagrama demonstrando a proporção de animais positivos x negativos durante os períodos de seca e chuva.

Mais estudos são necessários para se determinar a época de maior excreção e infectividade da *L. intracellulares*, em rebanhos comerciais de equinos. Além disso, torna-se necessária a realização de treinamento e qualificação de pessoal visando a diminuição do potencial de disseminação da *L. intracellularis*. A desinfecção adequada das instalações e o controle do fluxo de animais, com a adoção de quarentena, deveriam ser preconizadas como ponto-chave no controle da EPE.

4.2.2. Avaliação clínica e laboratorial de potros testados para *L. intracellularis*

Neste estudo, foi focado apenas o diagnóstico *ante-mortem*. O diagnóstico *post-mortem* constitui-se da avaliação de lesões macro e microscópicas e detecção de antígenos bacterianos através da imunistoquímica de fragmentos intestinais. A colheita de fragmentos

intestinais se torna inviável, quando se trata de um levantamento epidemiológico, por necessitar de uma laparotomia para acesso às estruturais distais do intestino delgado. Assim, a realização da imunoistoquímica de fragmentos de biópsia não seria a melhor forma de diagnóstico, em estudos epidemiológicos, como observado por Pusterla et al.(2008b).

Dentre os animais avaliados, 62,86% (198/315) eram fêmeas e 37,14% (117/315) eram machos (Tab. 9). Vale ressaltar que o número superior de fêmeas está relacionado com fatores comerciais. Geralmente, os machos são vendidos, sendo retidos apenas os melhores e as fêmeas permanecem no plantel. Além disso, foram coletadas amostras de 17 fêmeas lactantes e nenhum macho adulto foi amostrado. Dos 250 animais negativos para *L. intracellularis*, 62,40% (156/250) eram fêmeas e 37,60% (94/250) machos ($p < 0,05$). Nos positivos por PCR, dez (83,33%) fêmeas e dois (16,67%) machos ($p < 0,05$). Na IPMA, 60,78% (31/51) eram fêmeas 39,22% (20/51) machos. Nos confirmados pelas duas técnicas, um era macho e outro fêmea (50%) (fig.15).

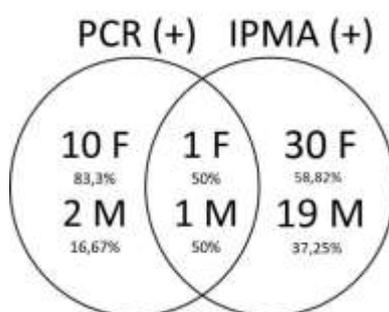


Figura 15 – Diagrama representando a distribuição por gênero entre os animais que testaram positivo somente para a reação em cadeia da polimerase (n=12), somente para a técnica de imunoperoxidase em monocamada de células (n=51), e em ambos testes (n=2).

Em relação à idade, vale ressaltar que as fêmeas adultas não entraram na análise. A idade média dos potros positivos na PCR foi $6,58 \pm 1,42$ meses e nos IPMA positivos de $12,54 \pm 0,75$ meses ($p < 0,05$). Já nos positivos por ambas as técnicas, a idade média foi de $12,25 \pm 3,49$ meses. Estes resultados são diferentes de Pusterla et al. (2008a), ao relatarem, na infecção esporádica da EPE, ser a idade mais afetada entre quatro a sete meses de idade.

Quando se avalia individualmente os animais (Tab. 6) observa-se que um potro de 30 dias, com histórico atual de diarreia e fezes pastosas, apresentou resultado positivo na PCR, caracterizando a eliminação da *L. intracellularis*. Possivelmente, outros fatores não avaliados estariam envolvidos, tais como, a virulência da cepa, a condição imune do animal no momento da contaminação e a quantidade de bactérias a que foi exposto. É interessante

observar que, mesmo sendo lactente, não houve uma proteção adequada. De acordo com Kelleher e Lonnerdal (2001), o leite teria componentes moleculares que poderiam conferir uma maior proteção intestinal. Dentre estes componentes, destacam-se a secreção de IgA, oligossacarídeos, nucleotídeos, lactoferrina, lisoenzimas e citocinas. Além disso, na propriedade, foram detectados animais soropositivos, pela técnica de IPMA, indicando a presença da bactéria na propriedade e/ou possível ineficiência na absorção de IgG do colostro ou o alto grau de desafio, com possibilidade de infecções concomitantes, que o levou a adoecer (baixa concentração plasmática de anticorpos colostrais). Dentre os animais mais jovens, três potros foram positivos na IPMA, com idade de dois, três e quatro meses, demonstrando contato e soroconversão precoces, embora apenas o animal de dois meses tenha histórico de diarreia, por ocasião do cio do potro (2ª semana de vida do potro, quando a égua apresenta o 1º cio pós-parto). Pusterla et al. (2009d) demonstraram a presença de anticorpos colostrais circulantes por quase trinta dias em uma fazenda endêmica para *L. intracellularis*, além de 54% dos potros soroconverterem antes do desmame, nos primeiros três meses de idade, demonstrando que a exposição à bactéria ocorre antes do desmame.

Tabela 9 - Características clínicas dos animais testados para *L. intracellularis*.

Variável	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>			
	Positivos % (n)			Negativos
	PCR	IPMA	PCR e IPMA	
Sexo (% - n)				
Feminino	78,57 (11/14) ^A	60,78 (31/51) ^A	50,00 (1/2)	62,40 (158/252) ^A
Masculino	21,43 (3/14) ^B	39,22 (20/51) ^B	50,00 (1/2)	37,30 (94/252) ^B
Idade (meses)*	6,58 ± 1,42 ^b	12,54 ± 0,75 ^a	12,25 ± 3,49 ^a	8,48 ± 0,32 ^{ab}
Escore corporal(1-5)	3,08 ± 0,17	2,91 ± 0,09	3,00 ± 0,41	2,76 ± 0,04
TPC (segundos)	1,58 ± 0,15	1,44 ± 0,08	1,25 ± 0,37	1,67 ± 0,03
OPG	825,00 ± 701,80	342,68 ± 360,0	0,0 ± 1569,27	695,40 ± 154,25

*animais adultos não tabulados; Escore corporal: escala de 1 a 5 (1 muito magro e 5 obeso); TPC – tempo de reperfusão capilar; OPG – contagem de ovos por grama de fezes; IPMA – sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células. Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$ – teste SNK); para sexo as médias devem ser observadas na coluna ($p < 0,05$ – teste χ^2)

Dezessete éguas que estavam amamentando foram coletadas, e seis (35,29%) apresentaram titulação para *L. intracellularis* na IPMA, tal achado se mostra interessante por demonstrar a presença de um contato anterior com o agente independente de haver a infecção atual na fazenda, fazendo perceber a importância da infecção subclínica ou da transmissão inespecífica que pode ocorrer sem percepção e levando a perdas subsequentes como diminuição do crescimento dos potros, falecimento, decorrentes de um diagnóstico impreciso.

Dos produtos dessas seis, apenas um potro ao pé apresentou sorologia positiva. Pusterla et al. (2009d) encontraram mais de 50% de éguas amamentando com soropositividade, em um levantamento de fazenda com surtos esporádicos. Van Ree et al. (2009) demonstraram que 100% das mães, para os potros que testaram positivo ou inconclusivo, eram sorologicamente positivas.

Outro achado interessante um potro de dezoito meses, com histórico de diarreia dois meses antes da colheita, também foi positivo na sorologia. Pusterla et al., (2010b) ao inocularem cultura da bactéria em potros, observaram a presença de titulação persistindo por 90 dias, com surgimento de anticorpos entre 14 a 21 dias após a infecção. Alguns relatos de caso de EPE documentaram a ausência de anticorpos específicos para *L. intracellularis* no início da doença (Dauvillier et al., 2006; Sampieri et al., 2006) e as respostas imunológicas não são características e parecem estar associadas a infecções moderadas (Smith e Lawson, 2001). Entretanto, a maioria dos trabalhos demonstra o desenvolvimento de casos clínicos em potros até 12 meses (Duhamel e Wheeldon, 1982; Brees et al., 1999; Al-Ghamdi, 2003; Bihr, 2003; Wuersch et al., 2006; Pusterla et al., 2008a).

Em relação ao escore corporal e ao TPC, não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos. Houve animais com infecção por vermes (contagem de OPG maior que 200), nos grupos positivos na PCR, na IPMA e negativos. Trinta e um por cento (16/51) dos animais positivos na IPMA e 42,86% (6/14) dos PCR positivos apresentaram OPG maior que 200, mostrando a presença concomitante de infecção por vermes. Foram encontrados ovos de *Strongyloides westeri*, *Strongylus* sp.(Fig. 16A) e *Parascaris equorum* (Fig. 16B), com contagem variando entre 0 a 18000 OPG. Nas propriedades visitadas, o controle parasitário era realizado de acordo com o calendário sanitário estipulado, sem que fossem realizados exames com contagem de ovos ou de resistência parasitária a anti-helmínticos.

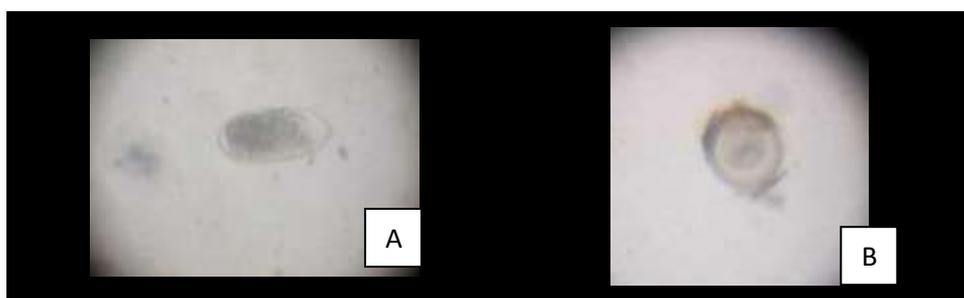


Figura 16 – Imagens de ovos de parasitas intestinais encontrados nas fezes de potros: A – ovo de *Strongylus* sp.; B – ovo de *Parascaris equorum*

4.2.3. Sinais Clínicos

No momento da coleta das amostras, 135 (42,86%) animais demonstraram algum sinal clínico como TPC alterado, alteração da coloração das mucosas, alterações na consistência fecal, histórico de diarreia, prostração, presença de secreção nasal ou linfonodos aumentados (Fig.6).

Entre os animais examinados, 35,24% (111/315) tinham histórico de diarreia, 81 (25,71%) apresentaram alteração na consistência fecal (pastosas ou ressecadas), cinco (1,59%) animais estavam prostrados, 22 (6,98%) apresentaram TPC aumentado, 66 (20,95%) tinham alteração na coloração de mucosas (ictérica, pálida ou congesta), 67 (21,27%) apresentavam secreção nasal e 26 (8,25%) apresentaram linfonodos aumentados (Tab. 10 e 11).

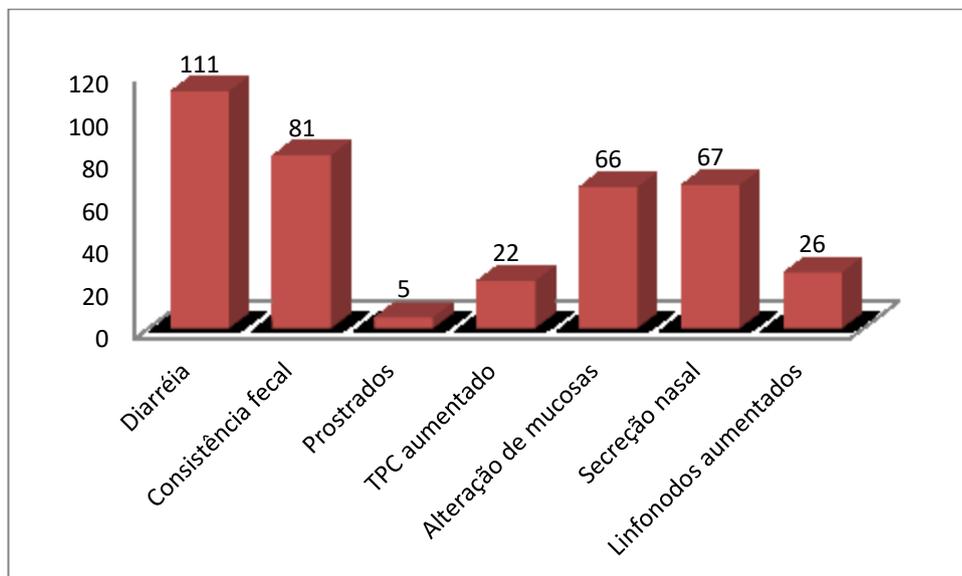


Figura 17 – Gráfico demonstrando os sinais clínicos que foram apresentados pelos equídeos coletados neste estudo.

Apesar destes achados apenas dois animais estavam com diarreia no dia da coleta, sendo um PCR positivo e outro IPMA positivo. A ausência de sinais clínicos específicos, como edema ventral ou prostração, para *L intracellularis*, no exame físico dos animais testados pode indicar a presença de uma cepa com menor virulência. Este achado também foi relatado por Pusterla et al. (2008b) em um levantamento epidemiológico, onde todos os

animais se encontravam soropositivos, mas saudáveis. Pusterla et al. (2010b) afirmaram que através de PCR quantitativo foi possível perceber que o potro com sinais clínicos mais pronunciados eliminava de sete a 16 vezes mais organismos pelas fezes que outros animais.

Tabela 10 - Distribuição (% - n) dos achados clínicos no momento do exame em animais testados para *L. intracellularis*.

Achados clínicos	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>			
	Positivos % (n)			Negativos
	PCR	IPMA	PCR e IPMA	
Histórico de diarreia	21,43 (3/14)	23,53 (12/51)	50,00 (1/2)	37,60 (94/250)
Consistência fecal	28,57 (4/14)	15,69 (8/51)	50,00 (1/2)	27,20 (68/250)
Animal prostrado	0,00 (0/14)	0,00 (0/51)	0,00 (0/2)	2,00 (5/250)
TPC (> 2 seg)	0,00 (0/14)	1,96 (1/51)	0,00 (0/2)	8,40 (21/315)
Alteração das mucosas*	21,43 (3/14)	11,76 (6/51)	0,00 (0/2)	22,80 (57/250)
Secreção nasal	14,29 (2/14)	13,73 (7/51)	0,00 (0/2)	23,20 (58/250)
Aumento de linfonodos	0,00 (0/14)	0,00 (0/51)	0,00 (0/2)	10,40 (26/250)

TPC – tempo de reperfusão capilar; IPMA – sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células.

*alterações nas mucosas como congestão, icterícia ou palidez.

Nos animais com histórico de diarreia e IPMA positivos (23,53% - 12/51), apenas em oito casos foram obtidos os dados da época de ocorrência. Dois animais apresentaram diarreia no período do cio do potro (2ª semana de vida), dois aos 2,5 meses de idade, um aos três meses, um aos cinco, um aos dezesseis e outro no momento da coleta. Já para os PCR positivos (21,43% - 3/14), um animal apresentou histórico de diarreia no cio do potro (intervalo de 7 meses até a coleta), um aos dois meses de idade (há 3 meses da coleta) e um no momento do exame (1º mês de vida).

Tabela 11 - Distribuição (% - n) dos achados clínicos, no momento do exame, em animais testados como positivos e negativos para *L. intracellularis*.

Achados clínicos	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>		
	Positivos	Negativos	Total
Histórico de diarreia	26,15 (17/65)	37,60 (94/250)	35,24 (111/315)
Consistência fecal	20,00 (13/65)	27,20 (68/250)	25,71 (81/315)
Animal prostrado	0,00 (0/65)	2,00 (5/250)	1,59 (5/315)
TPC (> 2 seg)	1,54 (1/65)	8,40 (21/315)	6,98 (22/315)
Alteração das mucosas*	13,85 (9/65)	22,80 (57/250)	20,95 (66/315)
Secreção nasal	13,85 (9/65)	23,20 (58/250)	21,27 (67/315)
Aumento de linfonodos	0,00 (0/65) ^a	10,40 (26/250) ^b	8,25 (26/315)

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$ Teste: χ^2)

TPC – tempo de reperfusão capilar

*alterações nas mucosas como congestão, icterícia, presença de petéquias ou palidez.

Quando os dados foram agrupados em positivos e negativos (Tab. 11), nenhuma diferença para as características clínicas no momento do exame foram observadas, exceto o aumento de volume de linfonodos ($p < 0,05$). Entretanto, foram observadas alterações na consistência fecal, caracterizadas principalmente por fezes pastosas, em 28,57, 15,69 e 50,00%, respectivamente, para os animais positivos na PCR, IPMA ou em ambos. A perda de peso, a presença de diarreia ou de fezes amolecidas e sinais de cólica são achados frequentes em potros acometidos clinicamente pela EPE (Wilson e Gebhart, 2008). Outros achados, como efusão articular, fraqueza, hipertermia e cólica foram sinais descritos por Divers (2008). Nenhum dos animais coletados apresentou sinais além de alterações no sistema respiratório ou alterações de consistência fecais.

Tabela 12 - Distribuição (% - n) dos achados clínicos no momento do exame em animais testados para *L. intracellularis*.

Achados clínicos	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>			
	Positivos % (n)			Negativos
	PCR	IPMA	PCR e IPMA	
Verminose	42,86 (6/14)	31,25 (15/48)	0,00 (0/2)	34,57 (84/243)
Hemoparasitose*	21,43 (3/14) ^a	2,17 (1/46) ^b	0,00 (0/2) ^b	6,30 (15/238) ^{ab}

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$ Teste: χ^2)

IPMA – sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células

*Animais positivos, no esfregaço sanguíneo, para *Babesia caballi* e/ou *Theileria equi*

Apenas um (1,96%) animal IPMA positivo apresentou TPC aumentado. As alterações na coloração da mucosa oral observadas neste estudo, como congestão, presença de petéquias, mucosas amareladas ou pálidas também foram observadas por outros autores, embora relatassem casos clínicos na forma aguda ou subaguda (Kimberly et al., 2007; Allen et al., 2009; Merlo et al., 2009). Estes sinais estão relacionados com a perda aguda de sódio e fortemente associados com hipovolemia, levando à taquicardia, diminuição da pressão arterial, retardo no preenchimento da jugular e aumento do TPC (Kaneko et al., 2008).

Quando da avaliação do esfregaço sanguíneo, 21,43% (3/14) dos animais PCR positivos apresentaram *Babesia caballi* no esfregaço sanguíneo (Tab. 11), sendo superior aos IPMA ou IPMA + PCR positivos ($p < 0,05$). A babesia é um protozoário que aparenta difícil visualização em esfregaço de sangue periférico e sua presença em 25% dos animais que estavam eliminando a bactéria pode significar uma diminuição da imunidade do hospedeiro.

4.2.4. Alterações Laboratoriais

Em relação à série vermelha, os dados referentes ao hematócrito, hemoglobina e número de hemácias estavam dentro dos parâmetros de referência. Entre os animais positivos, o grupo que obteve maior valor do volume corpuscular médio (VGM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM) foram os animais IPMA positivos, e o menor os animais PCR positivos. Já nos índices de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e amplitude de variação de volume das hemácias (RDW) ocorreu o inverso, o menor valor foi obtido nos animais IPMA positivos e o maior nos PCR positivos.

Assim como relatado por Wilson e Gebhart (2008), os achados laboratoriais são variados. Em todos os grupos, a maioria dos valores hematológicos estão dentro dos valores de normalidade, com exceção do VGM, que está abaixo do valor mínimo de referência em todos os grupos estudados. A microcitose, ou diminuição do VGM é comum em animais jovens da maioria das espécies e pode estar relacionada com a deficiência de ferro. O HCM que está diminuído nos animais positivos na PCR, o CHCM diminuído no grupo IPMA positivo, o RDW diminuído em todos os grupos exceto o PCR positivo. O RDW é a determinação na variação no volume de hemácias. Quando este índice está alterado, normalmente há visualização de anisocitose e policromasia no esfregaço sanguíneo (Paes et al., 2009).

Para os exames hematológicos, não houve diferença ($p > 0,05$) na maioria dos dados (Tab.13). Quando estes foram agrupados em animais positivos e negativos (Tab. 14), observou-se diferença ($p < 0,05$) entre os grupos na contagem absoluta de eosinófilos e relativa e absoluta de monócitos, com os animais negativos apresentando menor contagem nessas populações de células sanguíneas.

Na série branca, houve leucocitose em todos os grupos examinados. Os dados referentes aos neutrófilos segmentados estavam dentro dos valores de referência, com exceção do grupo positivo em ambas as técnicas, no qual houve neutrofilia. Em relação aos linfócitos, todos os grupos apresentaram linfocitose, justificada pelo acompanhamento da leucocitose observada. Porém, é interessante comentar a presença de leucocitose com linfocitose em todos os grupos. Rubino et al. (2006) observaram que a presença de infecção causada por agentes transmissíveis pelo carrapato, em equinos infectados sem sinais clínicos aparentes, tinham

significativamente menor número de neutrófilos e maior de linfócitos que animais livres da doença ou infectados apresentando a babesiose demonstrando que há inversão da relação neutrófilo-lyfócito, da fase aguda para a subaguda, durante a evolução da doença,.

A média da contagem absoluta de eosinófilos foi maior ($p < 0,05$) no grupo PCR positivo quando comparado aos demais grupos, demonstrando a presença de uma resposta imune do trato gastrintestinal como descrito por Weiss e Wardrop (2010).

O aumento de neutrófilos, que são mediadores químicos da inflamação aguda é seguido pela predominância de linfócitos, que são típicos de uma resposta imune mais específica clônica (Rubino et al., 2006), o que pode ser observado em todos os grupos do presente estudo. Desta forma, possivelmente, outros agentes podem estar associados à *L.intracellularis*, ou seja, a alteração causada nesta população de células nos grupos positivos pode não ser proveniente da *L. intracellularis* e sim de outros agentes.

A monocitose esteve presente nos grupos PCR positivos e positivos em ambas as técnicas. Este achado está relacionado à presença de uma infecção causada por diversos organismos como bactérias, fungos, riquetsias e protozoários ou lesões crônicas e supurativas (Weiss e Wardrop, 2010). Possivelmente, os animais que desenvolvem a EPE são animais que passaram por algum tipo de estresse, como o desmame, transporte, super-lotação, diminuição de anticorpos específicos, alterações na dieta e doenças concomitantes como o parasitismo e pneumonia (Lavoie e Drolet, 2007).

Tabela 13 - Valores do hemograma (média \pm erro padrão), em animais testados para *L. intracellularis*.

Variáveis	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>			
	Positivos			Negativos
	PCR	IPMA	PCR e IPMA	
Série Vermelha				
Hematócrito 32 – 53 %*	32,46 \pm 1,34	32,19 \pm 0,72	37,00 \pm 2,28	32,65 \pm 0,31
Hemoglobina 11 – 19 g/dL*	12,95 \pm 0,57	12,55 \pm 0,31	15,25 \pm 1,40	12,58 \pm 0,13
Hemácias 6,8 – 12,9 x 10 ³ / μ L*	11,18 \pm 0,58	9,68 \pm 0,31	11,50 \pm 1,41	10,37 \pm 0,13
VGM 37 – 59 fL*	29,27 \pm 1,48 ^b	34,21 \pm 0,79 ^a	32,30 \pm 3,62 ^{ab}	32,15 \pm 0,34 ^{ab}
HCM 12 – 20 g/dL*	11,64 \pm 0,51 ^b	13,22 \pm 0,28 ^a	13,28 \pm 1,25 ^a	12,32 \pm 0,12 ^{ab}
CHCM 31 – 39 g/dL*	34,49 \pm 1,27 ^a	30,26 \pm 0,68 ^b	31,04 \pm 3,11 ^{ab}	31,72 \pm 0,30 ^{ab}
RDW 24 – 27 %*	24,67 \pm 0,48 ^a	22,13 \pm 0,26 ^b	21,45 \pm 1,18 ^b	22,90 \pm 0,11 ^{ab}
Leucometria				
Leucócitos totais 5400 – 14300 / μ L*	17133,33 \pm 2326,69	20689,76 \pm 243,67	25150,00 \pm 5699,20	18785,06 \pm 536,14
Bastonete absoluto 0 – 1000 / μ L*	92,83 \pm 57,07	0,00 \pm 30,50	0,00 \pm 139,78	37,92 \pm 13,15
Bastonete relativo 0 – 8 %*	0,67 \pm 0,42	0,00 \pm 0,23	0,00 \pm 1,04	0,28 \pm 0,09
Neutrófilo absoluto 2250 – 8580 / μ L*	7186,75 \pm 1293,24	8390 \pm 691,27	11411,00 \pm 3167,78	7816,93 \pm 298,00
Neutrófilo relativo 22 – 72 %*	41,92 \pm 3,56	40,54 \pm 1,90	45,50 \pm 8,71	40,97 \pm 0,82
Linfócito absoluto 1500 – 7700 / μ L*	8420,58 \pm 1415,38	10872,48 \pm 756,55	11245,50 \pm 3466,95	9916,50 \pm 326,14
Linfócito relativo 17 – 66 %*	48,42 \pm 3,61	52,52 \pm 1,93	44,50 \pm 8,84	53,16 \pm 0,83
Eosinófilo absoluto 0 – 1000 / μ L*	183,67 \pm 102,65 ^b	388,66 \pm 54,87 ^{ab}	869,50 \pm 251,44 ^a	269,70 \pm 23,65 ^{ab}
Eosinófilo relativo 0 – 10 %*	1,00 \pm 0,51 ^b	2,00 \pm 0,27 ^{ab}	3,50 \pm 1,26 ^a	1,49 \pm 0,12 ^{ab}
Monócito absoluto 0 – 1000 / μ L*	1218,42 \pm 232,16	996,02 \pm 124,09	1624,00 \pm 568,67	708,35 \pm 53,50
Monócito relativo 0 – 14 %*	7,83 \pm 1,16 ^a	4,82 \pm 0,62 ^{ab}	6,50 \pm 2,84 ^a	3,91 \pm 0,27 ^b
Basófilo absoluto 0 – 290 / μ L*	31,08 \pm 30,02	42,36 \pm 16,04	0,00 \pm 73,52	35,63 \pm 6,92
Basófilo relativo 0 – 4 %*	0,17 \pm 0,12	0,12 \pm 0,07	0,00 \pm 0,30	0,18 \pm 0,03
Neutrófilo:linfócito 0,67 – 1,00*	1,07 \pm 0,19	0,85 \pm 0,10	1,03 \pm 0,46	0,91 \pm 0,04
Plaquetas 100 – 350 x 10 ³ / μ L*	247,33 \pm 36,26	242,45 \pm 19,38	222,00 \pm 88,81	278,59 \pm 8,39

VGM – volume globular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW – índice de anisocitose; IPMA – sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células; * Valores de Referência: Jain (1986)

Tabela 14 - Valores do hemograma (média \pm erro padrão), de animais testados para *L. intracellularis**

Variáveis	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>		
	Positivos	Negativos	Total
ERITROGRAMA			
Hematócrito 32 – 53 %**	32,42 \pm 0,55	32,65 \pm 0,31	32,61 \pm 0,26
Hemoglobina 11 – 19 g/dL**	12,74 \pm 0,24	12,58 \pm 0,13	12,61 \pm 0,12
Hemácias 6,8 – 12,9 x 10 ³ / μ L**	10,07 \pm 0,25	10,37 \pm 0,13	10,31 \pm 0,12
VGM 37 – 59 fL**	33,08 \pm 0,90	32,15 \pm 0,34	32,33 \pm 0,31
HCM 12 – 20 g/dL**	12,88 \pm 0,32	12,32 \pm 0,12	12,43 \pm 0,11
CHCM 31 – 39 g/dL**	31,19 \pm 0,68	31,72 \pm 0,30	31,62 \pm 0,27
RDW 24 – 27 %**	22,65 \pm 0,26	22,90 \pm 0,11	22,85 \pm 0,10
LEUCOGRAMA			
Leucócitos totais 5400 – 14300 / μ L**	20086,96 \pm 1386,38	18785,06 \pm 536,14	19043,59 \pm 480,65
Bastonete absoluto 0 – 1000 / μ L**	18,89 \pm 12,08	37,92 \pm 13,15	34,34 \pm 11,76
Bastonete relativo 0 – 8 %**	0,14 \pm 0,07	0,28 \pm 0,09	0,25 \pm 0,09
Neutrófilo absoluto 2250 – 8580 / μ L**	8240,23 \pm 616,82	7816,93 \pm 298,00	7900,99 \pm 266,35
Neutrófilo relativo 22 – 72 %**	41,01 \pm 1,37	40,97 \pm 0,82	40,99 \pm 0,73
Linfócito absoluto 1500 – 7700 / μ L**	10360,39 \pm 815,48	9916,50 \pm 326,14	10004,65 \pm 291,85
Linfócito relativo 17 – 66 %**	51,35 \pm 1,57	53,16 \pm 0,83	52,80 \pm 0,74
Eosinófilo absoluto 0 – 1000 / μ L**	361,91 \pm 49,18 ^a	269,70 \pm 23,65 ^b	288,01 \pm 21,45 ^b
Eosinófilo relativo 0 – 10 %**	1,84 \pm 0,24	1,49 \pm 0,12	1,56 \pm 0,11
Monócito absoluto 0 – 1000 / μ L**	1066,11 \pm 146,11 ^a	708,35 \pm 53,50 ^b	779,39 \pm 48,53 ^b
Monócito relativo 0 – 14 %*	5,53 \pm 0,68 ^a	3,91 \pm 0,27 ^b	4,23 \pm 0,24
Basófilo absoluto 0 – 290 / μ L**	38,43 \pm 19,10	35,63 \pm 6,92	36,18 \pm 6,16
Basófilo relativo 0 – 4 %**	0,13 \pm 0,05	0,18 \pm 0,03	0,17 \pm 0,03
Neutrófilo:linfócito 0,67 – 1,00**	0,90 \pm 0,07	0,91 \pm 0,04	0,91 \pm 0,04
Plaquetas 100 – 350 x 10 ³ / μ L**	242,77 \pm 15,50	278,59 \pm 8,39	271,40 \pm 7,52

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$ – Teste T de Student)

*União dos grupos PCR e IPMA positivos; ** Valores de Referência: Jain (1986).

No esfregaço sanguíneo, foi possível observar a presença de hemoparasitas como a *Babesia caballi* (Fig.18A) em cinco animais, a *Theileria equi* (Fig.18B) em dez animais, havendo a presença de ambas em um animal. Nas alterações de morfologia celular, foi possível observar nos animais positivos na IPMA a presença de linfócitos reativos, basofilia

citoplasmática de neutrófilos, plaquetas ativadas e macroplaquetas, hipersegmentação de neutrófilos, neutrófilos tóxicos, anisocitose, monócitos ativados, e a presença de *T. equi* em um animal. Dos 14 animais positivos pelo PCR, três apresentaram *B. caballi* e as alterações presentes eram a basofilia citoplasmática em neutrófilos, plaquetas ativadas e macroplaquetas e linfócitos reativos. Um achado em comum nos dois potros positivos nas duas técnicas foi a presença de hipersegmentação e basofilia citoplasmática dos neutrófilos, indicando uma afecção crônica e infecciosa (Weiss e Wardrop, 2010).

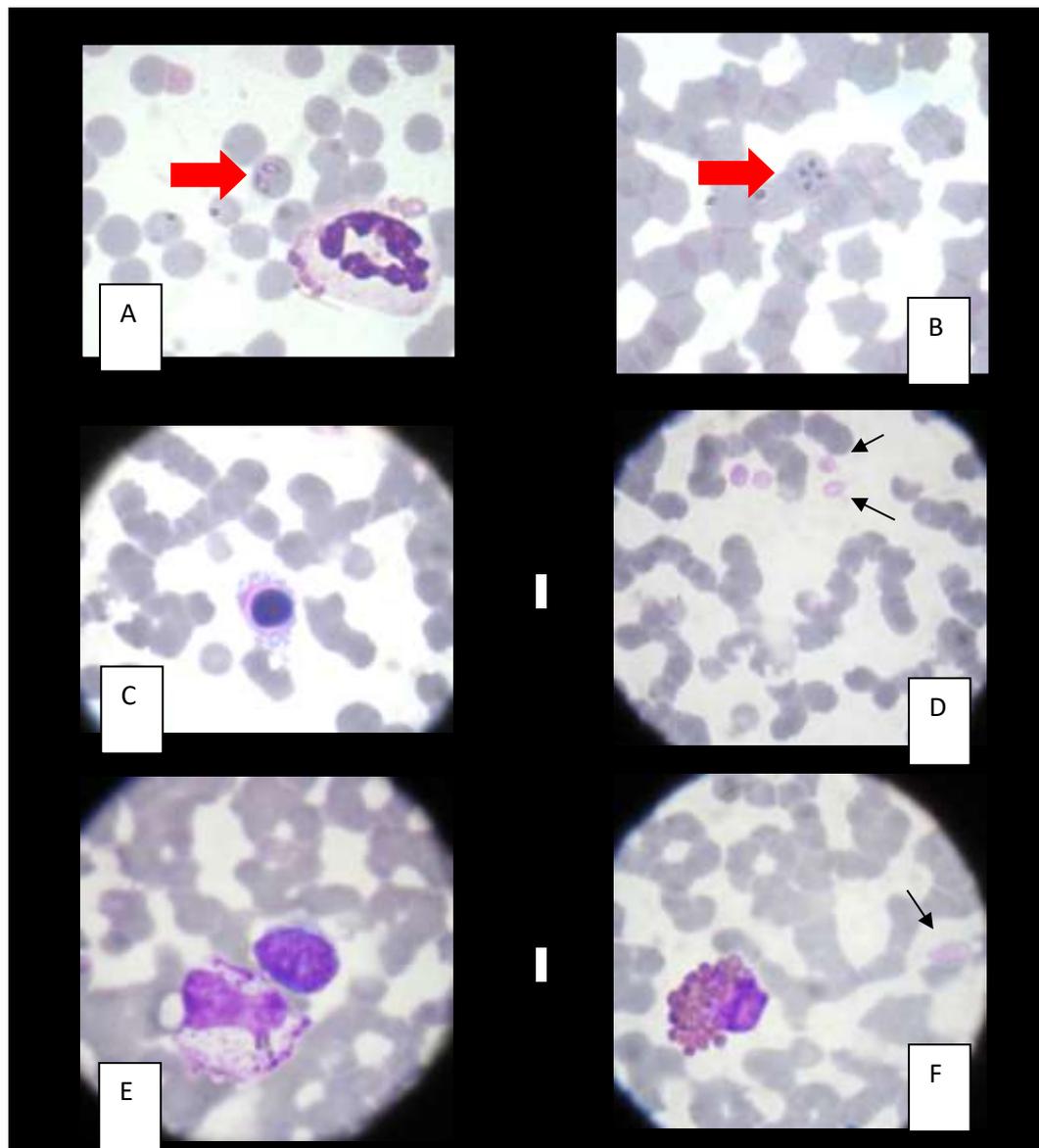


Figura 18 – Esfregaço sanguíneo de veia jugular externa. A: *Babesia caballi* e neutrófilo hipersegmentado; B: *Theileria equi* em formação de cruz de malta e hemácias crenadas; C: linfócito reativo; D: plaquetas ativadas; E: basófilo e linfócito; F: eosinófilo e macroplaqueta (seta). Coloração panótico, aumento 1000x (imersão).

4.2.5. Alterações Bioquímicas

Ao analisar as 315 amostras séricas (Tab. 15), foi possível observar que o grupo IPMA positivo diferiu ($p < 0,05$) apenas dos animais positivos nos dois testes (PCR e IPMA). Quando se retirou o grupo de animais positivos (PCR+IPMA), pelo baixo número de animais ($n=2$), diminuiu-se a variância entre as amostras e as diferenças se sobressaíram (Tab. 14). Os animais do IPMA positivos apresentaram valores séricos semelhantes aos do grupo negativo ($p > 0,05$), porém superiores aos do grupo PCR positivo ($p < 0,05$). Tanto os animais negativos para EPE, quanto os animais positivos pela IPMA apresentaram valores superiores aos de referência para a espécie. O aumento das concentrações séricas de uréia pode estar associado à diminuição da excreção urinária ou aumento do catabolismo protéico (Kaneko et al., 2008). Embora o escore corporal tenha sido próximo ao ideal (três em uma escala de 1 a 5), a perda de peso e consequente perda de massa magra é suficiente para elevar as concentrações séricas de uréia. Como os animais foram examinados uma única vez e a perda de peso pós-desmame é um achado comum, para os tratadores a condição corporal em que os animais se encontravam não foi um fato relevante. Além disso, a presença de outras alterações associadas à EPE, tais como garrotilho, hemoparasitose ou endoparasitose podem contribuir para o incremento do catabolismo protéico e elevação da concentração de uréia sérica.

Tabela 15 - Valores da bioquímica sérica (média \pm erro padrão), em animais testados para *L. intracellularis*.

Variáveis	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>			
	Positivos % (n)			Negativos
	PCR	IPMA	PCR e IPMA	
Uréia (21,4 – 51,5 mg/dL)*	41,50 \pm 6,42 ^{ab}	60,60 \pm 3,15 ^a	34,50 \pm 15,73 ^b	55,72 \pm 1,41 ^a
Creatinina (0,4 – 2,2 mg/dL)*	1,33 \pm 0,15	1,12 \pm 0,07	1,25 \pm 0,36	1,19 \pm 0,03
CK (60 – 330 U/L)*	240,50 \pm 38,68	231,00 \pm 18,95	202,00 \pm 94,74	190,25 \pm 8,47
AST (226 – 366 U/L)*	259,42 \pm 22,50	226,20 \pm 11,02	192,00 \pm 55,11	221,13 \pm 4,93
ALT (3 – 23 U/L)*	12,33 \pm 1,49	6,90 \pm 0,73	7,50 \pm 3,66	7,58 \pm 0,33
GGT (6 – 32 U/L)*	19,17 \pm 3,77	24,14 \pm 1,85	16,00 \pm 9,22	21,57 \pm 0,83
FA (86 – 295 U/L)*	156,00 \pm 12,88 ^a	115,66 \pm 6,31 ^{ab}	77,00 \pm 31,55 ^b	122,61 \pm 2,82 ^{ab}

IPMA – sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase; GGT – gama glutamil transpeptidase;

*Valores de referência para animais adultos (Smith, 1996; Duncan e Prasse, 2003; Kaneko et al., 2008).

A concentração sérica de FA diferiu ($p < 0,05$) entre os grupos PCR positivo e positivo em ambas as técnicas, porém, os valores permaneceram dentro dos limites de normalidade. Não foram encontradas citações sobre a FA em animais com EPE. A FA aumentada pode

significar problemas hepáticos, aumento da atividade osteoblástica, comum em animais com fratura ou em crescimento, tumores, ou septicemia, infecções bacterianas intra-abdominais e pela administração de estrógenos ou progestágenos (Motta, 2009), demonstrando que a presença da bactéria dentro das criptas pode alterar índices sanguíneos.

Ao excluir o grupo positivo nas duas técnicas (Tab. 16), por ter uma amostra representativa pequena, observa-se a diferença ($p < 0,05$) entre a FA, ureia e ALT dos animais PCR positivo e IPMA positivo e uma semelhança ($p > 0,05$) entre os IPMA positivos e negativos. Certamente, nestes dois últimos grupos, nestes parâmetros avaliados, já ocorreu uma reação do organismo e recuperação das concentrações séricas normais, exceto para a ureia, que pode estar em concentração diminuída devido ao aumento do catabolismo de proteínas (Kaneko et al., 2008), já que no grupo PCR positivo a doença está na forma ativa, necessitando de um maior aporte de proteínas, confirmando a afirmação supracitada.

Tabela 16 - Valores da bioquímica sérica (média \pm erro padrão), em animais testados para *L. intracellularis**.

Variáveis	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>		
	Positivos		Negativos
	PCR	IPMA	
Ureia (21,4 – 51,5 mg/dL)**	41,50 \pm 6,42 ^b	60,60 \pm 3,15 ^a	55,72 \pm 1,41 ^a
Creatinina (0,4 – 2,2 mg/dL)**	1,33 \pm 0,15	1,12 \pm 0,07	1,19 \pm 0,03
CK (60 – 330 U/L)**	240,50 \pm 38,68	231,00 \pm 18,95	190,25 \pm 8,47
AST (226 – 366 U/L)**	259,42 \pm 22,50	226,20 \pm 11,02	221,13 \pm 4,93
ALT (3 – 23 U/L)**	12,33 \pm 1,49 ^a	6,90 \pm 0,73 ^b	7,58 \pm 0,33 ^b
GGT (6 – 32 U/L)**	19,17 \pm 3,77	24,14 \pm 1,85	21,57 \pm 0,83
FA (86 – 295 U/L)**	156,00 \pm 12,88 ^a	115,66 \pm 6,31 ^b	122,61 \pm 2,82 ^b

*Excluído o grupo PCR e IPMA positivo; IPMA - sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase; GGT – gama glutamil transpeptidase;

**Valores de referência para animais adultos (Smith, 1996; Duncan e Prasse, 2003; Kaneko et al., 2008).

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$ – Teste SNK)

Ao agrupar os animais positivos, independentemente da técnica utilizada (Tab. 17) observa-se concentração sérica da CK superior ($p < 0,05$) nos animais positivos. A literatura relata o aumento de enzimas musculares (CK) (Sampieri et al., 2006; Divers, 2008) e AST (Divers, 2008) em potros afetados pela EPE. Os valores encontrados tanto de AST quanto de creatinina, apesar numericamente mais altos, nos animais positivos, ainda estão dentro da normalidade, sem diferença quando comparados aos negativos ($p > 0,05$).

Tabela 17 - Valores da bioquímica sérica (média \pm erro padrão), em animais testados para *L. intracellularis*.

Variáveis	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>		
	Positivos	Negativos	Total
Creatinina (0,4 – 2,2 mg/dL)*	1,16 \pm 0,24	1,19 \pm 0,03	1,19 \pm 0,03
CK (60 – 330 U/L)*	231,88 \pm 158,73 ^a	190,25 \pm 8,47 ^b	198,73 \pm 7,59
AST (226 – 366 U/L)*	231,36 \pm 83,99	221,13 \pm 4,93	223,21 \pm 4,40
GGT (6 – 32 U/L)*	22,95 \pm 8,82	21,57 \pm 0,83	21,85 \pm 0,74

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$ – Teste T de Student)

*Valores de referência para animais adultos (Smith, 1996; Duncan e Prasse, 2003; Kaneko et al., 2008).

Apesar dos animais terem apresentado uma forma subclínica, algumas alterações foram observadas na bioquímica sérica, que poderiam auxiliar como marcadores em plantéis com diagnóstico precoce da infecção.

4.2.6. Alterações na eletroforese de proteínas séricas

Foram realizadas as frações eletroforéticas das proteínas como é possível observar na Tab. 18. As frações α_1 e α_2 -globulinas incluem a antitripsina, lipoproteínas de alta e muito baixa densidade, macroglobulinas, ceruloplasmina e haptoglobina (Kaneko et al., 2008) A haptoglobina é uma proteína de fase aguda moderada por aumentar até 10 vezes seu valor normal durante uma resposta de fase aguda. Acredita-se ter um efeito bacteriostático por limitar a disponibilidade do ferro, essencial para o crescimento bacteriano, pode ter ação anti-inflamatória por proteger contra os radicais livres e inibindo a quimiotaxia de granulócitos e a fagocitose (Crisman et al., 2008). Todos os valores estão dentro dos padrões de normalidade, com exceção da fração β_2 , aumentada nos grupos PCR, IPMA e negativos. As beta-globulinas são uma fração proteica que correspondem às transferrinas, lipoproteínas, transferrinas, ferritinas, hemopexinas e entre elas, proteínas do sistema complemento C₃, C₄, proteínas C reativas, plasminogênio e fibrinogênio que correspondem à resposta de fase aguda da inflamação (Kaneko et al., 2008), demonstrando a presença de infecções concomitantes ainda na fase aguda. Porém, ao avaliar a concentração plasmática de fibrinogênio, pode-se observar que os valores também se encontram dentro dos valores de normalidade, apesar de numericamente o grupo PCR e IPMA positivos ter menores valores, concordando com a justificativa de Crisman et al. (2008) ao fibrinogênio ser uma proteína de fase aguda insensível, por ter um intervalo de referência para animais sadios longo e ter também grande período de resposta após um estímulo inflamatório.

Tabela 18 - Valores do resultado da eletroforese de proteínas séricas (média \pm erro padrão), em animais testados para *L. intracellularis*.

Variáveis	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>			
	Positivos % (n)			Negativos
	PCR	IPMA	PCR e IPMA	
Proteína total (5,8 – 8,7 g/dL)*	6,65 \pm 0,18	7,19 \pm 0,09	7,35 \pm 0,45	7,05 \pm 0,04
Albumina (2,6 – 3,7 g/dL)*	3,22 \pm 0,18	3,52 \pm 0,09	3,77 \pm 0,43	3,35 \pm 0,04
α_1 (0,06 – 0,7 g/dL)*	0,55 \pm 0,05	0,57 \pm 0,02	0,52 \pm 0,11	0,55 \pm 0,01
α_2 (0,31 – 1,31 g/dL)*	0,34 \pm 0,05	0,38 \pm 0,03	0,31 \pm 0,13	0,40 \pm 0,01
β_1 (0,4 – 1,58 g/dL)*	0,82 \pm 0,01	0,81 \pm 0,03	0,85 \pm 0,15	0,87 \pm 0,01
β_2 (0,29 – 0,89 g/dL)*	0,98 \pm 0,09	0,94 \pm 0,05	0,88 \pm 0,22	0,93 \pm 0,02
γ (0,55 – 1,46 g/dL)*	0,83 \pm 0,11	1,04 \pm 0,05	1,04 \pm 0,27	0,95 \pm 0,02
Albumina:globulina (0,62 – 1,46)*	0,98 \pm 0,09	0,97 \pm 0,05	1,05 \pm 0,23	0,97 \pm 0,02
Fibrinogênio (100 – 400 mg/dL)*	354,55 \pm 77,55	333,33 \pm 44,78	250,00 \pm 181,88	387,44 \pm 18,61

IPMA – sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células

*Valores de referência para animais adultos (Kaneko et al., 2008).

Quando excluídos os dados referentes ao grupo positivo em ambas as técnicas (Tab.19), é possível perceber que há menor valor na proteína total de animais PCR positivos, porém ainda dentro da normalidade, o que contrasta com os resultados encontrados na literatura, que relata a hipoproteinemia como achado mais comum (McClintock e Collins, 2004; Atherton e McKenzie III, 2006; Sampieri et al., 2006; Dauvillier et al., 2008; Divers, 2008; Allen et al., 2009; Merlo et al., 2009).

Tabela 19 - Valores do resultado da eletroforese de proteínas séricas (média \pm erro padrão), em animais testados para *L. intracellularis*.*

Variáveis	Animais testados para <i>Lawsonia intracellularis</i>		
	Positivos		Negativos
	PCR	IPMA	
Proteína total (5,8 – 8,7 g/dL)**	6,65 \pm 0,18 ^b	7,19 \pm 0,09 ^a	7,05 \pm 0,04 ^a
Albumina (2,6 – 3,7 g/dL)**	3,22 \pm 0,18	3,52 \pm 0,09	3,35 \pm 0,04
α_1 (0,06 – 0,7 g/dL)**	0,55 \pm 0,05	0,57 \pm 0,02	0,55 \pm 0,01
α_2 (0,31 – 1,31 g/dL)**	0,34 \pm 0,05	0,38 \pm 0,03	0,40 \pm 0,01
β_1 (0,4 – 1,58 g/dL)**	0,82 \pm 0,01	0,81 \pm 0,03	0,87 \pm 0,01
β_2 (0,29 – 0,89 g/dL)**	0,98 \pm 0,09	0,94 \pm 0,05	0,93 \pm 0,02
γ (0,55 – 1,46 g/dL)**	0,83 \pm 0,11	1,04 \pm 0,05	0,95 \pm 0,02
Albumina:globulina (0,62 – 1,46)**	0,98 \pm 0,09	0,97 \pm 0,05	0,97 \pm 0,02
Fibrinogênio (100 – 400 mg/dL)**	354,55 \pm 77,55	333,33 \pm 44,78	387,44 \pm 18,61

*Excluído o grupo PCR e IPMA positivo; IPMA – sorologia pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células

**Valores de referência para animais adultos (Kaneko et al., 2008).

Os resultados encontrados neste presente estudo contrastam com os apresentados nos Estados Unidos, pois potros mais velhos, recém-desmamados e sobreanos com profunda

hipoalbuminemia e edema ventral durante o outono ou inverno devem ser considerados suspeitos para *L. intracellularis* (Frazer, 2007). Não foi encontrada diferença entre o período das coletas e os animais que eram positivos não apresentavam nenhum nível proteico abaixo da normalidade, para provocar consequências como o edema ventral ou periférico.

5. CONCLUSÕES

Ao comparar as duas técnicas sorológicas, IPX e IPMA, foi possível observar uma maior detecção de positividade da IPMA para o diagnóstico da EPE. A concordância entre as técnicas foi discreta.

Por se apresentar de diferentes formas, a EPE também apresenta diferentes manifestações clínicas, desde nenhum sinal até a morte do animal, sendo mais aparente a forma subclínica.

A EP é uma doença importante, porém, subestimada, porque pode gerar prejuízo aos criadores de equinos já que foram observados animais sadios disseminando a *L. intracellularis* pelas fezes, sem apresentar sinais clínicos, demonstrando assim que a tropa deve ser acompanhada periodicamente de forma profilática para evitar o surgimento da forma aguda através dos animais subclínicos, gerando menores perdas econômicas.

Estudos prospectivos deverão ser realizados a fim de se determinar a fonte de contaminação dos animais positivos, fatores que desencadeiam a disseminação pelas fezes, a durabilidade e infectividade das cepas presentes nas fezes de animais confirmados para EPE e no meio, correlacionar quantidade de bactéria disseminada nas fezes com intensidade das alterações clínicas e laboratoriais, e, para determinar qual parte do sistema imune é responsável por determinar a forma clínica da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-GHAMDI, G. Characterization of proliferative enteropathy in horses. PhD thesis. University of Minnesota, Minnesota, USA. 2003. 157 p.

ALLEN, K. J.; PEARSON, G. R.; FEWS, D.; et al., *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weaning foal, with a tentative histological diagnosis of lymphocytic plasmacytic enteritis. *Equine Vet Educ*, v.21, n.8, p.411-414, 2009.

ATHERTON, R. P.; MCKENZIE III, H. C. Alternative Antimicrobial Agents in the Treatment of Proliferative Enteropathy in Horses. *J Equine Vet Sci*, v. 26, n. 11, p.535-541, 2006.

BIESTER, H. E.; SCHWARTE, L. H. Intestinal Adenoma in Swine. *Am J Pathol*, v.7, p.175-185, 1931.

BIHR, T. P. Protein-losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weaning foal. *Can Vet J*, v.44, p.65-66, 2003.

BOESEN, H. T.; JENSEN, T. K.; MOLLER, K.; et al. Evaluation of a Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of Porcine Proliferative Enteropathy. *Vet Microbiol*, v.109, p.105-112, 2005.

BREES, D. J.; SANDHOFF, A. H.; KLUGE, J. P. *Lawsonia intracellularis*-like organism infection in a miniature foal. *J Am Vet Med Assoc*, v. 215, p.511-514, 1999.

COLLINS, J. E.; LIBAL, M. C. Proliferative enteritis in two pups. *J Am Vet Med Assoc*, v.193, p.886-889, 1983.

COLLINS, A.; LOVE, R. J.; POZO, J.; et al. Studies on *ex vivo* survival of *Lawsonia intracellularis*. *J Swine Health Prod*, v.8, n.5, p.211-215, 2000.

COOPER, D. M.; SWANSON, D. L.; GEBHART, C. J. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. *Vet Microbiol.*, v. 54, p.47-62, 1997.

CRISMAN, M. V.; SCARRATT, W. R.; ZIMMERMAN, K. L. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Vet Clin North Am Equine Practice*. v.24, p.285-297, 2008.

DAUVILLIER, J.; PICANDET, V.; HAREL, J.; et al. Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in 2 foals. *Can Vet J*, v.47, p. 689-691, 2006.

DEPREZ, P.; CHIERS, K.; GEBHART, C. J.; et al. *Lawsonia intracellularis* infection in a 12-month-old colt in Belgium. *Vet Rec*, v.157, n.24, p.774-776, 2005.

DIBARTOLA, S. P. *Anormalidades de Fluidos, Eletrólitos e Equilíbrio Ácido-Básico na Clínica de Pequenos Animais*. 3ªed. SP, São Paulo: Roca. 2007.664p.

DIVERS, T. J. Lawsonia (Proliferative Enteropathy): Clinical Signs, Diagnosis and Treatment. In: 47rd British Equine Veterinary Association Congress, 2008. Liverpool, United Kingdom. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2007. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/beva/2008/62.pdf> (acessado em: 20 mar 2010).

DROLET, R.; LAROCHELLE, D.; GEBHART, C. J. Proliferative enteritis in white-tailed deer. *J Vet Diagn Invest.*, v. 8, p. 250-253, 1996.

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

ELWELL, M. R.; CHAPMAN, A. L.; FRENKEL, J. K. Duodenal hyperplasia in a guinea pig. *Vet Pathol.*, v. 18, p.136-139, 1981.

ERIKSEN, K.; LANDSVERK, T.; BRATBERG, B. Morphology and immunoperoxidase studies of intestinal adenomatosis in the blue fox, *Alopex lagopus*. *J Comp Pathol.*, v.102, p.265-278, 1990.

FOX, J. G.; LAWSON, G. H. K. *Campylobacter*-like omega intercellular antigen in proliferative colitis of ferrets. *Lab Anim Sci.*, v.38, p.34-36, 1988.

FRANK, N.; FISHMAN, C. E.; GEBHART, C. J.; et al. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal. *Equine Vet. J.*, v.30, p.549-552, 1998.

FRAZER, M. How to Diagnose and Treat *Lawsonia intracellularis*. In: 53rd Annual Convention of American Association of Equine Practitioners, 2007. Orlando, Florida, EUA. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2007. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2007/frazer/chapter.asp> (acessado em: 20 mar 2010).

FRAZER, M. L. *Lawsonia intracellularis* Infection in Horses: 2005-2007. *J Vet Intern Med*, v.22, p. 1243-1248, 2008.

FRISK, C. S.; WAGNER, J. E. Hamster enteritis: a review. *Lab Anima*. v.11, p. 79-85, 1977.

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J.; DEEN, J.; et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J Vet Diag Invest*, 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. *Can J Vet Res*, v.66, p.99-107, 2002b.

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J.; WINKELMAN, N. L.; et al. A Comparative Study of an Indirect Fluorescent Antibody Test and An Immunoperoxidase Monolayer Assay for the Diagnosis of Porcine Proliferative Enteropathy. *J Vet Diagn Invest*, v.14, p.420-423, 2002c

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Preparation and characterization of policlonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J Vet Diagn Invest*, v.15, p.438-446, 2003a.

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Onset and Duration of Fecal Shedding, Cell-Mediated and Humoral Immune Responses in Pigs After Challenge with a Pathogenic Isolate or Attenuated Vaccine Strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol*, v. 91, p.135-145, 2003b.

GUIMARÃES-LADEIRA, C. V.; PALHARES, M. S.; OLIVEIRA, J. S. V. Immunohistochemistry repective and fecal PCR and serology longitudinal study of *Lawsonia Intracellularis* in equine in the state od Minas Gerais - Brasil. In: Latin American Veterinary Conference, 2008. Lima – Peru, 2008. Disponível em: www.ivis.org/proceedings/lavac/2008/posteres.pdf (acessado em: 22 out 2008).

GUIMARÃES-LADEIRA, C. V.; PALHARES, M. S.; OLIVEIRA, J. S. V.; et al. Faecal Shedding and Serological Cross-Sectional Study of *Lawsonia intracellularis* in Horses in the State of Minas Gerais, Brazil. *Equine Vet J*, v. 41, n.6, p.593-596, 2009.

HINES, M. T. *Rhodococcus equi*. In: SELTON, D. C.; LONG, M. T. Equine Infectious Diseases. St. Louis: Saunders-Elsevier. 2007. cap.32, p.281-295.

JACOBSON, M.; ASPAN, A.; KONIGSSON, M. H.; et al. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. *Vet Microbiol*, v.102, p.189-201, 2004.

JACOBSON, M.; WALLGREN, P.; NORDERGRAHN, A.; et al. Evaluation of a Blocking ELISA for the Detection of Antibodies Against *Lawsonia intracellularis* in Pig Sera. *Acta Vet Scand*, v.53, n.23, p.1-6, 2011.

JAIN, N. C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 4ª ED. EUA, PA, Philadelphia: Lea & Febiger. 1986. 1346p.

JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*. EUA, PA: Lea & Febiger. 1993. 417p.

JONES, G. F.; WARD, G. E.; MURTAUGH, M. P.; et al. Enhanced detection of intracellular organism of Swine Proliferative Enteritis, *Ileal symbiont intracellularis*, in feces by Polymerase Chain Reaction. *J Clin.Microbiol*, v.31, p.2611-2615, 1993.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6ª Ed. EUA, MA, Burlington: Elsevier Academic Press. 2008. 928p.

KIMBERLY, M.; MCGURRIN, J.; VENGUST, M.; et al. An outbreak of *Lawsonia intracellularis* infection in a standardbred herd in Ontario. *Can Vet J*, v.48, p.927-930, 2007.

KELLEHER, S. L.; LONNERDAL, B. Immunological Activities Associated with Milk. *Adv Nut Res*. v.10, p.39-45, 2001.

KNITTEL, J. P.; JORDAN, D. M.; SCHWARTZ, K. J.; et al. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis* exposed pigs. *Am J Vet Res*, v.59, p.722-726, 1998.

KLEIN, E. C.; GEBHART, C. J.; DUHAMEL, G. E. Fatal outbreaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. *J Med Primatol.*, v.28, p.11-8, 1999.

KROLL, J. J.; ROOF, M. B.; MCORIST, S. Evaluation of Protective Immunity in Pigs Following Oral Administration of an Avirulent Live Vaccine of *Lawsonia intracellularis*. *Am J Vet Res*, v.65, n.5, p.559-565, 2004.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, p. 159-174, 1977.

LAVOIE, J. P.; DROLET, R.; PARSON, D.; et al. Equine proliferative enteropathy: A cause of weight loss, colic, diarrhea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms. *Equine Vet J.*, v.32, p.418-425, 2000.

LAVOIE, J. P.; DROLET, R. *Lawsonia intracellularis*. In: SELTON, D. C.; LONG, M. T. Equine Infectious Diseases. St. Louis: Saunders-Elsevier. 2007. cap.36, p.313-316.

LAWSON, G. H. K.; MCORIST, S.; ROWLAND, A. C.; et al. Serological diagnosis of the porcine proliferative enteropathies: implications for aetiology and epidemiology. *Vet. Rec.* V.122, p.554-557, 1988.

LAWSON, G. H. K.; MCORIST, S.; JASNI, S.; et al. Intracellular Bacteria of Porcine Proliferative Enteropathy: Cultivation and Maintenance *in vitro*. *J Clin Microbiol*, v.31, n.5, p.1136-1142, 1993.

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

LEE, Laboratório de epidemiologia e estatística. Análise de concordância – Kappa Disponível em: <http://www.lee.dante.br/pesquisa/kappa/index.html> (acessado em: 14 set 2011).

LEMARCHAND, T. X.; TULLY, T. N.; SHANE, S. M.; et al. Intracellular *Campylobacter*-like organisms associated with rectal proliferative enteroproctitis in emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet Path.*, v. 34, p.152-156, 1977.

MATOS, G. F. J.; VICTORINO, J. A. Critérios para o Diagnóstico de Sepses, Sepses Grave e Choque Séptico. *Rev Bras Ter Intensiva*, v.16, n.2, p.102-104, 2004.

MERLO, J. L.; SHEATS, M. K.; ELCE, Y.; et al. Outbreak of *Lawsonia intracellularis* on a Standardbred breeding farm in North Carolina. *Equine Vet Educ*, v.21, n.4, p. 179-182, 2009.

MCCLINTOCK, S. A.; COLLINS, A. M. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal in Australia. *Australian Vet. J.*, v. 82, p.750-752, 2004.

MCORIST, S.; JASNI, S.; MACKIE, R. A.; et al. Reproduction of Porcine Proliferative Enteropathy with Pure Cultures of Ileal Symbiont Intracellularis. *Inf Immunol*, v.61, n.10, p.4286-4292, 1993.

MCORIST, S.; GEBHART, C. J.; BOID, R.; et al. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the Obligately Intracellular Bacterium of Porcine Proliferative Enteropathy. *Int J Syst Bacteriol*, v. 45, n.4, p.820-825, 1995.

MCORIST, S.; GEBHART, C. J. Proliferative enteropathy. In: STRAW et al., ed. Diseases of Swine. 9th. Academic Press: San Diego, 2006.

MOON, H. W.; CUTLIP, R. C.; AMTOWER, W. C.; et al. Intraepithelial Vibrio Associated with Acute Typhilitis of Young Rabbits. *Vet Path.*, v.11, p.313-326, 1974.

MOTTA, V. T. Enzimas. In: *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. 2009. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medbook. cap. 9. p.90-120.

MOYER, W. SCHUMACHER, J. SCHUMACHER, J. CARTER, G. K. *Are Drugs Effective Treatment for Horses with Acute Laminitis?* In: AAEP, 2008. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2008, v.54, pp. 337-340.

NOGRADI, N.; SLOVIS, N. M.; GEBHART, C. J.; et al. Evaluation of the Field Efficacy of an Avirulent Live *Lawsonia intracellularis* vaccine in foals. *Vet J*, in press 2011. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.05.026.

OAKS, J. L. Mycobacterial Infections. In: SELTON, D. C.; LONG, M. T. *Equine Infectious Diseases*. St. Louis: Saunders-Elsevier. 2007. cap.33, p.296-300.

PAES, P. R. O.; LEME, F. O. P.; CARNEIRO, R. A. *Hematologia dos Animais Domésticos*. Belo Horizonte: FEPMVZ. 2009. 119p.

PAGE, A. E.; SLOVIS, N. M.; GEBHART, C. J.; et al. Serial Use of Serologic Assays and Fecal PCR Assays to Aid in Identification of Subclinical *Lawsonia intracellularis* Infection for Targeted Treatment of Thoroughbred Foals and Weanlings. *J Am Vet Med Assoc*, v.238, n.11, p.1482-11489, 2011a.

PAGE, A. E.; LOYNACHAN, A. T.; BRYANT, U; et al. Characterization of the Interferon Gamma Response to *Lawsonia intracellularis* Using an Equine Proliferative Enteropathy Challenge (EPE) Model. *Vet Immunol Immunopathol*, v.143, p.55-65, 2011b.

PAPICH, M. G. Antimicrobial Therapy For Gastrintestinal Diseases. *Vet Clin Equine*, v. 19, p.645-663, 2003.

PUSTERLA, N.; MAPES, S.; REJMANEK, D.; et al. Detection of *Lawsonia intracellularis* by Real-Time PCR in the Feces of Free Living Animals from Equine Farms with Documented Occurrence of Equine Proliferative Enteropathy. *J Wildlife Disease*, v.44, n.4, p.992-998, 2008a.

PUSTERLA, N.; HIGGINS, J. C.; SMITH, P.; et al. Epidemiological Survey on Farms with Documented Occurrence of Equine Proliferative Enteropathy due to *Lawsonia intracellularis*. *Vet Rec*, v.163, n.5, p.156-158, 2008b.

PUSTERLA, N.; GEBHART, C.J. Equine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Equine Vet Educ*. v.21, n.8, p.415-419, 2009.

PUSTERLA, N.; HILTON, H.; WATTANAPHANSAK, S.; et al. Evaluation of the Humoral Immune Response and Fecal Shedding in Weaning Foals Following Oral and Intra-Rectal Administration of an Avirulent Live Vaccine of *Lawsonia intracellularis*. *Vet J*, v.182, p.458-462, 2009a.

PUSTERLA, N.; JACKSON, R.; MAPES, S. M.; et al. *Lawsonia intracellularis*: Humoral Immune Response and Fecal Shedding in Weanling Foals Following Intra-Rectal Administration of Frozen-Thawed or Lyophilized Avirulent Live Vaccine. *Vet J*, in press 2009b. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.07.008.

PUSTERLA, N.; COLLIER, J.; MAPES, S. M.; et al. Effects of Administration of an Avirulent Live Vaccine of *Lawsonia intracellularis* on Mares and Foals. *Vet Rec*, v.164, n. 25, p.783-785, 2009c.

PUSTERLA, N.; JACKSON, R.; WILSON, R.; et al. Temporal Detection of *Lawsonia intracellularis* using Serology and Real-Time PCR in Thoroughbred Horses Residing on a Farm Endemic for Equine Proliferative Enteropathy. *Vet Microbiol*, v.136, p.173-176, 2009d.

PUSTERLA, N.; MAPES, S.; JOHNSON, C.; et al. Comparison of Feces Versus Rectal Swabs for the Molecular Detection of *Lawsonia intracellularis* in Foals with Equine Proliferative Enteropathy. *J Vet Diagn Invest*, v.22, p.741-744, 2010a.

PUSTERLA, N.; WATTANAPHANSACK, S.; MAPES, S.; et al. Oral Infection of Weanling Foals with an Equine Isolate of *Lawsonia intracellularis*, Agent of Equine Proliferative Enteropathy. *J Vet Intern Med*, v.24, p.622-627, 2010b.

PUSTERLA, N.; MAPES, S. M.; GEBHART, C. J. *Lawsonia intracellularis*-Specific Interferon γ Gene Expression by Peripheral Blood Mononuclear Cells in Vaccinated and Naturally Infected Foals. *Vet J*, in press 2011. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.05.018.

REED, S. M.; BAYLY, W. M. *Medicina Interna Equina*. RJ, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. 938p.

ROBINSON, N. E. *Current Therapy in Equine Medicine 5*. EUA, Missouri: Saunders, 2003. 930p.

ROWLAND, A. C.; LAWSON, G. H. K.; MAXWELL, A. Intestinal Adenomatosis in the Pig: Occurrence of a Bacterium in Affected Cells. *Nature*, v.247, 417, 1973.

RUBINO, G.; CITO, A. M.; LACINIO, R.; et al. Hematology and Some Blood Chemical Parameters as a Function of Tick-Borne Disease (TBD) Signs in Horses. *J Equine Vet Sci*, v.26, n.10, p.475-480, 2006.

SAINTY, T. J. Proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* infection. In: *Proceedings of the 41st British Equine Veterinary Association Congress*, Equine Veterinary Journal Ltd, Newmarket. p 48, 2002.

SAMPIERI, F.; HINCHCLIFF, K.W.; TORIBIO, R.E. Tetracycline therapy of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in foals. *Equine vet. J.* v.38, p.89-92, 2006.

SHIMIZU, C.; SHIBAHARA, T.; TAKAI, S.; et al. *Lawsonia intracellularis* and Virulent *Rhodococcus equi* Infection in a Thoroughbred Colt. *J Comp Path*, in press, p.1-6, 2010.

SMITH, D. G. E.; LAWSON, G. H. K. *Lawsonia intracellularis*: Getting Inside the Pathogenesis of Proliferative Enteropathy. *Vet Microbiol*, v.82, p.331-345, 2001.

SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S. L., BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 4ª Ed, 2006. 897p.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Proteins. *In: Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2ªED. ING, Oxford: Blackwell. 2008. Cap.7, p.369-413.

THEML, H.; DIEM, H.; HAFERLACH, T. *Color Atlas of Hematology*. EUA, Nova Iorque: Thieme. 2004. Cap.4, p.29-51.

THRALL, M. A. Avaliação Laboratorial das Proteínas do Plasma e do Soro Sanguíneo. *In: THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: Roca. 2007. Cap.26. p.376-393.

VANDENBERGHE, J.; VERHEVEN, A.; LAUWERS, S.; et al. Spontaneous adenocarcinoma of the ascending colon in Wistar rats: the intracytoplasmic presence of *Campylobacter*-like bacteria. *J Comp. Path.*,v.95, p.45-55, 1985.

VAN REE, M.; PATER, M.; VAN MAANEN, C.; et al.; The Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in Foals in the Netherlands. *In: European Veterinary Conference – Voorjaarsdagen*, 2009. Amsterdã, Holanda. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2009. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/voorjaarsdagen/2009/eqposter.pdf#nameddest=3> (acessado em: 20 mar 2010).

VOLTARELLI, J. C. Febre e Inflamação. *Medicina, Ribeirão Preto*, v.27, n.1-2, p.7-48, 1994.

WATTANAPHANSAK, S.; ASAWAKARN, T.; GEBHART, C. J.; et al. Development and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Porcine Proliferative Enteropathy. *J Vet Diagn Invest*, v.20, p.170-177, 2008.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. *In: Schalm's Veterinary Hematology*. 6ª ED. EUA, IA, Ames: Blackwell. 2010. 1232p.

WILLIAMS, N. M.; HARRISON, L.; GEBHART, C. J. Proliferative enteritis in a foal caused by *Lawsonia interacellularis* like bacteria. *J Vet Diagn Invest*, 8: 254-256, 1996.

WILSON, J. H.; GEBHART, C. J.; *Lawsonia* Proliferative Enteropathy in Foals: Clinical Features and Piglet Parallels. *In: 54th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*, 2008. Austin, Texas, EUA. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2008. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaepfocus/2008/Wilson.pdf> (acessado em: 20 mar 2010).

WONG, D. M.; ALCOTT, B. A.; SPONSELLER, J. L.; et al. Impaired Intestinal Absorption of Glucose in 4 Foals with *Lawsonia intracellularis* Infection. *J Vet Intern Med*, v. 23, p. 940-944, 2009.

WUERSCH, K.; HUESSY, D.; KOCH, C.; et al. *Lawsonia intracellularis* Proliferative Enteropathy in a Filly. *J Vet Med*, v.53, n.1, p.17-21, 2006.

ANEXOS

ANEXO II

ENTEROPATIA PROLIFERATIVA EM POTROS

IDENTIFICAÇÃO

Nome/Número: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Raça: _____

Propriedade: _____ Município: _____ Tel: _____

Proprietário: _____ Veterinário resp.: _____

HISTÓRICO

Diarréia: Sim Não. Quando: _____

Característica das fezes: _____

Medicação: _____

Vermifugação data: _____ vermífugo: _____

Data do desmame: _____

Afecções e medicações pós-desmame:

EXAME FÍSICO

Condição corporal: _____ Mucosas: _____ TPC: _____

Características gerais:

Característica das fezes

Alimentação atual: _____

Mineralização: _____

ANEXO III

PROTOCOLO PARA PROTEINOGRAMA

PREPARAÇÃO DO CORANTE

- 1 g Ponceau
- 50 mL ácido acético glacial
- 950 mL água milliQ

PREPARAÇÃO DO CORANTE

- 475 mL metanol
- 50 mL ácido acético glacial
- 475 mL água milliQ

PROCEDIMENTO

1. Montar as cubas. Preencher com 80mL de tampão TRIS CELMGEL em cada cuba.
2. Preencher os espaços destinados às amostras de soro. Deve-se cortar a ponta do primeiro filme para posterior identificação (sempre a ponta cortada será do primeiro gel). Pipetar com a pipeta Hamilton uma pequena gota (0,4 μ L). Fazer um mapa das amostras de cada filme.
3. Colocar o filme na cuba.
4. Ligar o aparelho a 90 v por 36 min (para equinos).
5. Após acabar o tempo, retirar o filme e deixar correr o excesso de tampão.
6. Colocar na solução corante por 5 minutos.
7. Colocar na solução descorante por 5 minutos.
8. Secar com secador quente até o gel mudar de cor.
9. Colocar na solução descorante e agitar até o filme ficar transparente.
10. Secar com secador.
11. Identificar o filme de acordo com o mapa.
12. Ler em escaner e programa apropriado.

ANEXO IV

PROTÓCOLO DE SOROLOGIA IPMA

PREPARAÇÃO DA PLACA

1. Preparar os 96 poços (estéreis, de fundo reto) com céls de McCoy a serem infectadas. Adicionar 100 uL da suspensão de céls por poço.
2. Adicionar a *Lawsonia intracellularis* (cerca de 10^6 bactérias), congeladas do sobrenadante do frasco, para misturar com 100mL de DMEM, 5% FBS, 1% L-Glu, 0,5% fungazone. Pipetar o meio do frasco e adicionar à solução com bactéria, 24h antes de diluir as céls (30% monopavimentado confluyente).
3. Cultivar as placas no dia 5 ou 6 após a infecção, quando a monopavimentação está em 90%, descartando o sobrenadante e adicionando 100uL de solução fria de etanol : metanol (1:1) m cada poço por 20 segundos.
4. Deixar as placas secarem “overnight” à temperatura ambiente e pode congelar a -20°C por mais de 6 meses.

PROCEDIMENTO

13. Hidratar os poços infectados com água destilada a 37°C na estufa.
14. Em uma microplaca de diluição de 96 poços de fundo arredondado, diluir o soro em PBS em solução de 1:60 (2uL de soro em 120uL de leite desnatado a 5% e 0,05% solução de Tween 20 em PBS).
15. Na placa infectada, descartar a água destilada e bater no papel toalha para tirar o excesso e adicionar a cada fileira 100uL da solução da placa de diluição.
16. Colocar em uma câmara úmida em estufa a 37°C por 30 minutos.

Hora entrada:	Hora saída:
---------------	-------------
17. Descartar o sobrenadante e enxaguar com solução PBS + 0,05% Tween 20 por 3 vezes e bater em papel toalha para tirar o excesso.
18. . Adicionar aos poços 95uL de IgG de solução de soro Equino + Tampão IPMA 1:4000 (2,5 uL de IgG anti-equino em 10mL de PBS + 2,5% FBS + 0,05% Tween 20).
19. Colocar em uma câmara úmida em estufa a 37°C por 45 minutos.

Hora entrada:	Hora saída:
---------------	-------------
20. Preparar o corante para utilização. Antes dos 5 minutos finais, descongelar o Tampão Acetato corante EAC na estufa a 37°C (1 tablete + 1mL de Etanol por 5min, adicionar 9mL de água MilliQ e então 10 uL de H_2O_2).
21. Descartar o sobrenadante e enxaguar em solução PBS + 0,05% Tween 20 por 3 vezes e bater em papel toalha para tirar o excesso.
22. Adicionar 100 uL da solução tampão de EAC em cada poço. Incubar em temperatura ambiente por 20 minutos.

Hora entrada:	Hora saída:
---------------	-------------

23. Descartar o sobrenadante e enxaguar com água destilada 3 vezes e bater em papel toalha para tirar o excesso.
24. Secar na estufa por 20 minutos.
Hora entrada: Hora saída:
25. Ler em microscópio invertido.

ANEXO V

PROTOCOLO PARA ISOLAMENTO DE DNA PARA PCR DE FEZES

PONTOS IMPORTANTES ANTES DO INÍCIO:

- Para detecção de células que são difíceis de lisar, como as de algumas bactérias e parasitas, a temperatura de lise no 3º passo pode ser aumentada para 95°C, se necessário.
- Todos os passos de centrifugação devem ser realizados em temperatura ambiente (15-25°C) a 20.000 x g (aproximadamente 14.000 rpm). Aumente o tempo caso a sua centrífuga não poder alcançar 20.000 x g (em vez de centrifugar 5 min a 20.000 x g, centrifugue a 10 min a 10.000 x g).
- Os tubos de 2 mL utilizados no 5º passo deve ser largo o suficiente para acomodar o tablete InhibitEX.

COISAS A FAZER ANTES DE INICIAR:

- Assegurar que o Tampão AW1 e AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções no protocolo.
- Misture todos os tampões antes do uso.
- Se há a formação de um precipitado no tampão ASL ou AL, dissolver incubando a 70°C.
- Prepare água a 70°C para uso nos passos 3 e 12.

PROCEDIMENTO

1. Pesar 180-220 mg de fezes em um tubo de microcentrífuga de 2 mL e colocar o tubo no gelo.
2. Adicionar 1,4 mL do tampão ASL em cada amostra de fezes. Vortex o tubo continuamente por um minuto ou até que a amostra esteja totalmente homogeneizada.
3. Aquecer a suspensão por 5 min a 70°C.
4. Vortex o tubo por 15 s e centrifugue a amostra a velocidade total por 1 min para partículas de pellet de fezes.
5. Pipetar 1,2 mL do SOBRENADANTE em um novo tubo de 2mL e descarte o pellet.
6. Adicionar 1 tablete de InhibitEX a cada amostra e vortex o tubo imediata e continuamente por 1 min ou até que o tablete esteja completamente suspenso. Incubar a suspensão por 1 min em temperatura ambiente para permitir os inibidores a adsorver a matriz InhibitEX.
7. Centrifugar a amostra a velocidade total por 3 min para os inibidores do pellet se ligarem a matriz InhibitEX.
8. Pipetar todo o sobrenadante em um novo tubo de 1,5 mL e descartar o pellet. Centrifugar a amostra a velocidade total por 3 min.
9. Pipetar 15 µL de proteinase K em um novo tubo de 1,5 mL.

10. Pipetar 200 μ L do sobrenadante do 8º passo no tubo contendo proteinase K.
11. Adicionar 200 μ L do tampão AL e vortex por 15 s.
12. Incubar por 10 min a 70°C. (pode centrifugar para remover as gotas da parede do tubo).
13. Adicionar 200 μ L de etanol (96-100%) ao lisado, e misture no vortex.
14. Etiquetar a parede de uma coluna giratória de QIAamp colocado em um tubo coletor. Cautelosamente aplique o lisado do passo 13 à coluna giratória de QIAamp sem misturar. Fechar a tampa e centrifugar à velocidade total por 1 min. Colocar a coluna giratória de QIAamp em um novo tubo coletor de 2 mL, e descartar o tubo contendo o filtrado. (fechar cada coluna para evitar formação de aerossol durante centrifugação. Se o lisado não passar completamente pela coluna após a centrifugação, centrifugar novamente até que a coluna giratória de QIAamp esteja vazia).
15. Cautelosamente abrir a coluna giratória de QIAamp e adicionar 500 μ L de tampão AW1. Fechar a tampa e centrifugar à velocidade total por 1 min. Colocar a coluna giratória de QIAamp em um novo tubo coletor de 2 mL, e descartar o tubo coletor contendo o filtrado.
16. Cautelosamente abrir a coluna giratória de QIAamp e adicionar 500 μ L de tampão AW2. Fechar a tampa e centrifugar à velocidade total por 3 min. Descartar o tubo coletor contendo o filtrado.
17. Recomendado: colocar a coluna giratória em um novo tubo coletor de 2 mL e descartar o tubo coletor antigo com o filtrado. Centrifugar à velocidade total por 1 min.
18. Transferir a coluna giratória de QIAamp a um novo e etiquetado tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Cautelosamente abrir a coluna giratória de QIAamp e pipetar 200 μ L de tampão AE diretamente na membrana de QIAamp. Fechar a tampa e incubar por 1 min à temperatura ambiente, então centrifugar à velocidade total por 1 min para eluir o DNA.

ANEXO VI

PROTOCOLO PARA AMPLIFICAÇÃO DE PCR

PROCEDIMENTO

- Agendar a câmara de fluxo 15 minutos antes.
- Calcular a solução de Mix DNTP 2,5mMol, para cada amostra é necessário:
 - Água MiliQ 14,4 μ L
 - Tampão PCR 2,5 μ L
 - MgCl₂ 2,0 μ L
 - DNTP 1,6 μ L
 - Primer A 1,5 μ L
 - Primer B 1,5 μ L
 - TAQ 0,5 μ L
 - Amostra 1,0 μ L
- Calcular cada item pelo número de amostras, mais um controle positivo, um negativo e um de erro.
- Pegar os reagentes no freezer de uso comum, e deixar a TAQ para pipetar na segunda capela.
- Apenas começar a pipetagem após o total descongelamento dos reagentes.
- Pipetar cada um dos reagentes a um novo tubo de 1,5mL.
- Identificar os tubos na segunda capela.
- Pegar a TAQ para adicioná-la ao mix apenas quando for começar a pipetagem das amostras (muito sensível).
- Pipetar 24 μ L do mix para cada amostra.
- Adicionar 1 μ L de amostra em tubo de 25 μ L, pipetar a amostra negativa (água miliQ) primeiro e a positiva por último.
- Pipetou tampou (evitar contaminação).
- Colocar as amostras para amplificar na termocicladora.

ANEXO VII

PROTOCOLO PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA PRODUTOS DE PCR

PROCEDIMENTO

- Preparar a forma do gel com luva para deixar na bancada do brometo.
- Pesar 10% do gel de agarose do volume a ser utilizado de TAEQ. Para a forma grande, usa-se 150mL de TAEQ 1x, então pesa-se 1,5g de gel.
- Aquecer a solução no microondas por aproximadamente 1 minuto. Mexer a cada 30 segundos. Se for necessário, aquecer por mais 30 segundos.
- Pipetar 2 μ L de brometo de etídio para cada 50mL de TAEQ.
- Misturar o gel ao brometo somente quando a temperatura do gel estiver morna.
- Colocar a mistura na forma.
- O gel ficará bom para uso em 30 minutos.
- Pegar o peso molecular e o loading blue no freezer de uso comum.
- Pipetar 3 μ L do loading blue para 1 μ L de peso molecular para cada fileira de poço.
- Pipetar 2 μ L de loading blue para cada amostra.
- Pipetar 10 μ L de cada amostra (amplicon) para misturar com o loading blue.
- Pipetar as amostras com loading blue para cada poço do gel.
- Deixar correr a 100v por 40 minutos.
- Visualizar o resultado em transiluminador ultravioleta.