

Juliana Saes Vilaça de Oliveira

ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO DA CEPA AUTÓCTONE DE *LAWSONIA*
INTRACELLULARIS IN VITRO
E SUA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

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

Área de Concentração: Patologia animal

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte 2012
Escola de Veterinária - UFMG

Dedico
A meus pais, pelo apoio eterno.

“Todos os animais são iguais, mas alguns são mais iguais que os outros.”

George Orwell, A Revolução dos Bichos.

Agradecimentos

Ao Professor Roberto Maurício Carvalho Guedes, meu orientador, pelos ensinamentos e pelo voto de confiança, mas principalmente pela paciência e tolerância. Espelharei-me em você na minha vida profissional.

À Professora Zélia Inês Portela Lobato, por me acolher em seu laboratório durante o primeiro ano de realização deste trabalho, por aceitar participar da banca avaliadora e contribuir para a melhoria do mesmo.

À Professora Andrea Micke Moreno, por participar da banca avaliadora deste trabalho e contribuir para a melhoria do mesmo.

Aos Professores Maristela Palhares, Roselene Ecco e Ernane Fagundes do Nascimento, pela grande contribuição para minha vida profissional.

Aos amigos dos Departamentos de Medicina Veterinária Preventiva e Patologia da Escola de Veterinária da UFMG, por me ajudarem a “apagar incêndios”.

À Grazielle Cossenzo, por fazer o possível e o impossível para me ajudar sempre que precisei.

À Sílvia França, pela caixa de artigos e o eterno carinho. Ana Luíza Vieira pelos almoços animados. Eliana Paladino, por me fazer rir. Michelle Gabardo, pelas fotos. Saira Neves, pela companhia nos fins de semana. Juliana Paniago, por me escutar sempre. Aline Viott, Fábio Vannucci e Cristiane Guimarães, pela amizade e pela paciência. Diego Hussin, pelo companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica, por me ensinarem a ensinar.

Aos amigos, por me escutarem nas horas difíceis e me fazerem rir quando eu queria chorar.

À minha família, por me incentivar a sempre seguir em frente.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, pelos pequenos gestos.

Aos veterinários de campo, por contribuírem enormemente para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e à Novartis, por financiarem este projeto.

Sumário

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 10 |
| INTRODUÇÃO..... | 12 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 13 |
| 2.1 ETIOLOGIA..... | 13 |
| 2.2 ISOLAMENTO E CULTIVO..... | 13 |
| 2.3 EPIDEMIOLOGIA..... | 14 |
| 2.4 PATOLOGIA..... | 14 |
| 2.5 SINAIS CLÍNICOS..... | 16 |
| 2.6 DIAGNÓSTICO..... | 16 |
| 2.7 RESPOSTA IMUNOLÓGICA..... | 18 |
| 2.8 PATOGÊNESE..... | 20 |
| 2.9 TRATAMENTO E CONTROLE..... | 21 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 22 |
| 3.1 RECEBIMENTO, AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE INTESTINOS..... | 22 |
| 3.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 23 |
| 3.3 ISOLAMENTO DE <i>L. INTRACELLULARIS</i> | 23 |
| 3.4 PROPAGAÇÃO DA INFECÇÃO..... | 24 |
| 3.5 PREPARO DAS PLACAS DE IPMA..... | 25 |
| 3.6 SOROLOGIA..... | 25 |
| 3.6.1 Amostras..... | 25 |
| 3.6.2 ELISA..... | 25 |
| 3.6.3 Imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA)..... | 26 |
| 3.6.4 Análise estatística..... | 26 |
| 4. RESULTADOS..... | 26 |
| 4.1 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS RECEBIDAS..... | 26 |
| 4.2 ISOLAMENTO DE <i>L. INTRACELLULARIS</i> | 27 |

| | |
|--|----|
| 4.3 SOROLOGIA..... | 29 |
| 4.3.1 Sensibilidade..... | 29 |
| 4.3.2 Associação entre ELISA e IPMA..... | 31 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 31 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 32 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |

Lista de anexos

ANEXO I - Descrição das amostras de intestinos recebidas para isolamento de uma cepa brasileira de *L. intracellularis*, no período de março de 2010 a outubro de 2011.

Lista de Figuras

Figura 1: Coloração por imunoperoxidase indireta da cepa PHE-UFG/BR2011 de *L. Intracellularis*.

Lista de Abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| AEC | 3-amino-9-etil-carbazol |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| cm | Unidade centímetro |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagles Media |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> |
| EP | Enteropatia proliferativa |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FBS | Soro fetal bovino |
| FISH | Hibridização in situ fluorescente |
| IEC-18 | Linhagem de células intestinais de rato |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IFAT | Teste de imunofluorescencia indireta |

| | |
|---------------|---|
| IHQ | imuno-histoquímica |
| IFN- γ | interferon-gama |
| IPMA | Imunoperoxidase em monocamada de células |
| KCl | Cloreto de potássio |
| LsaA | <i>Lawsonia surface antigen A</i> |
| MHC-II | Complexo de histocompatibilidade principal de classe II |
| ml | Unidade mililitro |
| μ l | Unidade microlitro |
| μ m | Unidade micrômetro |
| NE | Enterite necrótica |
| PBS | Solução salina fosfatada tamponada |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PHE | Enteropatia hemorrágica proliferativa |
| PIA | Adenomatose intestinal porcina |
| PRRS | <i>Porcine respiratory and reproductive syndrome</i> |
| rDNA | Ácido desoxirribonucléico ribossomal |

| | |
|------|--|
| RI | Ileíte regional |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| SPG | Solução de sacarose, fosfato e glutamato |
| TGE | Gastroenterite transmissível |
| VNTR | <i>Variable number of tandem repeats</i> |

Resumo

A partir de amostras de intestinos com suspeita de enteropatia proliferativa (EP), foi realizado o isolamento de uma cepa brasileira de *Lawsonia intracellularis*. O isolamento foi realizado a partir de uma amostra com lesões de enteropatia proliferativa hemorrágica suína (PHE), sendo a cepa propagada *in vitro* e caracterizada pela técnica de *variable number of tandem repeats* (VNTR) com um padrão genotípico distinto de outras já isoladas (15-09-15-09). Esta nova cepa foi utilizada para o preparo de placas de 96 orifícios para a realização de testes sorológicos de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA). Soros de 80 animais previamente inoculados com *L. intracellularis* foram utilizados para a realização dos testes sorológicos de ELISA e IPMA e cálculo de sensibilidade de ambos. O ELISA apresentou sensibilidade de 72,5%, abaixo do IPMA, com sensibilidade de 95%. Não houve associação estatística entre os dois testes. Em conclusão, realizou-se o isolamento e propagação da primeira cepa latino-americana de *L. intracellularis*, seguido da execução do teste sorológico de IPMA, com sensibilidade superior ao teste de ELISA.

Palavras-chave: Enteropatia proliferativa, isolamento, *Lawsonia intracellularis*, suíno, sorologia.

Abstract

Extraction and isolation attempts of a South American strain of the bacterium *Lawsonia intracellularis* were made from swine intestine samples with gross lesions suggestive of proliferative enteropathy. Isolation was successfully performed from a sample with lesions that were compatible with porcine proliferative haemorrhagic enteropathy (PHE). The strain was propagated *in vitro* and characterized as a different genotypic pattern than other isolates (15-09-15-09), by the variable number of tandem repeats (VNTR) technique. This new strain was used in the confection of 96 well plates for immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) serological tests. Sera collected from 80 animals previously inoculated with *L. intracellularis* were used in ELISA and IPMA serological tests, and their sensitivities were calculated based on the results. The ELISA test had a sensitivity of 72.5%, which was lower than the IPMA, with a 95% sensitivity. There was no statistical association between the two serological tests. In conclusion, the first Latin American strain of *L. intracellularis* was successfully isolated and propagated *in vitro*, which made possible the execution of the IPMA serological test, with a higher sensitivity than the commercial ELISA.

Key-words: Proliferative enteropathy, isolation, *Lawsonia intracellularis*, swine, serology.

1 - INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa (EP) é uma doença entérica causada pela bactéria intracelular obrigatória *Lawsonia intracellularis* (McOrist e Gebhart, 1999). Apesar de ser mais frequentemente descrita em suínos, equinos e hamsters, a doença já foi relatada em várias espécies, e estudos sorológicos em rebanhos suínos tem comprovado prevalências de até 100% em diversos países (Lawson e Gebhart, 2000; Dunser et al., 2000; van der Heijden et al., 2004; Holyoake et al., 2010).

A bactéria foi isolada e mantida *in vitro* pela primeira vez por Lawson et al. em 1993, a partir de intestinos de suínos afetados por enteropatia proliferativa, mas poucos laboratórios no mundo detém a técnica de isolamento, pois esta bactéria é um microrganismo fastidioso e provem de um ambiente altamente contaminado. O isolamento e a tipificação genética da primeira cepa brasileira da *L. intracellularis* são de extrema importância para a otimização do diagnóstico da EP no país, além de fornecer a possibilidade de realização de testes de concentração mínima inibitória de antimicrobianos, levando à redução do uso indiscriminado destes medicamentos.

São duas as formas clínicas da enteropatia proliferativa suína. A forma aguda da doença, conhecida como enteropatia proliferativa hemorrágica (PHE, do inglês *proliferative haemorrhagic enteropathy*) é caracterizada por aparecimento rápido de disenteria grave, com altos índices de mortalidade. Os suínos afetados geralmente vão a óbito dentro de 24 horas após o aparecimento dos sinais clínicos (McOrist e Gebhart, 1999). Os sinais clínicos da forma crônica são mais discretos e compreendem principalmente redução de ganho de peso, independente do fornecimento de alimento,

e diarreia transitória (McOrist e Gebhart, 1999).

Por não ser uma doença de sinais clínicos específicos, a EP não é facilmente diagnosticada sem o auxílio de exames complementares. Após a morte de animais com suspeita de EP, é possível o diagnóstico baseado em lesões macroscópicas, mas a confirmação através de exame histopatológico, imuno-histoquímica ou PCR é importante.

Para o diagnóstico da EP em animais vivos há três exames disponíveis: sorologia, coloração pela imunoperoxidase em esfregaços de fezes e reação em cadeia da polimerase (PCR) (McOrist e Gebhart, 1999; Lawson e Gebhart, 2000). A PCR é altamente específica, mas a sensibilidade é afetada por inibidores da reação presentes nas fezes e ainda representa um custo elevado para o produtor. Os testes sorológicos disponíveis atualmente para a identificação de IgG contra *L. intracellularis* incluem IFAT (*indirect fluorescent antibody test*), ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) e IPMA (*immunoperoxidase monolayer assay*), sendo que o ELISA é o único que está disponível na forma comercial. Entretanto, este teste tem custo elevado e processo de importação difícil.

A otimização de uma técnica sorológica de IPMA utilizando-se uma cepa brasileira da *L. intracellularis* será de grande importância para o monitoramento da EP em rebanhos suínos nacionais, fornecendo aos veterinários de campo uma alternativa de diagnóstico de custo mais baixo em relação ao teste comercial disponível.

Os objetivos desta dissertação incluem o isolamento e propagação *in vitro* de uma cepa brasileira da bactéria *L. intracellularis* e a validação de um teste sorológico de

IPMA utilizando essa cepa isolada como antígeno.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

A EP foi descrita por Biester e Schwarte em 1931 como um adenoma intestinal transmissível em suínos. Rowland e Rowntree descreveram em 1972 uma síndrome intestinal hemorrágica associada à adenomatose intestinal em um rebanho suíno, mas não se identificou o agente etiológico na ocasião. Em 1974, Rowland e Lawson visualizaram o agente etiológico da adenomatose intestinal suína através de imunofluorescência e microscopia eletrônica.

A bactéria foi isolada e mantida *in vitro* pela primeira vez por Lawson et al. em 1993, proveniente de intestinos de suínos afetados por enteropatia proliferativa. McOrist et al. (1993), reproduziram a doença com sucesso em suínos susceptíveis e reisolaram a bactéria, preenchendo os requisitos dos postulados de Koch.

Gebhart et al. (1993) classificaram o agente etiológico da EP como pertencente à subdivisão delta da classe Proteobacteria. A amplificação e sequenciamento do DNA ribossomal (rDNA) 16S revelaram que a bactéria pertencia a uma nova espécie, da família das desulfovibrionáceas, com morfologia e fisiologia distintas de outras espécies da mesma família, e a mesma foi denominada *L. intracellularis* (McOrist et al., 1995c).

As bactérias eliminadas dos hospedeiros ou de culturas de células são bastonetes curvos ou sigmóides, Gram-negativos, de 1,25 a 1,75 µm de comprimento e 0,25 a 0,43 µm de largura. A parede celular compreende um envelope externo trilaminar. Um flagelo único e unipolar foi observado por

microscopia eletrônica em isolados de cultura de tecido (Lawson e Gebhart, 2000).

O sequenciamento completo do genoma da *L. intracellularis* (Gebhart e Kapur, 2002) demonstrou que ela contém um cromossomo pequeno (1,45Mb) e três plasmídeos, e gera energia por metabolismo respiratório.

Recentemente foram identificadas sequências múltiplas de VNTR (*variable number of tandem repeats*) no genoma da *L. intracellularis*. Essas sequências são úteis na identificação de diferentes cepas da bactéria isoladas de amostras de campo (Gebhart e Guedes, 2010).

2.2 ISOLAMENTO E CULTIVO

O isolamento e o cultivo da *L. intracellularis* são extremamente dispendiosos por ser ela um organismo intracelular obrigatório fastidioso e proveniente de um ambiente altamente contaminado. O primeiro relato de isolamento da bactéria foi feito por Stills (1991), no qual o organismo foi isolado de intestinos de hamsters apresentando lesões de EP induzidas experimentalmente. Apenas décadas após a primeira descrição da doença, Lawson et al. (1993) conseguiram isolar e propagar a bactéria *in vitro* pela primeira vez, utilizando uma linhagem de enterócitos de ratos (IEC-18) e um ambiente constituído de 82,2% de nitrogênio, 8,8% de dióxido de carbono e 8% de oxigênio. A propagação da infecção foi realizada com protocolo de lise celular com solução hipotônica de KCl, e o monitoramento da mesma com imunofluorescência ou imunoperoxidase indireta, utilizando anticorpo monoclonal como anticorpo primário (Lawson et al., 1993).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A EP é uma doença largamente difundida em propriedades produtoras de suínos de todo o mundo, com prevalências variando de 30% até 100% (Chang et al., 1997; Kim et al., 1998; Pozo et al., 1998; Takghashi et al., 1998; Chiriboga et al., 1999; Stege et al., 2000; Lee et al., 2001; Holyoake et al., 2010). Entre rebanhos suínos, estudos sorológicos têm demonstrado prevalências de até 100% em diferentes países (Lawson e Gebhart, 2000; Dunser et al., 2000; van der Heijden et al., 2004; Holyoake et al., 2010).

Apesar de ser mais frequentemente descrita em suínos, equinos e hamsters, a doença já foi relatada em várias espécies, incluindo cobaio (Elwell et al., 1981), rato (Vandenberghe et al., 1985), furão (Fox e Lawson, 1988), raposa (Erickson et al., 1990), cão (Leblanc et al., 1993), coelho (Hotchkiss et al., 1996), avestruz (Cooper et al., 1997), macaco-rhesus (Klein et al., 1999), camundongo (Smith et al., 2000), bovino, porco espinho e girafa (Herbst et al., 2003).

Guimarães-Ladeira et al. (2009) descreveram casos de EP em equinos na região metropolitana de Belo Horizonte, diagnosticados por métodos sorológicos e reação em cadeia da polimerase (PCR).

Em humanos, Michalski et al. (2006) comprovaram que não há associação da *L. intracellularis* com a doença inflamatória intestinal, e Jacobson et al. (2007) não encontraram a bactéria em um estudo feito em crianças habitantes de propriedades suinícolas na Europa.

A transmissão da doença é oro-fecal (Jordan et al., 2004), e a eliminação da bactéria nas fezes de suínos foi inicialmente detectada com uma semana pós infecção e durou, de forma intermitente, por até 12 semanas (Guedes e Gebhart, 2003a). Suínos

que apresentam a forma subclínica da doença não manifestam sintomas de diarreia, mas são fontes importantes de infecção para o resto do rebanho (Guedes e Gebhart, 2003b).

Friedman et al. (2008) detectaram a presença da *L. intracellularis* em membranas mucosas intestinais de roedores provenientes de propriedades suinícolas através da técnica de “nested PCR” e sugerem que estes animais podem constituir reservatórios da EP e ser fontes de infecção para suínos susceptíveis. Collins et al. (2011) demonstraram através de PCR quantitativa em tempo real que ratos e camundongos experimentalmente infectados eliminaram a bactéria nas fezes durante 14 a 21 dias, demonstrando que estes roedores são potenciais fontes de transmissão para suínos.

Segundo Collins et al. (2000), a *L. intracellularis* pode sobreviver em condições extracelulares e permanecer infectante por até duas semanas à temperatura ambiente. Smith et al. (1998) citaram utilização de pisos ripados em baias de leitões pós desmame como um fator de risco para a disseminação da bactéria, devido a higienização incompleta. Animais de reposição também foram identificados como fontes de infecção. No mesmo estudo, dieta, sistema de fornecimento de água e tipo de construção não foram identificados como fatores de risco. Molbak et al. (2008), entretanto, relataram que uma dieta não peletizada pareceu reduzir o número de *L. intracellularis* na microbiota total do íleo, apesar de o número de animais afetados não ter sido alterado.

2.4 PATOLOGIA

Segundo Cooper e Gebhart (1998), as lesões macroscópicas da EP nem sempre são vistas à necropsia. As lesões são similares em todas as espécies afetadas,

mas a localização pode variar. Há relatos de lesões no estômago e íleo de cães (Leblanc et al., 1993), íleo de equinos (Williams et al., 1996), ovinos (Vandenberghe e Hoorens, 1980), cobaios (Muto et al., 1983), coelhos (Hotchkiss et al., 1996), hamsters (Frisk et al., 1977) e suínos (Rowland e Lawson, 1992) e no cólon de raposas (Erikson et al., 1990), ratos (Vandenberghe et al., 1985), furões (Fox e Lawson, 1988) e suínos (Ward e Winkelman, 1990), cloacas de emus (LeMarchand et al., 1997) e ceco e reto de suínos (Guedes e Gebhart, 2004).

A forma aguda da doença, conhecida como enteropatia proliferativa hemorrágica (PHE, do inglês *proliferative haemorrhagic enteropathy*) é caracterizada por aparecimento rápido de disenteria grave, com altos índices de mortalidade. Os suínos afetados geralmente vão a óbito dentro de 24 horas após o aparecimento dos sinais clínicos. A mucosa do íleo terminal está extremamente espessada e corrugada e o lúmen encontra-se repleto de sangue. As lesões incluem edema do mesentério adjacente à porção afetada do íleo e efusão intraperitoneal abundante. O lúmen do intestino contém fluido sanguinolento e a mucosa apresenta hiperemia difusa. Após aproximadamente 12 horas do aparecimento dos sinais clínicos, a mucosa apresenta-se coberta por uma membrana fibrinosa que sobrepõe coágulos sanguíneos frescos. Esta condição progride até que com 24 horas o lúmen intestinal fique preenchido com sangue, e uma camada de fibrina e restos celulares recubra todo o epitélio. As alterações histológicas são restritas à mucosa da região afetada. Há acúmulo extensivo de fluido proteináceo no interstício e nos vasos linfáticos da lâmina própria nas extremidades das vilosidades, com hemorragia discreta e infiltrado inflamatório acentuado. Após 24 horas, o número de células inflamatórias diminui significativamente, mas a congestão e a hemorragia aumentam extensivamente e

ocorre hemorragia no lúmen intestinal. Observam-se também criptas de Lieberkühn revestidas por um epitélio hiperplásico e pouco diferenciado. A coloração de Warthin-Starry demonstra a presença de bactérias no citoplasma apical de células epiteliais, dentro de vasos e livres no interstício da lâmina própria e da submucosa. Os organismos são mais abundantes onde há menos hemorragia e exsudação aparentes (Rowland e Rowtree, 1972; Rowland e Lawson, 1975; Love e Love, 1979).

A adenomatose intestinal porcina, PIA, do inglês *porcine intestinal adenomatosis*, é a manifestação crônica e mais comum da EP. No suíno, as lesões mais comuns ocorrem no íleo, e mais raramente, no cólon. As áreas afetadas apresentam edema multifocal na túnica serosa e focos de necrose na superfície da mucosa, que encontra-se espessada. Em casos mais brandos, o espessamento da mucosa ocorre na forma de pequenas áreas mais elevadas e opacas, entremeadas por um epitélio normal. À medida em que ocorre agravamento da doença, as lesões se tornam coalescentes e surge uma superfície irregular, nodular ou corrugada. No cólon as lesões podem se assemelhar às do íleo ou se apresentar como nódulos polipóides de tamanhos variados. Histologicamente observa-se que o espessamento da mucosa se deve à expansão e alongamento das criptas de Lieberkühn. Estas criptas alteradas são caracterizadas por células epiteliais proliferadas, com núcleos vesiculares ou alongados. Figuras de mitose são frequentes e há ausência de células calciformes, resultado da não diferenciação celular do epitélio. As criptas proliferadas podem se ramificar e se estender até a superfície da mucosa, substituindo as vilosidades normais do epitélio. Não há ocorrência de infiltrado inflamatório significativo nesta forma da doença (Rowland e Rowtree, 1972; Lawson e Gebhart, 2000). As células proliferadas se encontram muitas vezes

restritas à camada superficial da mucosa, mas ocasionalmente podem penetrar a lâmina própria ou a muscularis mucosae. Nestes locais as células não formam glândulas verdadeiras, mas sim cordões de células infiltrativas (Roberts et al., 1980; Lawson e Gebhart, 2000). Os linfonodos mesentéricos raramente apresentam alterações específicas, mas Roberts et al. (1980) relataram linfonodos contendo estrutura similar àquela das lesões intestinais, com bactérias intracelulares.

Segundo Lawson e Gebhart (2000), as duas formas restantes de manifestação da doença, enterite necrótica (NE, do inglês *necrotic enteritis*) e ileíte regional (RI, do inglês *regional ileitis*) ocorrem após uma lesão proliferativa ser atingida por uma nova agressão. NE é uma necrose de coagulação extensiva do epitélio que resulta em óbito rapidamente, e RI ocorre em animais que sobreviveram a um episódio de NE. A mucosa lesada é substituída por tecido de granulação, com hipertrofia das camadas musculares e resultando em um espessamento acentuado da parede intestinal, e o intestino afetado toma a forma de uma “mangueira de jardim”.

2.5 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da EP crônica são mais frequentemente observados em leitões pós desmama, com idades entre 6 e 20 semanas. Os sinais são discretos, e compreendem principalmente dificuldade de ganho de peso, independente do fornecimento de alimento. Em alguns animais pode haver anorexia, com curiosidade em relação à comida, mas recusa em se alimentar. O comportamento varia de clinicamente normal a apático e não responsivo. Quando presente, a diarreia é moderada, com fezes amolecidas, mas de coloração normal. Quando há suspeita de EP em um rebanho, deve-se procurar animais com dificuldade de ganho de peso, anorexia e diarreia

intermitente (McOrist e Gebhart, 1999). Ward e Winkelman (1990) observaram que 15% dos animais afetados se encontram magros, desidratados, e com a pelagem seca e sem brilho.

Os casos de EP aguda hemorrágica ocorrem com mais frequência em animais de 4 a 12 meses de idade. Esta manifestação da doença ocorre de forma repentina, sem uma fase prodrômica (Ward e Winkelman, 1990). O quadro clínico é de anemia aguda. Fezes enegrecidas ou sanguinolentas representam o primeiro sinal clínico, podendo ser de consistência normal, amolecida, ou aquosa. A região perineal pode estar suja de sangue ou fezes. Alguns animais, entretanto, vão a óbito sem apresentarem anormalidades nas fezes, somente uma leve palidez corporal. O exame *post mortem* destes animais revela as lesões hemorrágicas da doença na região do íleo e do cólon. A mortalidade entre os animais que apresentam sintomatologia clínica é de 50%, e dos que sobrevivem, alguns se recuperam rapidamente, sem grande perda de peso corporal e outros apresentam retardo no crescimento. Fêmeas gestantes que apresentam sinais clínicos podem abortar dentro de até 6 dias após o início do aparecimento da sintomatologia clínica (Ward e Winkelman, 1990; McOrist e Gebhart, 1999).

2.6 DIAGNÓSTICO

Por não ser uma doença de sinais clínicos específicos, a EP não é facilmente diagnosticada sem exames complementares. São várias as doenças que cursam com os mesmos sinais clínicos, incluindo gastroenterite transmissível enzoótica (TGE, do inglês *transmissible gastroenteritis*), espiroquetose colônica (*Brachyspira pilosicoli*), disenteria suína (*B. hyodysenteriae*), salmonelose (*Salmonella enterica* sorovar Typhimurium), ou hipersensibilidade à soja (Stevenson, 2001).

Ocasionalmente é possível fazer o diagnóstico através de lesões macroscópicas, mas a confirmação através de exame histopatológico, imunohistoquímica (IHQ) ou PCR é indispensável. Em cortes de coloração pela hematoxilina e eosina é possível identificar lesões graves de proliferação de enterócitos, mas para a visualização do agente etiológico são necessárias colorações especiais, como as de Warthin-Starry e Ziehl-Neelsen, que são inespecíficas, ou IHQ, considerado o padrão ouro para diagnóstico da bactéria em cortes histológicos (Guedes et al., 2002d; Ladinig et al., 2009). No passado, Rowland e Lawson (1974) relataram a primeira visualização da *L. intracellularis* associada a lesões de EP, através de imunofluorescência e microscopia eletrônica. Guedes e Gebhart (2003b) desenvolveram anticorpos monoclonais e policlonais contra a *L. intracellularis*, possibilitando mais uma ferramenta de diagnóstico de alta validade e baixo custo. Uma sonda fluorescente de oligonucleotídeos para RNA ribossomal foi desenvolvida em 1998 por Boye et al. e utilizada com sucesso na técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH, do inglês *fluorescent in situ hybridization*) em tecidos fixados em formol. Entretanto, esta técnica, assim como o exame histopatológico e a IHQ, só pode ser realizada após a morte do animal.

Jones et al. (1993) desenvolveram dois pares de “*primers*” específicos para a identificação da *L. intracellularis* através da técnica de “*nested*” PCR. A extração de DNA das fezes de suínos foi realizada pelo método do tiocianato de guanidina, e a amplificação dos fragmentos de DNA pela PCR se provou uma técnica sensível e específica para o diagnóstico da bactéria nas fezes.

Knittel et al. (1998) avaliaram e compararam exames sorológicos e de PCR e concluíram que testes de

imunofluorescência indireta são mais sensíveis que a PCR, uma vez que a eliminação da bactéria nas fezes não é contínua, mas sim intermitente.

Para o diagnóstico da EP em animais vivos há três testes disponíveis: sorologia, coloração pela imunoperoxidase em esfregaços de fezes e PCR (McOrist e Gebhart, 1999; Lawson e Gebhart, 2000). Os testes sorológicos disponíveis atualmente para a identificação de IgG contra *L. intracellularis* incluem IFAT (*indirect fluorescent antibody test*), ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) e IPMA (*immunoperoxidase monolayer assay*). A limitação dos testes sorológicos atuais é a necessidade de manutenção da bactéria *in vitro* como fonte de antígeno, e apenas alguns laboratórios conseguiram propagar a *L. intracellularis in vitro* com sucesso. (Guedes et al., 2002c).

Enquanto a PCR é indicada para a detecção de eliminação de bactérias nas fezes de animais infectados, a sorologia determina se houve contato prévio do animal com o antígeno da *L. intracellularis*. Segundo Guedes et al. (2002b) a sorologia tem sido usada como uma ferramenta de diagnóstico fácil e de baixo custo para avaliar o status de sanidade e a epidemiologia de diversos agentes infecciosos em sistemas de produção de suínos. Assim, os testes sorológicos fornecem informações relevantes para a otimização do uso de vacinas e antimicrobianos em propriedades suinícolas.

Segundo Walter et al. (2004), o uso apropriado dos testes sorológicos para *L. intracellularis* é relevante para a confirmação da necessidade de vacinação e para um melhor planejamento de protocolos de profilaxia.

Vários tipos de ELISA foram descritos na literatura. Estes incluem ELISAs que empregam antígenos de célula inteira

sonicada (Holyoake et al., 1994), LPS-ELISA indireto (Kroll et al., 2005), e um ELISA de bloqueio, que está comercialmente disponível. Este último apresentou uma sensibilidade de 96,5% e uma especificidade de 98,7% (Keller et al., 2006). Dentre as vantagens do ELISA estão a alta confiabilidade e a possibilidade de automação, mas este teste exige a aquisição de kits comerciais e de um fotômetro leitor de ELISA, que tem custo relativamente elevado.

O ensaio da imunoperoxidase em monocamada de células, IPMA, é um imunoensaio enzimático frequentemente utilizado para o diagnóstico de infecções virais como a síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRS, do inglês *porcine respiratory and reproductive syndrome*), (Nodelijk et al., 1996). Após o isolamento e a propagação da *L. intracellularis* por Lawson et al. (1993), verificou-se que monocamadas de células infectadas pela bactéria poderiam ser utilizadas para a realização de testes sorológicos com a técnica da IPMA. Guedes et al. (2002a) obtiveram uma concordância de 98,6% entre os testes de imunofluorescência indireta e IPMA no diagnóstico da EP em suínos experimentalmente infectados, demonstrando que a sorologia é um método de alta acurácia para identificação de contato prévio com a bactéria. O teste de IPMA foi validado por Guedes et al. (2002b) com especificidade de 100% e sensibilidade próxima de 90%, e é desde então considerado um teste apropriado de triagem para diagnóstico da EP.

Ao contrário da IFAT em lâmina de vidro, as placas de IPMA podem ser examinadas em um microscópio óptico invertido. Além disso, a coloração do IPMA permanece estável por vários meses, sendo possível armazenar os resultados para o caso de dúvidas posteriores. Outra vantagem do IPMA em relação à IFAT em lâminas é a possibilidade de visualizar bactérias intra-

extracelulares, enquanto na IFAT os agrupamentos fluorescentes de bactérias são vistos somente dentro do citoplasma das células (Guedes et al., 2002a).

2.7 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A primeira tentativa de avaliar a resposta imune contra a *L. intracellularis* foi relatada por Jacoby (1978), em um estudo que demonstrou que os soros de hamsters com lesões graves de EP reconheciam organismos intracelulares em fragmentos de tecidos afetados e examinados pela imunofluorescência indireta.

Em suínos, um teste semelhante foi desenvolvido por Lawson et al. (1988), no qual detectou-se que os anticorpos produzidos por animais em crescimento eram constituídos primariamente por IgM, e que a maioria dos animais que apresentavam lesões demonstravam uma resposta humoral. Os animais apresentaram soroconversão durante o período de queda na taxa de crescimento, e os anticorpos foram detectados por até 2 meses após a infecção. Resultados semelhantes foram obtidos com animais apresentando lesões de PHE.

Holyoake et al. (1994) reportaram concentrações decrescentes de IgG materno em leitões de 3 semanas de idade e soroconversão entre 7 e 24 semanas de idade. Guedes et al. (2002d) relataram imunidade passiva em leitões provenientes de porcas soropositivas por até 5 semanas de idade, e não houve detecção de soroconversão antes de 16 semanas de idade. Em um estudo longitudinal, Stege et al. (2004) observaram que a soroconversão ocorreu duas semanas após o início da eliminação da bactéria nas fezes, e uma vez que houve a soroconversão, os animais permaneceram soropositivos até a idade do abate.

A possibilidade de animais previamente infectados pela bactéria desenvolverem uma resposta imune adequada contra uma segunda infecção foi levantada por Love et al. (1977a), após dois surtos consecutivos da EP em uma mesma propriedade. Os animais que sobreviveram ao primeiro surto não desenvolveram sinais clínicos após o segundo.

Collins e Love (2007) infectaram suínos susceptíveis experimentalmente, e após cessada a detecção de bactérias nas fezes destes animais, os mesmos foram re-inoculados. Observou-se que estes animais não eliminaram nas fezes números detectáveis de *L. intracellularis* e não desenvolveram sinais clínicos da doença após a segunda inoculação. Sugeriu-se então que a ausência de *L. intracellularis* nas fezes era um indicativo de que as bactérias haviam sido inativadas antes de entrarem e colonizarem os enterócitos. Riber et al. (2011) inocularam suínos de 5 a 6 semanas de idade com a bactéria, trataram os animais até a resolução da infecção primária e então os re-inocularam entre 12 e 13 semanas de idade. Estes animais não eliminaram quantidades detectáveis de *L. intracellularis* nas fezes, não apresentaram alterações nos níveis de proteínas de fase aguda, e não demonstraram presença de bactérias na mucosa intestinal à IHQ.

Guedes et al. (2002d) observaram que após um surto de PHE em uma propriedade, níveis de anticorpos foram detectados em marrãs por até 3 meses, e inicialmente alguns animais apresentaram títulos de até 1:1920 de IgG detectados por IPMA. Nesta mesma propriedade, a eliminação intermitente de *L. intracellularis* nas fezes de animais de recria e terminação foi detectada por até 12 semanas após a primeira observação na PCR, e estes resultados indicam que animais aparentemente saudáveis podem eliminar a bactéria por longos períodos e ser fonte de infecção para suínos susceptíveis. Guedes e

Gebhart (2003a) obtiveram animais soropositivos por até 13 semanas após inoculação com uma cepa patogênica ou com uma cepa vacinal.

Sabe-se que sendo a *L. intracellularis* um organismo intracelular obrigatório que infecta células epiteliais intestinais, o IgG produzido não é eficiente na proteção contra infecção, enquanto altos títulos de IgA e uma resposta imune celular eficiente podem ter ações relevantes. Smith et al. (2000) verificaram que em modelos de infecção pela *L. intracellularis* em camundongos, animais *knockout* para receptores de interferon-gama (IFN- γ) desenvolveram infecções substancialmente mais altas que animais *wild type*. Guedes e Gebhart (2003a) chegaram também à conclusão de que o IFN- γ tem um papel importante na limitação da infecção e da proliferação celular causada pela *L. intracellularis*. MacIntyre et al. (2003) inocularam suínos de 7 semanas de idade com uma cultura pura de *L. intracellularis* e pesquisaram a resposta de linfócitos T CD3, CD4 e CD8, além de linfócitos B, macrófagos e complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II). Os resultados obtidos indicaram uma redução nos níveis de linfócitos B, linfócitos T CD8 associados ao epitélio das vilosidades e, conseqüentemente, uma redução dos linfócitos T CD3 associados ao epitélio. Os níveis de linfócitos T CD4 permaneceram inalterados. Uma redução nos números de linfócitos T CD8 significa maior dificuldade de o hospedeiro preparar uma resposta celular eficiente contra patógenos intracelulares, e concluiu-se que a *L. intracellularis* opera com um mecanismo imunossupressor.

Guedes e Gebhart (2010) detectaram a presença de IgA específico contra *L. Intracellularis* em lavados de mucosa intestinal de suínos infectados entre os dias 15 e 29 pós infecção, demonstrando uma

meia vida mais curta que a do IgG da resposta sistêmica.

Com o desenvolvimento e a popularização de novas técnicas moleculares, mais detalhes serão esclarecidos sobre a resposta imunológica dos diversos hospedeiros contra o agente etiológico da EP.

2.8 PATOGÊNESE

Pouco se sabe sobre a patogênese da EP e da interação da *L. intracellularis* com as células epiteliais dos hospedeiros de diferentes espécies. O mecanismo patogênico mais importante é a invasão de enterócitos e indução de hiperplasia nos mesmos (Lawson e Gebhart, 2000). Entretanto, não é esclarecido ainda o mecanismo pelo qual a bactéria induz a proliferação dos enterócitos. A adesão e a entrada da bactéria em enterócitos ocorre na superfície apical dos mesmos, e há requerimento de interação bactéria-hospedeiro. Apenas 3 horas após o primeiro contato das bactérias com culturas de enterócitos *in vitro*, as mesmas foram visualizadas em vacúolos intracitoplasmáticos delimitados por membranas. Neste mesmo período já é possível observar ruptura das membranas vacuolares e liberação de bactérias livres no citoplasma das células infectadas. De 2 a 6 dias após a inoculação foi possível observar multiplicação de organismos livres, e após 6 dias, a ocorrência de grupos de bactérias em protrusões balonosas citoplasmáticas, e liberação de bactérias para o ambiente extra-celular (McOrist et al., 1995b).

Em outro estudo *in vitro*, Lawson et al. (1995) relataram que a infecção de células susceptíveis não depende da viabilidade da bactéria, uma vez que bactérias vivas, tratadas com oxigênio ou neomicina, ou mortas e formolizadas foram internalizadas por células viáveis. A inibição do processo de entrada pela citochalasin D indicou que a infecção é dependente de polimerização

da actina, ou seja, da viabilidade da célula hospedeira.

Em um estudo de patogênese, Boutrup et al. (2010) detectaram, através de IHQ, a presença de bactérias 12 horas pós infecção em células epiteliais dos topos das vilosidades de suínos experimentalmente infectados, e na lâmina própria das mesmas. Na lâmina própria a maioria das bactérias parecia ter uma localização intracelular, mas pequenos focos de bactérias livres isoladas foram visualizados. Aos 5 dias pós infecção, as bactérias eram vistas principalmente nas junções vilosidade-cripta e na lâmina própria adjacente a essas áreas, o que poderia ser explicado pela migração de células epiteliais das criptas infectadas em conjunção com novas bactérias penetrando na mucosa.

O tropismo da *L. intracellularis* por células imaturas das criptas pode ser um reflexo dos requerimentos fisiológicos do microrganismo. Estas células se dividem e migram para habitar o epitélio, e o crescimento contínuo das células infectadas é o mecanismo pelo qual o epitélio é colonizado pela bactéria. A ausência de bactérias na superfície celular, ou a não visualização de transferência de bactérias entre células indica que as bactérias se movem no epitélio dentro dos enterócitos. Logo, enterócitos em divisão beneficiam a proliferação da *L. intracellularis* através de sua contínua replicação e migração e facilitam a colonização do epitélio pela bactéria (Smith e Lawson, 2001).

McCluskey et al. (2002) identificaram pela primeira vez uma molécula de superfície da *L. intracellularis* que pode ter um papel no início da infecção. A LsaA (do inglês *Lawsonia surface antigen A*) estaria envolvida na aderência à célula hospedeira e à invasão da mesma.

Smith e Lawson (2001) sugeriram que a persistência da *L. intracellularis* poderia ser

facilitada pela ausência de inflamação significativa e por uma resposta imunológica limitada. A localização intracelular da bactéria pode representar um privilégio imunológico, uma vez que facilita a evasão do sistema imune do hospedeiro. MacIntyre et al. (2003) detectaram redução da expressão de MHC-II por células epiteliais infectadas, o que leva a uma redução da apresentação de antígeno às células T e, conseqüentemente, imunossupressão do hospedeiro e favorecimento da bactéria.

McOrist et al. (1993) obtiveram sucesso ao reproduzir a doença em suínos que possuíam microbiotas intestinais normais, mas não em animais gnotobióticos, o que pode significar que a flora intestinal pode modificar a habilidade da *L. intracellularis* colonizar o trato intestinal e causar lesões proliferativas. Co-infecções entre *L. intracellularis* e outros patógenos já foram descritas em suínos convencionais (Elder et al., 1997), e sugere-se que a presença de um patógeno possa modificar a resposta imune e predispor o animal à infecção pelo outro (Gebhart e Guedes, 2010).

Guedes (2002) observou que criptas infectadas e hiperplásicas do íleo possuíam números significativamente mais altos de células apoptóticas do que criptas normais, comprovando que a proliferação celular característica da EP não está relacionada com redução da apoptose.

Estudos morfológicos realizados em hamsters e suínos indicam que a hiperplasia dos enterócitos é precedida pela presença da *L. intracellularis* (Jacoby, 1978; Johnson e Jacoby, 1978; Guedes, 2002). O início da hiperplasia associada à EP ocorre simultaneamente ao aumento no número de *L. intracellularis* presentes em enterócitos. Da mesma forma, a resolução das lesões está relacionada ao desaparecimento da bactéria do epitélio atingido (Lawson e Gebhart, 2000).

Antígeno da *L. intracellularis* no intestino de suínos experimentalmente inoculados foi observado de 3 a 5 dias pós infecção. Lesões microscópicas foram visíveis a partir de 11 dias pós infecção, e lesões macroscópicas, a partir de 12 dias. A partir do dia 29 não houve mais detecção de lesões, apesar de haver marcação positiva de antígeno pela IHQ. Não houve detecção de antígeno fora do intestino, linfonodos e tonsilas, e aparentemente a infecção é limitada a enterócitos, sendo que antígenos encontrados na lâmina própria e linfonodos mesentéricos foram carreados por macrófagos. Pode haver infecção dos enterócitos do intestino grosso e do reto em um curso mais adiantado da doença. O intestino delgado aparentemente é infectado antes, e as bactérias liberadas deste local colonizam as porções mais aborais do trato gastrointestinal (Gebhart e Guedes, 2010).

2.9 TRATAMENTO E CONTROLE

Love e Love (1977b) foram os primeiros a sugerir uma forma de controle para a EP em um rebanho suíno. Sugeriram-se medidas baseadas em estudos epidemiológicos da doença. Essas medidas envolviam a introdução de animais em baias isoladas durante 21 dias antes de haver contato com suínos susceptíveis da granja e o fornecimento de medicação à base de clortetraciclina aos mesmos. Estas medidas levaram a uma redução da incidência de PHE na propriedade estudada.

Segundo McOrist (2000), aminoglicosídeos geralmente demonstram pouca penetração intracelular, enquanto macrolídeos e azolidas apresentam altas concentrações no compartimento intracelular. Essas altas concentrações podem explicar a eficácia dos macrolídeos contra bactérias Gram-negativas intracelulares fagocitadas. McOrist et al. (1995a) e McOrist e Gebhart (1995) demonstraram a eficácia *in vivo* de macrolídeos (eritromicina e tilosina), tetraciclina, pleuromulinas (tiamulina),

penicilinas e fluoroquinolonas contra a *L. intracellularis*, enquanto aminoglicosídeos e aminociclitóis (neomicina, gentamicina e apramicina) se mostraram fracamente eficazes, sendo a bactéria altamente resistente. Guedes et al., (2009) reportaram susceptibilidade da bactéria à tilvalosina incorporada à ração na dose de 50 ppm.

Os protocolos de medicação variam de acordo com a idade e a variedade de suínos atingidos. O tratamento de EP aguda em rebanhos de reposição deve incluir animais clinicamente afetados e animais em contato com os mesmos, o que pode significar todo o rebanho. Sugere-se o uso de tiamulina (120 ppm), tilosina (100 ppm), ou clortetraciclina (400 ppm) durante 14 dias, por via oral diluídos em água ou na ração, ou em aplicações intramusculares, que são menos práticas. Animais de reposição susceptíveis que serão introduzidos em um rebanho endêmico para EP devem sofrer um período de exposição seguido de tratamento com tiamulina (120 ppm), tilosina (100 ppm), lincomicina (110 ppm), ou clortetraciclina (300 ppm) durante 14 dias, diluídos na ração (McOrist e Gebhart, 1999).

Em um estudo feito *in vitro* com cepas norte americanas e europeias da bactéria, Wattanaphansak et al. (2009) relataram que carbadox, tiamulina e valnemulina foram os antibióticos mais ativos, clortetraciclina e tilosina intermediariamente ativos, e lincomicina pouco ativa contra *L. intracellularis*.

O desenvolvimento de uma vacina viva atenuada contra *L. intracellularis* (Enterisol® Ileitis, Boehringer Ingelheim Vetmedica) proporcionou uma nova alternativa para a prevenção e o controle da EP em rebanhos suínos (Guedes, 2002). Knittel et al., (2000) e Roof, (2001) relataram que a vacina foi segura e eficaz na prevenção de infecção em um

experimento de inoculação de animais com cultura pura de *L. intracellularis*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 RECEBIMENTO, AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE INTESTINO

Fragmentos de intestinos de suínos foram enviados por veterinários de granjas que realizaram necropsias em animais com sinais clínicos indicativos de EP e que apresentaram lesões macroscópicas características da doença. Imediatamente após a chegada dos fragmentos, os mesmos foram avaliados para detecção de lesões e de alterações autolíticas. A avaliação macroscópica foi realizada segundo os critérios estabelecidos por Guedes et al. (2002c): SLA – intestino sem lesões aparentes; Grau 1 - hiperemia e edema moderados de mesentério e parede intestinal; Grau 2 - hiperemia e edema moderados de mesentério e parede intestinal, acrescidos de mucosa corrugada; Grau 3 - hiperemia e edema acentuados de mesentério e parede intestinal, necrose da superfície mucosa, com formação de membranas pseudodiftéricas (enterite necrótica); Grau 4 - hiperemia e edema acentuados de mesentério e parede intestinal, mucosa espessa e corrugada, coágulos sanguíneos no lúmen intestinal.

Em seguida, fragmentos de até 3cmx3cm foram coletados e colocados em solução de formol tamponado a 10% para avaliação histológica e IHQ. Cerca de cinco centímetros da mucosa afetada foram também coletados em embalagens estéreis para armazenamento a -80°C para processamento posterior.

3.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IHQ

Os fragmentos previamente fixados em solução tamponada de formol a 10% foram processados pela técnica de rotina com inclusão em parafina e corados pela técnica histológica de hematoxilina e eosina (HE) (Luna, 1968). A avaliação histológica foi realizada segundo os seguintes critérios: SLA – fragmento de intestino sem alterações dignas de nota; Grau 1 – fragmento com criptas hiperplásicas isoladas; Grau 2 - até 25% de criptas hiperplásicas no fragmento observado; Grau 3 - entre 26% e 75% de criptas hiperplásicas; Grau 4 - acima de 75% das criptas hiperplásicas.

Os mesmos fragmentos foram submetidos à técnica de IHQ utilizando anticorpo policlonal específico anti-*L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003b), na diluição de 1:30.000, pelo método da estreptavidina-biotina marcada com peroxidase (Dako, Corporation, LSAB+, cat. K0690) e solução de cromógeno AEC (3-amino-9-etil-carbazol). A marcação pela IHQ foi graduada em escala de 0 a 4, sendo: Grau 0 - nenhuma marcação antigênica de *L. intracellularis*; Grau 1 - até 25% da mucosa intestinal com marcação; Grau 2 - de 25 a 50% da mucosa marcada; Grau 3 - de 50 a 75% da mucosa marcada; Grau 4 - acima de 75% da mucosa com marcação antigênica (Guedes, 2002; França, 2007).

Amostras apresentando graus 0 e 1 de marcação antigênica, bem como amostras autolisadas à histologia foram descartadas.

3.3 ISOLAMENTO E CULTIVO DE *L. INTRACELLULARIS*

O processo de isolamento de cepa brasileira de *L. intracellularis* foi baseado nos trabalhos de Lawson et al. (1993) e Guedes e Gebhart (2003a). Brevemente, fragmentos correspondentes aos casos que apresentaram marcação positiva acima de grau 2 pela IHQ foram descongelados em água morna e raspados com lâmina de vidro espessa em uma placa de Petri, até que toda a mucosa fosse retirada e separada da serosa. A mucosa foi homogeneizada em solução estéril de sucrose-potássio-glutamato e soro fetal bovino a 10% (SPG-FBS 10%) e macerada com um triturador de tecidos. Após uma nova homogeneização, o macerado foi filtrado em filtros de 5µm e 0,8 µm de porosidade. Após a filtração seriada, as amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 25 minutos em rotor de ângulo fixo e o sobrenadante foi descartado. Em seguida ressuspendeu-se o *pellet* com 20ml da solução SPG-FBS 10% e realizou-se uma nova centrifugação a 5000 x g por 25 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e solução de SPG-FBS 10% foi adicionada ao *pellet* até que fosse alcançado o volume final de 5ml. Alíquotas de 1 ml da suspensão final foram congeladas em criotubos, em freezer a -80°C.

Uma alíquota de 1ml da suspensão foi rapidamente descongelada e adicionada ao meio de cultivo de um frasco T-25 cm² contendo monocamada de células de camundongo McCoy (ATCC CRL 1696) em meio Dulbecco's Modified Eagles Media (DMEM, Gibco) com 0,6% de L-Glutamina (Gibco) e 7% de soro fetal bovino (FBS, Sigma), com cerca de 30% de confluência. Este frasco foi colocado então em uma jarra de anaerobiose e nesta foi inserida uma mistura de gases na proporção

de 82,2% de nitrogênio, 8,8% de dióxido de carbono e 8% de oxigênio. A jarra foi mantida a 37°C durante 4 horas e retirada para adição de gentamicina (G-1397; Sigma) e vancomicina (V-2002; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a uma concentração de 50µg/ml e anfotericina-B (211184-V/08; Crisália) a 0,5% v/v ao frasco T-25 cm², para evitar contaminações. A mistura de gases foi inserida novamente e a jarra foi armazenada a 37°C.

A cepa vacinal de *L. intracellularis* (Enterisol® Ileitis, Boehringer Ingelheim Vetmedica) foi propagada *in vitro* em frascos T-75 cm², nas mesmas condições que o frasco T-25 cm². Esta cepa foi usada como controle positivo para verificação das condições de crescimento da bactéria na monocamada pela técnica da imunoperoxidase indireta com anticorpo monoclonal específico contra *L.intracellularis*.

3.4 PROPAGAÇÃO DA INFECÇÃO

Após seis dias de incubação, a jarra de anaerobiose foi retirada da estufa a 37°C e aberta, e uma pequena área da monocamada de células dos frascos foi raspada e transferida pra uma lâmina de vidro. O raspado foi fixado na lâmina com uma mistura de acetona e álcool metílico na proporção de 50/50.

As lâminas foram coradas pela técnica da imunoperoxidase indireta, utilizando anticorpo monoclonal específico para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003b) para confirmação de infecção da monocamada de células de camundongo McCoy pela bactéria.

A bactéria isolada e a cepa vacinal foram passadas semanalmente para frascos T-75 cm² contendo monocamada de células de

camundongo McCoy com 0,6% de L-Glutamina (Gibco) e 7% de soro fetal bovino (FBS, Sigma), com cerca de 30% de confluência, pela técnica de lise por cloreto de potássio (KCl) (Lawson et al., 1993). Primeiramente, os meios de cultivo eram retirados dos frascos T-75 cm² e colocados em tubos cônicos estéreis de 50ml. Os frascos contendo a monocamada de células McCoy eram tratados com 3ml de uma solução de KCl a 0,1% estéril, e colocados em estufa de CO₂ a 37°C durante 5 minutos. Em seguida, a solução de KCl era retirada dos frascos e adicionada aos tubos cônicos de 50 ml contendo os meios de cultivo. Centrifugavam-se os tubos cônicos de 50 ml a uma velocidade de 5000 x g por 25 minutos para a deposição das bactérias e separação de restos celulares. O sobrenadante contendo restos celulares foi descartado, e ressuspendeu-se o pellet de bactérias com 2ml de SPG-BFS 10%. A suspensão de bactérias foi transferida para um criotubo e congelada a -80°C.

Os frascos contendo a monocamada de células McCoy foram tratados com 2ml de SPG-FBS 10%, as monocamadas foram raspadas e realizou-se lise das células com uma agulha longa acoplada a seringa. O conteúdo dos frascos foi transferido para tubos cônicos de 15ml. Os tubos cônicos de 15ml foram centrifugados a 200 x g por 5 minutos para deposição de restos celulares, e o sobrenadante contendo bactérias foi utilizado para infectar novos frascos com monocamada de células McCoy com aproximadamente 30% de confluência. Estes frascos foram colocados em jarra de anaerobiose com inserção de mistura de gases na proporção de 82,2% de nitrogênio, 8,8% de dióxido de carbono e 8% de oxigênio e incubados em estufa a 37°C durante seis dias.

Uma alíquota da suspensão contendo bactérias foi enviada ao laboratório de

Proliferative Enteropathies da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Minnesota, EUA, para tipificação do perfil de VNTR da cepa isolada, segundo metodologia descrita por Beckler et al. (2005).

3.5 PREPARO DAS PLACAS DE IPMA

Após estabelecimento do crescimento bacteriano em quantidades plenas, avaliado pelas colorações de raspados de frascos infectados e caracterizado por 100% de células infectadas com mais de 30 bactérias no citoplasma, alíquotas desta suspensão contendo bactérias foram utilizadas para a preparação de placas de 96 orifícios, contendo monocamadas de células, e que foram utilizadas para realização do teste sorológico de IPMA, como descrito por Guedes et al. (2002a).

Placas estéreis de 96 orifícios, de fundo plano, foram cultivadas com células de camundongo McCoy em meio DMEM contendo 0,6% de L-Glutamina (Gibco) e 7% de soro fetal bovino (FBS, Sigma). Uma alíquota da suspensão contendo bactérias foi adicionada ao meio das placas, e as mesmas foram inseridas na jarra de anaerobiose com adição de mistura de gases na proporção de 82,2% de nitrogênio, 8,8% de dióxido de carbono e 8% de oxigênio e incubadas em estufa a 37°C durante seis dias.

Em seguida, as placas de 96 orifícios foram retiradas da jarra de anaerobiose, o meio de cultivo foi descartado, e a monocamada foi fixada com uma mistura de acetona e álcool metílico na proporção de 50/50. O excesso da solução de fixação foi retirado, e após secagem as placas foram acondicionadas em embalagens individuais e armazenadas a -20°C para utilização no teste de IPMA.

3.6 SOROLOGIA

3.6.1 Amostras

Foram utilizadas 80 amostras de soro congeladas a -20°C, de animais de um experimento prévio, inoculados por via intra-gástrica, com inóculo de homogeneizado de mucosa intestinal de suínos com enteropatia proliferativa confirmada por IHQ, contendo $2,08 \times 10^8$ organismos de *L. intracellularis*, coletadas 25 dias pós infecção. Estes animais foram necropsiados ao final do experimento, e a infecção foi comprovada por IHQ (Guedes, dados não publicados) (Tabela 1).

3.6.2 ELISA

O teste de ELISA comercial Ileitis Antibody ELISA foi utilizado segundo as instruções do fabricante (BioScreen Germany). Resumidamente, 100µl de cada amostra previamente diluída na proporção de 1:10 foram pipetados diretamente nos orifícios das placas impregnadas com o antígeno. As placas foram incubadas a 37°C durante 60 minutos e lavadas com uma solução de lavagem. Em seguida adicionou-se o volume de 100µl de anticorpo secundário anti- IgG suíno a cada orifício e a placa foi incubada novamente e lavada. Adicionou-se então uma solução de peroxidase, realizou-se nova incubação, adicionou-se uma solução de paragem, e as placas foram levadas imediatamente a um fotômetro leitor de ELISA, no comprimento de onda de 450nm. Os valores obtidos para as densidades ópticas foram introduzidos em uma fórmula de cálculo de porcentagem de inibição e classificados em positivos ou negativos de acordo com o fabricante do teste. Os animais que obtiveram porcentagens de inibição iguais ou superiores a 30% foram considerados positivos, enquanto animais com porcentagens de inibição inferiores a 20% foram considerados negativos. Valores intermediários são considerados negativos questionáveis segundo o fabricante, e foram

considerados negativos para análises comparativas.

3.6.3 Imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA)

O teste de IPMA foi realizado segundo padronização realizada por Guedes et al. (2002a). Primeiramente a placa foi hidratada com água destilada e mantida a 37°C durante 10 minutos. A água foi então descartada e 50µl das amostras diluídas em PBS a 1:30 foram adicionados a cada orifício da placa. A placa foi incubada em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e lavada quatro vezes com solução salina fosfato tamponada (PBS). Imunoglobulina G (IgG) anti-IgG suíno (A5670; Sigma) conjugada à peroxidase diluída a 1:600 em tampão (PBS com 2,5% FBS, 1% soro suíno inativado e 0,08% Tween 80) foi adicionada no volume de 30µl a cada orifício e a placa foi novamente incubada a 37°C por 45 minutos. Após nova lavagem com PBS adicionou-se a solução de cromógeno AEC (3-amino-9-etil-carbazol) preparada segundo as instruções do fabricante e incubou-se a placa em câmara úmida à temperatura ambiente por 20 minutos. A placa foi lavada quatro vezes com água destilada, colocada em estufa para secar e a leitura foi feita em um microscópio óptico invertido. Foram consideradas positivas as amostras nas quais foi possível visualizar bactérias intra- e extracelulares, coradas pelo cromógeno, e negativas as amostras que não apresentaram marcação. Seguindo o mesmo critério de classificação do ELISA, as amostras de resultado questionável foram consideradas negativas no teste de IPMA. Foram utilizados como controles positivo e negativo os controles fornecidos pelo teste comercial ELISA.

3.6.4 Análise Estatística

A análise de associação dos resultados do ELISA e do IPMA foi realizada pelo teste de McNemar, segundo Kirkwood e Sterne, (2003). A escolha do teste foi baseada nas características não paramétricas e de dependência das respostas. Utilizou-se para o cálculo das associações o software SPSS Statistics 20.0 para Macintosh, da IBM. O cálculo das sensibilidades do ELISA e do IPMA foi realizado segundo Kirkwood e Sterne (2003), dividindo-se o número de amostras positivas nestes testes pelo número amostras positivas à IHQ, considerada o padrão ouro de diagnóstico. Assim, seguindo a fórmula:

Sensibilidade do teste = (número de positivos no teste / número de positivos à IHC) * 100%

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS RECEBIDAS

Foram recebidas, no total, 48 amostras de intestinos, no período de março de 2010 a outubro de 2011 (Anexo I). As amostras eram provenientes de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo. Das 48 amostras recebidas, 40 foram descartadas por não apresentarem lesões características de EP ao exame macroscópico ou à histologia, por revelarem marcação nos graus 0 e 1 à IHQ, ou por estarem extremamente autolisadas. Desta forma, oito amostras restantes foram consideradas viáveis para processamento posterior. Uma dessas amostras foi processada antes do congelamento (fresca), e as sete restantes foram congeladas para processamento posterior.

A autólise evidente foi presente em 5 amostras, sendo que em 3 delas havia suspeita de EP à macroscopia. Não foi realizada a IHQ de 13 das amostras, porque estas não apresentaram lesões de EP ao exame histopatológico. Descartou-se uma amostra que apresentou grau 1 de marcação à IHQ por improbabilidade de sucesso ao realizar o isolamento.

4.2 ISOLAMENTO DE *L. INTRACELLULARIS*

Foram realizadas tentativas de isolamento da bactéria em sete amostras de intestinos congeladas à -80°C e em uma amostra fresca. Em três amostras (Processamentos 1, 2 e 4) não houve crescimento da bactéria detectado por imunoperoxidase indireta em lâmina de vidro, e os mesmos foram descartados. Em outra amostra (Processamento 6) não foi possível controlar o crescimento de contaminações mesmo com o uso de antimicrobianos, e esta foi também descartada. Três outras amostras (Processamentos 3, 7 e 8) foram processadas e serão colocadas em células.

O isolamento foi bem sucedido na amostra extraída ainda fresca (Processamento 5). A presença da bactéria foi confirmada semanalmente pela técnica de imunoperoxidase indireta em lâmina de vidro (Figuras 1A, 1B, 1C), além de visualização direta da *L. intracellularis* no sobrenadante dos frascos contendo a infecção em microscópio óptico de contraste de fase.

O perfil VNTR da amostra isolada foi identificado e caracterizado com o padrão específico 15-09-15-09, diferente de todas as cepas isoladas até então e armazenadas no banco de cepas da Universidade de Minnesota. Estes achados confirmam o primeiro isolamento de uma nova cepa, brasileira, de *L. intracellularis*, denominada PHE-UFG/BR2011.

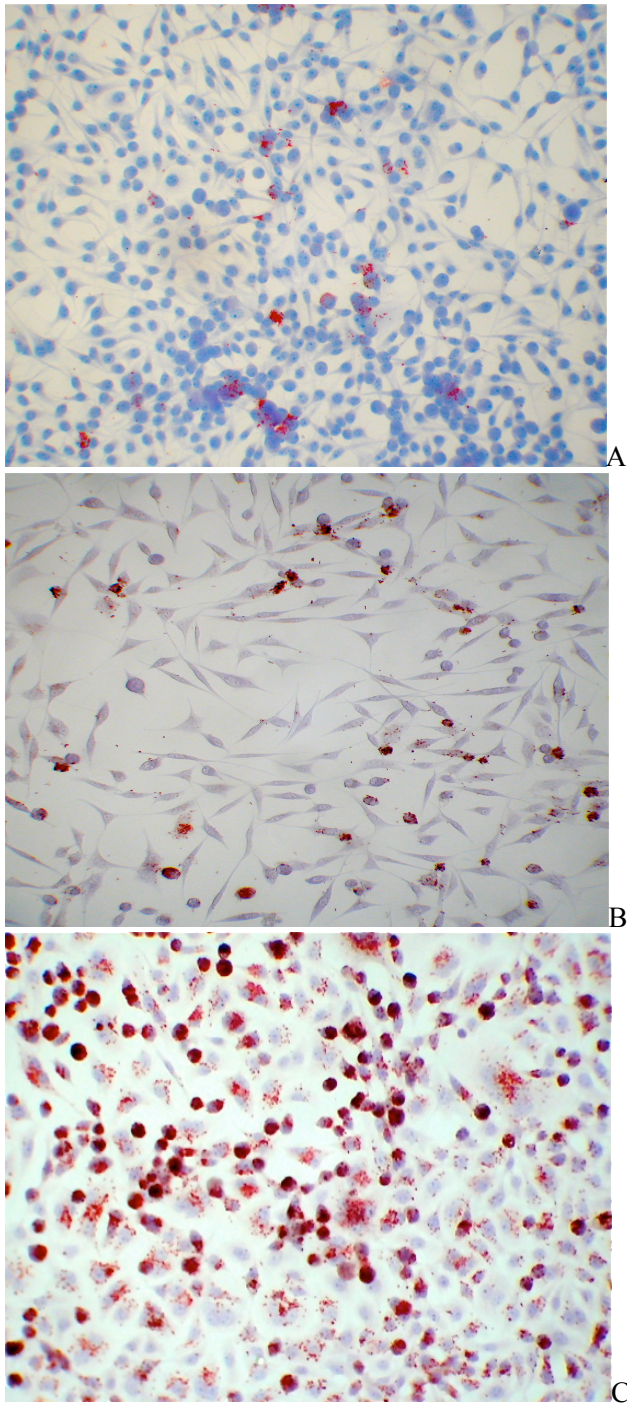


Figura 1: PHE-UFMG/BR2011 em células McCoy. Coloração por imunoperoxidase indireta em lâmina de vidro utilizando anticorpo monoclonal específico contra *L. intracellularis*. Núcleos celulares corados em Hematoxilina de Mayer. 1A: Passagem 4, 4 semanas após inoculação em células. Cerca de 10% de células infectadas 1B: Passagem 6, 6 semanas após inoculação em células. Cerca de 30% de células infectadas 1C: Passagem 8, 8 semanas após inoculação em células. Mais de 90% das células estão infectadas. 200X.

4.3 SOROLOGIA

4.3.1 - Sensibilidade

No teste ELISA 58 animais foram positivos (Tabela 1), em um total de 80 animais, resultando em uma sensibilidade de 72,5%. Quinze amostras foram negativas e sete amostras obtiveram percentagens de inibição entre os valores de 20% e 30% no ELISA e segundo instruções do fabricante foram consideradas negativas suspeitas ou questionáveis (Tabela 1).

Setenta e seis animais foram positivos no IPMA (Tabela 1), em um total de 80 animais, resultando em uma sensibilidade de 95%. Em quatro amostras avaliadas no IPMA houve impregnação marcante e inespecífica de cromógeno AEC no fundo dos poços, dificultando a interpretação dos mesmos. Essas amostras foram consideradas negativas suspeitas (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados de IHQ para *L. intracellularis* em fragmentos de intestino e sorologia utilizando as técnicas de ELISA e IPMA em cada suíno utilizado no experimento prévio de inoculação experimental com homogeneizado de mucosa de suínos com EP.

| Animal | ELISA | IPMA |
|--------|----------|----------|
| 1 | + | + |
| 2 | + | + |
| 3 | + | + |
| 4 | - | + |
| 5 | - | + |
| 6 | - | + |
| 7 | - | suspeito |
| 8 | - | + |
| 9 | + | + |
| 10 | + | + |
| 11 | - | + |
| 12 | + | + |
| 13 | + | + |
| 14 | - | + |
| 15 | suspeito | + |
| 16 | + | + |
| 17 | - | supeito |
| 18 | + | + |
| 19 | + | + |
| 20 | + | + |
| 21 | + | + |
| 22 | - | + |
| 23 | + | + |
| 24 | - | + |
| 25 | - | + |
| 26 | + | + |
| 27 | - | + |

| Animal | ELISA | IPMA |
|---------------|-----------------|-----------------|
| 28 | + | + |
| 29 | - | + |
| 30 | + | + |
| 31 | + | + |
| 32 | + | + |
| 32 | + | + |
| 34 | + | + |
| 35 | + | + |
| 36 | + | + |
| 37 | suspeito | + |
| 38 | suspeito | + |
| 39 | suspeito | + |
| 40 | + | + |
| 41 | + | + |
| 42 | suspeito | + |
| 43 | + | + |
| 44 | suspeito | + |
| 45 | - | + |
| 46 | suspeito | + |
| 47 | + | + |
| 48 | + | + |
| 49 | + | + |
| 50 | - | + |
| 51 | + | + |
| 52 | + | + |
| 53 | + | + |
| 54 | + | + |
| 55 | + | + |
| 56 | + | suspeito |
| 57 | + | + |
| 58 | + | + |
| 59 | + | + |
| 60 | + | + |
| 61 | + | + |
| 62 | + | + |
| 63 | + | + |
| 64 | + | + |
| 65 | + | + |
| 66 | + | + |
| 67 | + | + |
| 68 | + | + |
| 69 | + | + |
| 70 | + | + |
| 71 | + | suspeito |
| 72 | + | + |
| 73 | + | + |

| Animal | ELISA | IPMA |
|---------------|--------------|-------------|
| 74 | + | + |
| 75 | + | + |
| 76 | + | + |
| 77 | + | + |
| 78 | + | + |
| 79 | + | + |
| 80 | + | + |

4.3.2 - Associação entre ELISA e IPMA

Não houve associação significativa entre o ELISA e o IPMA.

fragmentos permanecessem mais tempo a temperaturas incompatíveis com a conservação dos tecidos.

5 - DISCUSSÃO

Um número relativamente alto de amostras de intestinos foi descartado. Das 48 amostras de intestinos recebidas, 22 não apresentavam lesões características de EP ao exame macroscópico. Isso pode ser justificado pela falta de experiência dos veterinários de campo em diagnosticar lesões macroscópicas características de EP. A EP é uma patologia de difícil diagnóstico à necropsia, parcialmente porque outras condições de morbidade podem apresentar lesões semelhantes (Veenhuizen et al., 2002) e porque muitas vezes o animal é sacrificado antes das lesões macroscópicas se desenvolverem, ou após a sua resolução. Outras 15 amostras foram identificadas por nossa equipe como suspeitas de EP à macroscopia, mas à histologia e à IHQ apresentaram resultados negativos. Huerta et al. (2003) demonstraram que o exame macroscópico por si só não tem validade no diagnóstico da EP em suínos.

Foram congeladas, no total, oito amostras para processamento posterior. Em uma amostra (Processamento 6) foi impossível controlar a contaminação mesmo com o uso de antimicrobianos, o que pode ser explicado pela presença de outros microrganismos, resistentes aos antimicrobianos utilizados, no fragmento. A amostra em questão era proveniente da região centro-oeste do Brasil, e durante o transporte pode ter ocorrido degelo e proliferação de microflora contaminante em detrimento da *L. intracellularis*.

Nas três amostras em que não foi detectado crescimento da bactéria as lesões poderiam estar em início da fase de resolução, e não haveria número suficiente de microrganismos para isolamento. O congelamento das amostras contribui para perda de bactérias, e o processamento de fragmentos frescos poderia ter aumentado as chances de crescimento.

O isolamento bem sucedido da bactéria foi realizado em um fragmento fresco de uma amostra coletada no estado de Minas Gerais e enviado imediatamente ao laboratório. A presença de lesões características de EP associada à agilidade de envio e ao não congelamento prévio da amostra podem ter contribuído para o sucesso do isolamento.

Todas as amostras que apresentaram alterações autolíticas eram provenientes de estados da região sul do país, e a distância pode ter contribuído para que estes

A denominação da nova cepa de *L. intracellularis* isolada foi feita pelo laboratório que realizou o perfil VNTR, PHE (*proliferative haemorrhagic enteropathy*), por ter sido isolada de um intestino com esta forma da doença, UFMG, cultivo *in vitro* e propagação realizados nos laboratórios da Universidade Federal de Minas Gerais, BR, no Brasil, e 2011 por ter sido realizada neste ano.

As amostras de soro para a realização dos testes de sorologia foram provenientes de animais experimentalmente infectados, com confirmação por IHQ. O sangue dos animais foi coletado no dia da necropsia, 25 dpi. Guedes e Gebhart (2003a) observaram soroconversão em suínos a partir de 21 dpi, o que assegura a presença de anticorpos aos 25 dpi. Os fragmentos de intestino utilizados na IHQ foram coletados na mesma ocasião, sendo avaliados quanto à presença de lesões macroscópicas de EP.

A não associação estatística do ELISA com o IPMA se justifica pelo número elevado de amostras negativas obtido no ELISA. As sete amostras de resultado negativo questionável (suspeito) também contribuíram para o resultado discrepante do ELISA em relação ao obtido por Keller et al. (2006). A recomendação do fabricante nestes casos é repetir o teste com amostras colhidas posteriormente dos mesmos animais, mas este procedimento não era possível já que os animais haviam sido sacrificados.

A sensibilidade obtida pelo IPMA (95%) está em concordância com Guedes et al.,

(2002b) e comprova a validade deste teste para triagem de rebanhos no diagnóstico de EP.

As técnicas de diagnóstico disponíveis até o presente não diferem cepas patogênicas de campo de cepas vacinais, e são apenas uma forma de verificar se houve no rebanho exposição prévia à *L. intracellularis*. A otimização da técnica de IPMA com uma cepa brasileira da *L. intracellularis* é de grande importância para o monitoramento da EP em rebanhos suínos nacionais, além de fornecer uma alternativa de diagnóstico ao teste sorológico comercial atualmente disponível.

6 - CONCLUSÕES

Foi possível o isolamento da primeira cepa brasileira de *L. intracellularis*, caracterizada com um padrão de VNTR diferente das armazenadas no Laboratório de *Proliferative Enteropathies* da Universidade de Minnesota. Esta nova cepa poderá ser usada para estudos outros como por exemplo, teste de concentração mínima inibitória de antimicrobiano e avaliação de patogenicidade para o suíno e outras espécies domésticas, além de possibilitar o oferecimento de testes sorológicos.

No contexto deste trabalho, o teste de IPMA mostrou-se mais sensível que o ELISA na detecção de anticorpos contra a *L. intracellularis* em amostras de soro de suínos previamente inoculados.

7. REFERÊNCIAS

- BECKLER, D.C.; WEBER, N.L.; GEBHART, C.J. Typing of *Lawsonia intracellularis* isolates by analysis of variable number tandem repeat prolifes. In: American Association of Swine Veterinary – Annual Meeting, 36, Toronto, Proceedings...Ontario: AASV, 2005. p.205, 2005.
- BIESTER, H.E.; SCHWARTE, L.H. Intestinal adenoma in swine. *Am. J. Pathol.*, v.7, p.175-185, 1931.
- BOUTRUP, T.S.; BOESEN, H.T.; BOYE, M. et al. Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Comp. Path.* v.143, p.101-109, 2010.
- BOYE, M.; JENSEN, T.K.; MOLLER, K. et al. Specific detection of *Lawsonia intracellularis* in porcine proliferative enteropathy inferred from fluorescent rRNA in situ hybridization. *Vet. Pathol.* v.35, p.153-156, 1998.
- CHANG, W.L.; WU, C.F.; WU, Y. et al. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in swine herds in Taiwan. *Vet. Rec.*, v,141, p.103-104, 1997.
- CHIRIBOGA, A.E.C.N.; GUIMARAES, W.V.; VANETTI, M.C.D. et al. Detection of *Lawsonia intracellularis* in faeces of swine from the main production regions in Brazil. *Can. J. Microbiol.*, 45: 230-234, 1999.
- COLLINS, A.M.; LOVE, R.J.; POZO, J. et al. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. *Swine Health Prod.*, v.8, p.211-215, 2000.
- COLLINS, A.M.; LOVE, R.J. Re-challenge of pigs following recovery from proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.*, v.120, p.381-386, 2007.
- COLLINS, A.M.; FELL, S.; PEARSON, H. et al. Colonisation and shedding of *Lawsonia intracellularis* in experimentally inoculated rodents and in wild rodents in pig farms. *Vet. Microbiol.*, v.150, p.384-388, 2011.
- 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.
- ELDER, R.O.; DUHAMEL, G.E.; MATHIESEN, M.R. et al. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, and salmonellae in porcine intestinal specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.9, p.281-286, 1997.
- ELWELL, M.R.; CHAPMAN, A.L.; FRENKEL, J.K. Duodenal hyperplasia in a guinea pig. *Vet. Pathol.*, v.181, p.136-139, 1981.

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

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

FRANÇA, S.A. Aspectos epidemiológicos e terapêuticos da enteropatia proliferativa suína. 2007. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

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

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

GEBHART, C.J.; BARNS, S.M.; McORIST, S. et al. Ileal symbiont *intracellularis*, an obligate bacterium of porcine intestine showing a relationship to *Desulfuvibrio* species. *Intern. J. Syst. Bact.*, v.43, p.533-538, 1993.

GEBHART, C.J. e KAPUR, V. Whole genome sequence PHE/MN1-00 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

Search: Genome for *Lawsonia intracellularis*.

GEBHART, C.J.; GUEDES, R.M.C. *Lawsonia intracellularis*. In: Gyles, C.L.; Prescott, J.F. et al., (ed.) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th Ed., Oxford: Wiley-Blackwell, p.503-512, 2010.

GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Onset and duration of fecal shedding, cell mediated and humoral responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *L. intracellularis*. *Vet. Microbiol.*, v.91, p.135-145, 2003a.

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

GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Progression of *Lawsonia intracellularis* infection and mucosa immune response in pigs. *American Association of Swine Veterinarians*, p.439-440, 2004.

GUEDES, R.M.; GEBHART, C.J. Evidence of cell-mediated immune response and specific local mucosal immunoglobulin (Ig) A production against *Lawsonia intracellularis* in experimentally infected swine. *Can. J. Vet. Res.*, v.74, p.97-101, 2010.

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, 2002a.

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. Diagn. Invest.*, v.14, p.528-530, 2002b.

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, 2002c.

GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; ARMBRUSTER, G.A. et al. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative haemorrhagic enteropathy. *Can. J. Vet. Res.*, v.66, p.258-263, 2002d.

GUEDES, R.M.C.; FRANÇA, S.A.; MACHADO, G.S. et al. Use of tylvalosin-medicated feed to control porcine proliferative enteropathy. *Vet. Rec.*, v.165, p.342-345, 2009.

GUEDES, R.M.C. Porcine proliferative enteropathy: diagnosis, immune response and pathogenesis. 2002. 130f. Thesis (PhD). College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, Minnesota, USA.

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. *Eq. Vet. J.*, v.41, p.593-596, 2009.

HEIJDEN, H.M.J.F. van der; BAKKER, J.; ELBERS, A.R.W. et al. Prevalence of exposure and infection of *Lawsonia intracellularis* among slaughter-age pigs. *Res. Vet. Sci.*, v.77, p.197-202, 2004.

HERBST, W.; HERTRAMPF, B.; SCHMITT, T. et al. Diagnosis of *Lawsonia intracellularis* using the polymerase chain reaction (PCR) in pigs with and without diarrhea and other animal species. *Dtsch. Tierarzti. Wochenschr.*, v.110, p.361-364, 2003.

HOLYOAKE, P.K.; CUTLER, R.S.; CAPLE, I.W. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring ileal symbiont *intracellularis*-specific immunoglobulin G response in sera of pigs. *J. Clin. Microbiol.*, V.32, P.1980-1985, 1994.

HOLYOAKE, P.K.; EMERY, D.; GONSALVES, J. et al. Prevalence of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in pig herds in Australia. *Aust. Vet. J.* v.88, p.186-188, 2010.

HOTCHKISS, C.H.E.; SHAMES, B.; PERKINS, S.E. et al. Proliferative enteropathy of rabbits: The intracellular Campylobacter-like organism is closely related to *Lawsonia intracellularis*. *Lab. Anim. Sci.*, v.46, p.623-627, 1996.

HUERTA, B.; ARENAS, A.; CARRASCO, L. et al. Comparison of diagnostic

techniques for porcine proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis* infection). *J. Comp. Path.*, v.129, p.179-185, 2003.

JACOBSON, M.; RASBACK, T.; FLOISTRUP, H. et al. Survey on the occurrence of *Brachyspira* species and *Lawsonia intracellularis* in children living on pig farms. *Epidemiol. Infect.*, v.135, p.1043-1045, 2007.

JACOBY, R.O. Transmissible ileal hyperplasia of hamsters. *Am. J. Pathol.*, v.91, p.433-444, 1978.

JOHNSON, E.A. e JACOBY, R.O. Transmissible ileal hyperplasia of hamsters. *Am. J. Pathol.*, v.91, p.451-459, 1978.

JONES, G.F.; WARD, G.E.; MURTAUGH, G. et al. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.2611-2615, 1993.

JORDAN, D.J.; KNITTEL, J.P.; ROOF, M.B. et al. *Lawsonia intracellularis* transmission study using a pure culture inoculated seeder-pig sentinel model. *Vet. Microbiol.*, v.104, p.83-90, 2004.

KELLER, C.; SCHOEDER, H., OHLINGER, V.F. A new blocking ELISA kit for the detection of antibodies specific to *Lawsonia intracellularis* in porcine blood samples. *The 4th International*

Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference. Oslo, Norway; 2006.

KIM, O.; KIM, B.; CHAE, C. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in selected pig herds in Korea as determined by PCR. *Vet. Rec.*, v.143, p.567-589, 1998.

KIRKWOOD, B.R.; STERNE, J.A.C. *Essential Medical Statistics*, 2.ed. Malden: Blackwell Publishing, 2003, 501p.

KLEIN, E.C.; GEBHART, C.J.; DUHAMEL, G.E. Fatal outbreaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. *J. Med. Primatol.*, v.28, p.11-18, 1999.

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.

KNITTEL, J.P., KROLL, J., MATHES, M. et al. Efficacy of an avirulent *Lawsonia intracellularis* vaccine in swine. In: *Proceedings International Pig Veterinary Society*, 16, Melbourne, p. 24, 2000.

KROLL, J.J.; EICHMEYER, M.A.; SCHAEFFER, M.L. et al. Lipopolysaccharide-based enzyme-linked immunosorbent assay for experimental use in detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in pigs. *Clin Diagn Lab Immunol.*, v.12, p.693-699, 2005.

- LADINIG, A.; SOMMERFELD-STUR, I.; WEISSENBOCK, H. Comparative evaluation of diagnostic methods for *Lawsonia intracellularis* infection in pigs, with emphasis on cases lacking characteristic lesions. *J. Comp. Path.* v.140, p.140-148, 2009.
- LAWSON, G.H.K.; McORIST, S.; ROWLAND, A.C. et al. Serological diagnosis of the porcine proliferative enteropathies: implications for aetiology and apidemiology. *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, p.1136-1142, 1993.
- LAWSON, G.H.K.; MACKIE, R.A.; SMITH, D.G.E. et al. Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont intracellularis depends on host cell function and actin polymerization. *Vet. Microbiol.*, v.45, p.339-350, 1995.
- LAWSON, G.H.K.; GEBHART, C.J. Proliferative enteropathy: review. *J. Comp. Path.*, v.122, p.77-100, 2000.
- LEBLANC, B.; FOX, J.G.; LE NET, J.L. et al. Hyperplastic gastritis with intraepithelial Campylobacter-like organism in a beagle dog. *Vet. Pathol.*, v.30, p.391-194, 1993.
- LEE, S.W.; KIM, T.J.; PARK, S.Y. et al. Prevalence of porcine proliferative enteropathy and its control with tylosin in Korea. *J. Vet. Sci.*, v.2, p.209-212, 2001.
- LeMARCHAND, T.X.; TULLY, T.N. Jr.; SHANE, S.N.; et al. Intracellular Campylobacter-like organisms associated with rectal prolapse and proliferative enteroproctitis in emus (*Dromaius novachollandiae*). *Vet. Pathol.* v.34, p.152-156, 1997.
- LOVE, D.N.; LOVE, R.J.; EDWARDS, M.J. Proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. *Vet. Rec.*, v.100, p.65-68, 1977a.
- LOVE, D.N.; LOVE, R.J.; EDWARDS, M.J. Control of proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. *Vet. Rec.*, v.100, p. 473, 1977b.
- LOVE, D.N.; LOVE, R.J. Pathology of proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. *Vet. Pathol.*, v.16, p.41-48, 1979.
- LUNA, L.G. (Ed). Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology. New York: McGraw- Hill Book Co, 1968.
- MacINTYRE, D.G.E.; SMITH, D.J.; SHAW, J.R. et al. Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Vet. Pathol.*, v.40, p.421-432, 2003.

McORIST, S; JASNI, S; MACKIE, R. A. et al. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure culture of Ileal symbiont intracellularis. *Infect. Immun.*, v.61, p.4286-4292, 1993.

McORIST, S.; MACKIE, R.A.; LAWSON, G.H.K. Antimicrobial susceptibility of *Ileal symbiont intracellularis* isolated from pigs with porcine proliferative enteropathy. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.1314-1317, 1995a.

McORIST, S.; JASNI, R.A.; BERSCHNEIDER, H.M. et al. Entry of the bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent release. *Res. Vet. Sci.*, v.59, p.255-260, 1995b.

McORIST, S; GEBHART, C.J.; BOID, R. et al. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov, sp nov, the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.45, p.520-525, 1995c.

McORIST, S.; GEBHART, C.J. *In vitro* testing of antimicrobial agents for proliferative enteropathy (ileitis). *Swine Health Produc.*, v.3, p.146-149, 1995.

McORIST S.; GEBHART C.J. Porcine proliferative enteropathies. In: Straw, B.E.; D'Allaire S., et al., (Ed.) *Disease of Swine*, 9th ed. Ames: Iowa State University Press, p.521-534, 1999.

McORIST, S. Obligate intracellular bacteria and antibiotic resistance. *Trends in Microbiol.*, v.8, p.483-486, 2000.

MICHALSKI, C.W.; MOLA, F.F.; KUMMEL, K. et al. Human inflammatory bowel disease does not associate with *Lawsonia intracellularis* infection. *BMC Microbiol.*, v.6, p.1-7, 2006.

MOLBAK, L.; JOHNSEN, K.; BOYE, M. et al. The microbiota of pigs influenced by diet, texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Vet. Microbiol.* v128, p.96-107, 2008.

MUTO, T.; NOGUCHI, Y.; SUZUKI, K. et al. Adenomatous intestinal hyperplasia in guinea pigs associated with Campylobacter-like bacteria. *Jpn J. Med. Sci. Biol.* v.36, p.337-342, 1983.

NODELIJK G.; WENSVOORT, G.; KROESE, B. et al. Comparison of a commercial ELISA and an immunoperoxidase monolayer assay to detect antibodies directed against porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Vet. Microbiol.*, v.49, p.285-295, 1996.

POZO, J., CARVAJAL, A.; De ARRIBA, M.L. et al. Presence of *Lawsonia intracellularis* as an aetiological agent in enteric disorders in spanish swine herds. In: *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, 416, 1998.

RIBER, U.; CORDES, H.; BOUTRUP, T.S. et al. Primary infection protects pigs against re-infection with *Lawsonia intracellularis* in experimental challenge studies. *Vet. Microbiol.*, v.149, p.406-414, 2011.

ROBERTS, L.; ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K. Porcine intestinal adenomatosis: epithelial dysplasia and infiltration. *Gut*, v.21, p.1035-1040, 1980.

ROOF, M.B. Vaccinating for ileitis. In: *Proceedings of the 28th Allen D. Leman Conference*, 121-126, 2001.

ROWLAND, A.C., LAWSON, G.H.K. Intestinal adenomatosis in the pig: immunofluorescent and electron microscopic studies. *Res. Vet. Sci.*, v.17, p.323-330, 1974.

ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K. Intestinal adenomatosis in the pig: a possible relationship with a haemorrhagic enteropathy. *Res. Vet. Sci.*, v.18, p.263-268, 1975.

ROWLAND, A.C., ROWNTREE, P.G.M. A haemorrhagic bowel syndrome associated with intestinal adenomatosis in the pig. *Vet. Rec.*, v.91, p.235-241, 1972.

ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K. Porcine proliferative enteropathies. In: LEMAN, A.D., STRAW, B.E., MENGELING, W.L. et al, eds. *Diseases of*

swine. 7th ed. Ames, Iowa, Iowa State University Press, p. 560-569, 1992.

SMITH, S.H.; McORIST, S.; GREEN, L.E. Questionnaire survey of proliferative enteropathy on british pig farms. *Vet. Res.*, v.142, p.690-693, 1998.

SMITH, D.G.E.; MITCHELL, S.C.; NASH, T. et al. Gamma interferon influences intestinal epithelial hyperplasia caused by *Lawsonia intracellularis* infection in mice. *Infect. Immun.*, v.68, p.6737-6743, 2000.

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.

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

STEGE, H.; JENSEN, T.K.; MØLLER, K. et al. Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in pig herds. *Vet. Microbiol.* v.104, p.197-206, 2004.

STEVENSON, G.W. Differential diagnosis of diarrhea in grow-finish swine. In: *32nd Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, 359-363, 2001.

STILLS, H.F.Jr Isolation of an intracellular bacterium from hamsters (*Mesocricetus auratus*) with proliferative ileitis and reproduction of the disease with a pure

culture. *Infect. and Immun.*, v.59, p.3227-3236, 1991.

TAKGHASHI, K.; KISHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, A. et al. Porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in Japan. In: *Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress*, 3, 109, 1998.

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

VEENHUIZEN, M.F.; ELAM, T.E.; SOENKSEN, N. Porcine proliferative enteropathy: diagnosis and impact. *Food Animal*, v.24, p.10-15, 2002.

WALTER, D.; GEBHART, C.J.; KROLL, J. Serologic profiling and vaccination timing for *Lawsonia intracellularis*. *J. Swine Health Prod.* v.12, p.310-313, 2004.

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

WATTANAPHANSAK, S.; RANDALL, S.S.; GEBHART, C.J. In vitro antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates. *Vet. Microbiol.*, v.134, p.305-310, 2009.

WILLIAMS, N.M.; HARRISON, L.R.; GEBHART, C.J. Proliferative enteropathy in a foal caused by *Lawsonia intracellularis*-like bacterium. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.8, p.254-256, 1996.

10. Anexos

Anexo I - Descrição das amostras de intestinos recebidas para isolamento de uma cepa brasileira de *L. intracellularis*, no período de março de 2010 a outubro de 2011.

| AMOSTRA | ORIGEM | MACROS COPIA | HISTOLOGIA | IHQ | DESTINO |
|---------|--------|--------------|------------------------------|----------|---|
| 1 | PR | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 2 | PR | EP Grau 1 | SLA | Negativo | Descarte |
| 3 | PR | EP Grau 4 | Autólise evidente | Grau 3 | Descarte |
| 4 | PR | EP Grau 2 | SLA | Negativo | Descarte |
| 5 | RS | EP Grau 1 | Autólise evidente | Negativo | Descarte |
| 6 | RS | EP Grau 1 | SLA | Negativo | Descarte |
| 7 | PR | EP Grau 4 | Autólise evidente | Grau 1 | Descarte |
| 8 | PR | SLA | Autólise evidente | Grau 1 | Descarte |
| 9 | PR | EP Grau 4 | EP grau 4 | Grau 3 | Processamento 2 - 2 tentativas, não houve crescimento |
| 10 | PR | EP Grau 4 | EP grau 4 | grau 4 | Processamento 1 - 5 tentativas e 3 passagens, não houve crescimento |
| 11 | MG | EP Grau 1 | SLA | Negativo | Descarte |
| 12 | MG | SLA | SLA | NR | Descarte |
| 13 | MG | EP Grau 2 | SLA | NR | Descarte |
| 14 | PR | SLA | SLA | NR | Descarte |
| 15 | PR | SLA | SLA | NR | Descarte |
| 16 | MG | EP Grau 1 | Abcessos de criptas isolados | NR | Descarte |
| 17 | MG | EP Grau 2 | Abcessos de criptas isolados | NR | Descarte |
| 18 | MG | EP Grau 2 | SLA | Negativo | Descarte |
| 19 | MG | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 20 | MG | SLA | SLA | | Descarte |
| 21 | SC | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 22 | SC | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 23 | SC | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 24 | SC | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 25 | SC | SLA | Abcessos de criptas isolados | Negativo | Descarte |
| 26 | SC | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 27 | SC | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 28 | SC | SLA | Abcessos de criptas isolados | Grau 2 | Processamento 3 - em processamento |
| 29 | SC | EP Grau 2 | SLA | Negativo | Descarte |

| AMOSTRA | ORIGEM | MACROS COPIA | HISTOLOGIA | IHQ | DESTINO |
|---------|--------|--------------|------------------------------|----------|---|
| 30 | SC | SLA | SLA | Negativo | Descarte |
| 31 | SC | EP Grau 2 | SLA | Negativo | Descarte |
| 32 | SC | EP Grau 2 | SLA | Negativo | Descarte |
| 33 | SC | EP Grau 2 | SLA | Negativo | Descarte |
| 34 | SC | EP Grau 1 | SLA | NR | Descarte |
| 35 | SC | EP Grau 2 | SLA | NR | Descarte |
| 36 | SC | EP Grau 2 | SLA | NR | Descarte |
| 37 | SC | SLA | SLA | NR | Descarte |
| 38 | SC | SLA | Enterite necrótica difusa | Negativo | Descarte |
| 39 | SC | SLA | SLA | Grau 1 | Descarte |
| 40 | SC | SLA | Autólise evidente | Negativo | Descarte |
| 41 | MG | SLA | SLA | NR | Descarte |
| 42 | MG | EP Grau 2 | SLA | NR | Descarte |
| 43 | MG | EP Grau 2 | SLA | NR | Descarte |
| 44 | MG | NR | NR | NR | Processamento 4 - uma tentativa, não houve crescimento |
| 45 | MG | EP Grau 4 | EP grau 4 | Grau 4 | Processamento 5 - Cepa isolada |
| 46 | MT | NR | NR | NR | Processamento 6 - 4 tentativas, contaminação incontrolável |
| 47 | MG | EP Grau 1 | EP grau 3 | NR | Processamento 7 - em processamento |
| 48 | SP | NR | EP grau 3 | NR | Processamento 8 - em processamento |

