

Cristiane Viana Guimarães Ladeira

**ESTUDO RETROSPECTIVO IMUNOISTOQUÍMICO E PESQUISA POR PCR
EM FEZES E SOROLOGIA PARA *LAWSONIA INTRACELLULARIS* EM
EQUINOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS-BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2008

L154e Ladeira, Cristiane Viana Guimarães, 1980-

Estudo retrospectivo imunoistoquímico e pesquisa por PCR em fezes e sorologia para *Lawsonia intracellularis* em eqüinos no Estado de Minas Gerais-Brasil / Cristiane Viana Guimarães Ladeira – 2008.

39 p. : il.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Eqüino – Doenças – Teses. 2. Imunohistoquímica – Teses. 3. Patologia veterinária – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 5. Epidemiologia – Teses. I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 96

Dedicada, a Deus, aos meus pais, a Ju e
ao Gu pelo amor, compreensão e
por tudo que são em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, a minha irmã, Luiz Augusto e a toda minha família e a família do Gu, pelo amor, carinho e apoio.

Ao Luiz Gustavo, querido Gu, pelo amor, compreensão, incentivo de todos os dias e por sempre me ajudar em todos os momentos.

Ao Professor Roberto Guedes, por ser um orientador excepcional e um exemplo profissional. Obrigada pela oportunidade, confiança, apoio e ensinamentos.

Aos professores e amigos do Setor de Patologia: Profa Roselene, Profa Rogéria, Prof. Ernane, Prof Renato, Núbia, Silvia França, Aline Viotti, Fábio, Marina, Silvia, Raquel, Mel, Marilene, Aline, Adão, Janquerle, Tati, Alcina, Natália, Fabiana, Raquel, Érika, Renata, Teane e Mariana pela convivência harmoniosa.

À Juliana, bolsista de iniciação científica, por me ajudar constantemente na execução das técnicas de diagnóstico, pela companhia nos momentos mais difíceis e amizade construída.

Ao Mateus, bolsista de iniciação científica, pelo trabalho realizado.

À Profa Maristela Silveira Palhares, Profa. Mary Suzan Varaschin, Prof. Guilherme Ribeiro Valle e Profa. Roselene Ecco pela participação na banca examinadora e grande contribuição para a melhoria deste trabalho.

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

À CAPES pela bolsa de estudo concedida no primeiro ano de mestrado.

Aos proprietários, médicos veterinários, gerentes e tratadores dos haras visitados pela oportunidade e apoio.

Aos colegas que ajudaram na coleta e processamento do material.

À EPAMIG pelo constante apoio.

Aos funcionários, professores da EV e a todas as pessoas que não foram citadas e que de forma direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
1 REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 HISTÓRIA DA DOENÇA	11
1.2 ETIOLOGIA	12
1.3 EPIDEMIOLOGIA	12
1.4 PATOGÊNESE	13
1.5 SINAIS CLÍNICOS	15
1.6 PATOLOGIA	16
1.7 DIAGNÓSTICO	17
1.8 TRATAMENTO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 ESTUDO RETROSPECTIVO	19
2.2 PESQUISA POR PCR EM FEZES E SOROLOGIA	20
2.2.1 Coleta de amostras	20
2.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	21
2.2.3 Sorologia	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 ESTUDO RETROSPECTIVO.....	25
3.2 PESQUISA POR PCR EM FEZES E SOROLOGIA	25
4 CONCLUSÕES	33
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
6 ANEXOS	38
Anexo 1 -Protocolo de imunistoquímica para <i>Lawsonia intracellularis</i>	38
Anexo 2 - Identificação da propriedade e dos animais submetidos a coleta de amostra.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Amostras positivas (pos) na sorologia e na PCR, relacionadas as informações da origem, idade dos animais avaliados, histórico de diarreia e característica das fezes no momento da coleta.	28
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Coleta de amostras de fezes de eqüinos diretamente da ampola retal	21
Figura 2	Lâmina (Perfecta) para sorologia	25
Figura 3	Fotomicrografia de preparação negativa (A) e positiva, 1:60, (B) à sorologia utilizando a técnica de imunoperoxidase em lâminas para detecção de anticorpos contra <i>L. intracellularis</i> (400x)	29
Figura 4	Eletroforese em gel da agarose de produto da amplificação para <i>L. intracellularis</i> em amostras de fezes de potros	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	3-amino-9etilcarbazol
AST	Aspartato amino transferase
bp	Pares de base
DNA	Àcido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EP	Enteropatia proliferativa
EPE	Enteropatia proliferativa eqüina
EUA	Estados Unidos da América
EV-UFMG	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
HE	Hematoxilina e eosina
IFA	Imunofluorescência Indireta
IHQ	Imunoistoquímica
IPMA	Imunoperoxidase em monocamadas de células
IPX	Imunoperoxidase em lâminas de vidro
I.V	Intravenoso
Kg	Kilogramas
LHD	Lactato desidrogenase
mL	Militros
mg	Miligramas
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
p.v	Peso por volume
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rDNA	DNA ribossômico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFLA	Universidade Federal de Lavras

RESUMO

A enteropatia proliferativa causada pela bactéria intracelular, *Lawsonia intracellularis*, tem sido relatada em eqüinos na Austrália, Estados Unidos, Canadá e em países na Europa (Suíça e Bélgica). No entanto, até o momento, a doença não foi diagnosticada em nenhum país da América Latina. A prevalência da doença em eqüinos é desconhecida. Pesquisou-se a ocorrência da enteropatia proliferativa em eqüinos no Estado de Minas Gerais, Brasil, através de estudo retrospectivo no arquivo do Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Universidade Federal de Lavras (UFLA), e através da aplicação da técnica de PCR em fezes e sorologia. O estudo retrospectivo foi realizado a partir de amostras em blocos de parafina, de 51 casos compilados de eqüinos com desordens entéricas provenientes na Escola de Veterinária da UFMG, no período de 1970 a 2006, e de nove casos provenientes da UFLA no período de 2000 a 2007. Cortes histológicos em lâminas silanizadas dos blocos contendo fragmentos de intestino e estômago foram submetidos a imunoistoquímica (IHQ) utilizando o método da Streptavidina Marcada, anticorpo policlonal contra *L. intracellularis* e solução de cromógeno de AEC (Amino Etil-carbazol). Não foi identificada nenhuma amostra positiva à IHQ. Para realização da pesquisa por PCR em fezes e sorologia foram utilizados o teste sorológico, usando a técnica de imunoperoxidase em lâminas de vidro, e a técnica de PCR em amostras fecais coletadas de 223 eqüinos provenientes de 14 haras e de eqüinos hospitalizados na escola de veterinária da UFMG. Das 223 amostras avaliadas sorologicamente, foram identificados vinte e um eqüinos com titulação de 1:60, sendo considerados positivos. A técnica de PCR em fezes para detecção de DNA da *L. intracellularis* identificou sete eqüinos positivos. Soropositividade e detecção de bactérias nas fezes de potros na população de eqüinos do Estado de Minas Gerais, Brasil, indica a presença do agente e a possibilidade de doença associada a infecção, sendo um alerta para os clínicos como possível diagnóstico diferencial de enterite em eqüinos.

Palavras-chave: equino; enteropatia proliferativa; *Lawsonia intracellularis*; epidemiologia, imunoistoquímica, PCR, sorologia.

ABSTRACT

The proliferative enteropathy caused by intracellular bacteria, *Lawsonia intracellularis*, has been described in equine in Australia, United States, Canada and in countries of Europe, (Switzerland and Belgium). Currently, the disease has not been diagnosed in any country of Latin America. The predominance of the disease in equine is still unknown. A retrospective study was conducted using paraffin blocks of equine cases from the veterinarian schools of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and Universidade Federal de Lavras (UFLA). Also a prospective study using serology and PCR for detecting antibodies and *L. intracellularis* shedding in fecal samples was conducted in different equine herds in the state of Minas Gerais, Brasil. Fifty-one cases of equines with enteric disorders from the period of 1970 to 2006 from UFMG and nine cases of UFLA were compiled and selected from the period of 2000 to 2007. Histological cuts of the blocks containing fragments of intestine and stomach were prepared in signalized glass-slides, and were submitted to IHQ using the method of Streptavidin, polyclonal antibody against *L. intracellularis* and ACE (Amino Etil-carbazol) cromogen solution. No positive sample in IHQ was identified. For the longitudinal study, sera and fecal samples from 223 animals from 14 horse farms and veterinarian schools of UFMG a serological test using the imunoperoxidase technique in glass sheets and PCR were used. From the 223 samples serologically tested, eight equine had 1:60 titer, and were considered positive. The PCR technique in feces for bacteria's DNA detection identified seven positive equine for *L. intracellularis*. Seropositivity and detection of bacteria in colt's feces in equine population in the State of Minas Gerais, Brasil, indicates the presence of the agent and the possibility of the disease associated with the infection. This should be an alert to clinics as possible differential diagnosis of enteric disease equine.

Key-words: Equine, proliferative enteropathy, *Lawsonia intracellularis*, epidemiology, immunohistochemistry, PCR, serology.

INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa (EP) é uma doença infecto-contagiosa entérica causada pela bactéria *Lawsonia intracellularis* (McOrist et al., 1993; McOrist et al., 1995a). A EP tem sido descrita esporadicamente em eqüinos, não existindo nenhum estudo epidemiológico sobre a prevalência da patologia em eqüinos. O primeiro relato da EP em eqüinos foi descrito em 1982 por Duhamel e Wheeldon (1982), e desde 1996 foram relatados casos na América do Norte, Canadá, Austrália e Europa. O fato da doença não ter sido relatada em outras partes do mundo não necessariamente indica que eqüinos de outros países não estejam infectados pela *L. intracellularis*. Não existem relatos na literatura de casos da enteropatia proliferativa em eqüinos (EPE) na América Latina até a presente data. A prevalência da doença em eqüinos assim como os mecanismos de patogenicidade da *L. intracellularis* nesta espécie ainda não foram bem elucidados.

Os objetivos desta dissertação são realizar estudo retrospectivo com a aplicação da técnica de imunoistoquímica (IHQ) para *L. intracellularis* em blocos de parafina de casos de eqüinos com desordens entéricas, armazenados no Laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Universidade Federal de Lavras (UFLA), e pesquisa por PCR em fezes e sorologia para o diagnóstico de EPE em potros de diferentes haras do Estado de Minas Gerais, Brasil.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. HISTÓRIA DA DOENÇA

A enteropatia proliferativa (EP), também conhecida como enterite proliferativa, ileíte proliferativa e adenomatose intestinal, é uma patologia entérica infecto-contagiosa (Lawson e Gebhart, 2000), causada pelo agente etiológico recentemente identificado e classificado como *L. intracellularis*

(McOrist et al., 1995a). A EP tem sido relatada em diversas espécies de animais, como eqüinos (Duhamel e Wheeldon, 1982; Williams et al., 1996), suínos (McOrist e Gebhart, 1999; Guedes et al., 2002a), hamster (Johnson e Jacoby, 1978), cobaio (Elwell et al., 1981), cães (Leblanc et al., 1993), raposa (Eriksen et al., 1990), ratos (Vandenberghe et al., 1985), ferret (Fox e Lawson, 1988), macacos (Klein et al., 1999), cervos (Drolet et al., 1996), coelhos (Hotchkins et al., 1996), emu (Lemarchand et al., 1997), avestruz (Cooper et al., 1997a), bovinos, porco da índia e girafa (Herbst et al., 2003).

A doença foi descrita primeiramente como uma doença proliferativa do intestino de suínos por Biester e Schwarte (1931) e, somente quarenta anos mais tarde, Rowland e Lawson (1974) descreveram como agente etiológico uma bactéria intracelular curva, identificada como sendo do gênero *Campylobacter* (Gebhart et al., 1993). McOrist et al. (1995a) reclassificaram a bactéria intracelular obrigatória gram negativa causadora da EP com a denominação de *L. intracellularis*, dentro da família das Desulfovibrionaceas.

A EP é uma patologia que tem sido diagnosticada em suínos em quase todos os países do mundo, sendo uma das mais importantes doenças causadoras de grandes perdas econômicas na indústria mundial suína (Cooper e Gebhart, 1998), resultando em baixo ganho de peso, predisposição a outras patologias que culminam na piora da taxa de conversão alimentar, maior número de refugos no rebanho e morte (Gebhart et al., 1993; Lawson e Gebhart, 2000; Kroll et al., 2005). A EP em suínos já foi bem estudada e diagnosticada, diferentemente da espécie eqüina, que teve seu primeiro relato de caso somente em 1982 (Duhamel e Wheeldon, 1982), em um potro de seis meses da raça Árabe.

Diante do crescente número de relatos de caso descritos na literatura, suspeita-se que a enteropatia proliferativa eqüina (EPE)

esteja presente no Brasil, no entanto negligenciada no diagnóstico diferencial de diarreias em potros desmamados. A manifestação clínica semelhante a outros problemas digestivos e a não disponibilidade de diagnósticos laboratoriais, provavelmente, têm contribuído para a sua não detecção em nosso meio, o que demonstra a necessidade de pesquisas desta doença no estado de Minas Gerais, Brasil.

1.2. ETIOLOGIA

A EP tem sido descrita como uma importante doença entérica, principalmente em suínos, há mais de 70 anos, quando foi identificada em 1931 a bactéria intracelular no interior das criptas intestinais (Kroll et al., 2005). No primeiro relato da doença em eqüinos o agente etiológico era conhecido como *Campylobacter like organism* ou *CLO* (Duhamel e Wheeldon, 1982), pela semelhança morfológica com *Campylobacter spp.* (Cooper e Gebhart, 1998). Posteriormente, quando demonstrado não se tratar de uma *Campylobacter*, foi dado ao agente causador da EP o nome temporário de *Ileal Symbiont (IS) intracelular*, (Gebhart et al., 1993; McOrist et al., 1993; Kroll et al., 2005) e a partir do segundo caso de EP em eqüinos (Williams et al., 1996), já foi relatado como *L. intracellularis*, tendo sido diagnosticado por imunistoquímica (IHQ) utilizando anticorpo monoclonal específico para *L. intracellularis* de suínos.

A *L. intracellularis* é um bacilo curvo ou em formato de S, intracelular obrigatório, gram negativo, microaerofílico (5- 10% de oxigênio), não formador de esporos (Lawson et al., 1993; Lawson e Gebhart, 2000; Bihl, 2003), mede 1,25 –1,75 µm de comprimento e 0,25 –0,43 µm de largura (Lawson et al., 1993; McOrist et al., 1995a; Lawson e Gebhart, 2000; Kroll et al., 2005), envolto por um envelope trilaminar separado por uma membrana citoplasmática (Kroll et al., 2005). A bactéria apresenta um flagelo longo e unipolar visualizado na microscopia eletrônica somente quando não se encontra

no citoplasma de enterócitos (Lawson e Gebhart, 2000; Kroll et al., 2005).

A seqüência de 16S rDNA da *L. intracellularis* mostra que é uma bactéria pertencente a divisão delta da Proteobactéria (Gebhart et al., 1993; McOrist et al., 1995abc), família *Desulfovibrio desulfuricans*, taxonomicamente diferente de outros patógenos intracelulares (McOrist et al., 1995ab; Cooper e Gebhart, 1998; Lawson e Gebhart, 2000). Até o momento, não foram detectadas diferenças genéticas ou de proteínas de membrana externa entre cepas de *L. intracellularis* isoladas de diferentes espécies animais acometidas (Cooper et al., 1997a; Cooper e Gebhart, 1998; Al-Ghamdi, 2003).

1.3. EPIDEMIOLOGIA

A EP em suínos, espécie mais bem estudada com relação a esta enfermidade, é uma doença endêmica, de distribuição mundial e bastante difundida no Brasil. No entanto, a prevalência da EPE não é conhecida, pois existem na literatura poucos casos confirmados da doença em todo o mundo.

Como mencionado anteriormente, foram descritos casos de EPE nos Estados Unidos da América (EUA) (Williams et al., 1996; Frank et al., 1998; Brees et al., 1999; Schumacher et al., 2000; Al-Ghamdi, 2003; Bihl, 2003; Atherton e McKenzie III, 2006; Sampieri et al., 2006; Feary et al., 2007), Canadá (Lavoie et al., 1998 e 2000; Kimberly et al., 2007; Dauvillier et al., 2006), Austrália (McClintock e Collins, 2004) e Europa (Deprez et al., 2005; Wuersch et al., 2006). Não existe informação sobre EPE em nenhum outro país. Entretanto, este fato não necessariamente indica ausência da enfermidade no resto do mundo, e sim que há restrita disponibilidade de testes de diagnóstico, bem como da não inclusão da EPE como diagnóstico diferencial em casos de diarreia em potros desmamados (Bihl, 2003).

Assim como em suínos, a EPE apresenta o período de incubação estimado entre 10 a

21 dias, e as fezes têm sido identificadas como fonte de disseminação da doença dentro de um rebanho, já que a *L. intracellularis* é capaz de sobreviver no meio ambiente por até duas semanas (Guedes e Gebhart, 2003b; Al-Ghamdi, 2003; Kimberly et al., 2007).

A maioria dos relatos de EPE tem sido de casos individuais, com exceção de um caso de surto no Canadá (Lavoie et al., 2000). A contaminação do equino, como em outras espécies susceptíveis, é por via fecal-oral (Lavoie et al., 2000; Lawson e Gebhart, 2000; Smith e Lawson, 2001; Bihl, 2003). Não é conhecido em equinos infectados a quantidade de bactérias eliminadas por grama de fezes (Al-Ghamdi, 2003; Wuersch et al., 2006), tão pouco a dose infectante mínima em animais susceptíveis.

A fonte de contaminação de potros pela *L. intracellularis* é atualmente desconhecida. Estudos usando a técnica de sequenciamento mostraram que a *L. intracellularis* que afeta suínos e hamsters é praticamente (99%) idêntica geneticamente à que afeta os equinos (Cooper et al., 1997a), o que demonstra que os suínos e outras espécies afetadas pela EP podem ser reservatórios da doença (Dauvillier et al., 2006). Dada a distribuição mundial da EP em suínos, enzoótica em 30% a 50% das granjas, estes poderiam ser considerados propagadores da doença, pois potros poderiam ser infectados experimentalmente quando inoculados, por via oral, com homogenado de intestino de suínos infectados (Al-Ghamdi, 2003). No entanto, não há confirmação dessa hipótese (Frank et al., 1998; Brees et al., 1999; Lavoie et al., 2000; Deprez et al., 2005; Kimberly et al., 2007).

Smith et al. (2000) consideraram a possibilidade de camundongos afetados pela EP serem reservatórios e disseminadores da bactéria para equinos. Feary et al. (2007) consideraram a possibilidade de cães serem potencialmente carreadores e fonte de infecção para equinos.

Al-Ghamdi (2003) identificou oito potros desmamados soropositivos para *L. intracellularis*, provenientes de três haras no EUA, entre 3 e 12 meses de idade, e somente um deles com lesões intestinais compatíveis com a EPE. Entretanto, nenhum dos haras era próximo a granjas de suínos.

Os relatos na literatura descrevem que a doença afeta mais comumente potros desmamados de três a 12 meses de idade (Frank et al., 1998; Smith, 1998; Brees et al., 1999; Al-Ghamdi, 2003; Wuersch et al., 2006), sendo mais freqüente em potros desmamados entre quatro e seis meses de idade (Duhamel e Wheeldon, 1982; Williams et al., 1996; Lavoie et al., 1998 e 2000; Frank et al., 1998; Schumacher et al., 2000; Bihl, 2003; McClintok e Collins, 2004; Dauvillier et al., 2006).

Diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento da EPE, como idade, estresse decorrente do desmame, vacinação, administração de anti-helmínticos e o manejo intensivo dos animais, além do tempo de exposição à bactéria, quantidade de bactéria a que o potro foi exposto e o estado imune do animal (Frank et al., 1998; Al-Ghamdi, 2003; Wuersch et al., 2006).

Al-Ghamdi (2003) demonstrou ser a EPE mais freqüente em potros no outono e no início de inverno. No entanto, não foi bem elucidado se isso reflete prevalência estacional, faixa etária ou práticas de manejo. O que demonstra a necessidade de estudos epidemiológicos da EP em equinos.

1.4. PATOGÊNESE

A compreensão da patogênese da EP é imprescindível para um melhor reconhecimento da doença. No entanto, em equinos, como nas outras espécies, a patogênese ainda possui compreensão rudimentar (Smith, 1998; Wuersch et al., 2006). Não existem na literatura estudos que especifiquem a seqüência do desenvolvimento das lesões de EP em equinos. Limitadas evidências sugerem que

a patogênese da EPE é similar à da EP em suínos.

O papel da *L. intracellularis* na etiopatogenia da EPE foi estabelecido por meio de um único estudo de reprodução da doença em eqüinos experimentalmente inoculados (Al-Ghamdi, 2003). Cinco potros de dois meses de idade foram inoculados com homogenado de mucosa intestinal de suínos infectados pela *L. intracellularis*, e um sexto potro foi inoculado com culturas puras desta bactéria. A presença da bactéria após inoculação com homogenado foi confirmada pela IHQ e/ou PCR. A reprodução da doença utilizando cultura pura foi confirmada por meio da presença das lesões macroscópicas e histológicas compatíveis com EP. Ainda neste experimento, foi demonstrado que o período de incubação da doença em eqüinos é de duas a três semanas, como em suínos (McOrist et al., 1996; Smith e McOrist, 1997; Cooper e Gebhart, 1998; Guedes e Gebhart, 2003b).

Assim como em suínos, a transmissão da bactéria ocorre por via oral-fecal (McOrist et al., 1995a,b; McOrist et al., 1996; Cooper e Gebhart, 1998; Smith e Lawson, 2001; Wuersch et al., 2006). Suínos infectados podem eliminar *L. intracellularis* nas fezes por até três semanas (Guedes et al., 2002c; Guedes e Gebhart, 2003c). Já em eqüinos não é conhecido como o microorganismo se mantém na população. Acredita-se que, assim como em suínos, a infecção intestinal, lesões proliferativas e a excreção persistam por aproximadamente quatro semanas, podendo persistir por até 14 semanas (Smith e McOrist, 1997; Lavoie et al., 2000; Kroll et al., 2005; Atherton e McKenzie III, 2006). A persistência da *L. intracellularis* pode ser facilitada pela ausência de reação inflamatória significativa e resposta imune limitada nos animais afetados (Smith e Lawson, 2001).

A *L. intracellularis* tem tropismo pelas células das criptas do intestino delgado (Cooper et al., 1997b; Lawson e Gebhart, 2000). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm elucidado alguns eventos da interação da *L. intracellularis* com as células intestinais

(Lawson et al., 1993; McOrist et al., 1995b e 1996). Há indícios de que possa haver uma associação de eventos que promova a penetração da bactéria na célula alvo (McOrist et al., 1997; McCluskey et al., 2002). Primeiramente, ocorre a interação entre antígenos de superfície da *L. intracellularis* e receptores específicos presentes na superfície externa apical do enterócito imaturo (McOrist et al., 1997), para que ocorra a penetração celular.

McOrist et al. (1997), em um estudo *in vitro*, demonstraram que em 10 minutos após exposição à *L. intracellularis*, a bactéria pode ser observada em íntimo contato com a membrana de enterócitos. Três horas após a inoculação é observada livremente no citoplasma de células infectadas e em multiplicação. A bactéria é detectada no citoplasma das células das criptas cinco dias após o início da infecção, em intensa replicação (Smith e Lawson, 2001; Guedes e Gebhart, 2003b). Cinco a 10 dias após infecção, protusões celulares repletas do microrganismo se rompem, liberando-o no meio da luz intestinal (Smith e Lawson, 2001). Após o período de incubação de três semanas, numerosas bactérias intracitoplasmáticas são visualizadas dentro das células epiteliais afetadas. A primeira lesão observada na infecção pela *L. intracellularis* é a hiperplasia da mucosa intestinal com progressiva substituição de enterócitos maduros, colunares e absorptivos das vilosidades, por células indiferenciadas, semelhantes às células das criptas intestinais (Smith e McOrist, 1997).

O exato mecanismo pelo qual a *L. intracellularis* penetra, interfere com o ciclo normal das células, se estabelece no trato gastrointestinal e estimula a hiperplasia das criptas é desconhecido (Smith e Lawson, 2001). Sabe-se que a hiperplasia de enterócitos está diretamente relacionada à presença da *L. intracellularis* (Rowland e Lawson, 1974; Lawson e Gebhart, 2000; Guedes, 2002; McCluskey et al., 2002). As criptas intestinais infectadas se dividem excessivamente, promovendo o alargamento e alongamento das criptas e hiperplasia marcante da mucosa, com pobre diferenciação dos enterócitos e atrofia dos

vilos (McOrist et al., 1997; Smith e Lawson, 2001). A mucosa intestinal torna-se seis vezes mais espessa, comparada a uma mucosa normal, resultando em má-absorção, reduzindo a eficiência alimentar, perda de proteínas e sinais clínicos associados a patologia (Smith e Lawson, 2001).

1.5. SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos foram relatados em potros desmamados, principalmente de três a 12 meses de idade (Williams et al., 1996; Lavoie et al., 1998; Brees et al., 1999; Schumacher et al., 2000; Bihl, 2003; Deprez et al., 2005; Atherton e McKenzie III, 2006; Sampieri et al., 2006; Feary et al., 2007), no entanto, os adultos ocasionalmente podem ser afetados (Feary et al., 2007).

Lavoie et al. (2000) demonstraram que o curso da doença é variável. Em casos agudos o curso da doença é de dois a 10 dias até o óbito, quando não tratados. Os potros infectados apresentam sinais clínicos variáveis, como cólica, diarreia aquosa e profusa, letargia, inapetência, rápida e severa perda de peso devido a má-absorção e perda de proteínas, anorexia, desidratação e edema ventral, podendo levar à morte do animal ou à presença de sinais crônicos, como condição corporal ruim, redução do ganho de peso e diminuição do crescimento (Duhamel e Wheeldon, 1982; Williams et al., 1996; Frank et al., 1998; Lavoie et al., 1998 e 2000; Lavoie e Drolet, 2002; Al-Ghamdi, 2003; Bihl, 2003; Deprez et al., 2005; Atherton e McKenzie III, 2006; Sampieri et al., 2006; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007). Sinais de febre e desidratação intensa também podem ser observados em potros intensamente afetados (Frank et al., 1998; Kimberly et al., 2007). Sinais de cólica com a presença de dor abdominal em graus variáveis são sinais precoces da doença característicos (Lavoie et al., 1998; Schumacher et al., 2000; Bihl, 2003). Morte súbita, diarreia hemorrágica e alta mortalidade são associados com sinais agudos e subagudos da doença (Frank et al., 1998). A forma subclínica da doença apresenta-se assintomática e caracterizada,

principalmente, por redução do desempenho (Al-Ghamdi, 2003).

Os equinos afetados apresentam alterações hematológicas de aumento do fibrinogênio plasmático, que indica uma resposta inflamatória, associada a outros parâmetros como leucocitose, neutrofilia, linfocitose e anemia (Brees et al., 1999, Frank et al., 1998, Lavoie et al., 2000; Al-Ghamdi, 2003; Sampieri et al., 2006, Macedo et al., 2008). As alterações bioquímicas se traduzem, principalmente, por intensa hipoproteïnemia com hipoalbuminemia, hipocloremia, hiponatremia, hipocalemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, hiperfosfatemia, azotemia e acidose metabólica. Além disto, observa-se aumento da concentração sérica de creatinina quinase, da atividade enzimática da aspartato amino transferase (AST) e do lactato desidrogenase (LHD) (Frank et al., 1998; Lavoie et al., 1998 e 2000; Brees et al., 1999; Al-Ghamdi, 2003; Bihl, 2003; Deprez et al., 2005; Sampieri et al., 2006; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007, Macedo et al., 2008).

Freqüentemente, o espessamento ileal pode ser visualizado na ultra-sonografia (Lavoie et al., 2000; Schumacher et al., 2000; Al-Ghamdi, 2003; Bihl, 2003; Sampieri et al., 2006). Os sinais clínicos nos animais experimentalmente inoculados por Al-Ghamdi (2003) foram semelhantes aos dos casos relatados e puderam ser observados a partir da terceira semana após inoculação.

A hipoproteïnemia, um dos sinais clínicos mais consistentes de um caso suspeito de EPE, e a persistente diarreia, presente nos potros infectados, são provavelmente resultantes da má-absorção e perda de proteínas pelo lúmen intestinal, atribuída primariamente à hiperplasia da mucosa e das criptas. No entanto, o catabolismo de proteínas para fornecimento de energia. A exsudação de proteínas para tecidos intestinais inflamados também podem contribuir para a hipoproteïnemia. A atrofia muscular e perda de peso são atribuídas a má-absorção de nutrientes e diminuição da ingestão de alimentos (Lavoie et al., 1998 e 2000; Bihl, 2003).

A hipoglicemia e aumento da concentração de creatinina quinase provavelmente refletem o estado catabólico que afeta os potros infectados, pois responderam ao tratamento parenteral e alimentação (Brees et al., 1999; Wuersch et al., 2006).

O aumento da concentração de creatinina quinase, AST e LHD indicam danos musculares (Lavoie et al., 2000; Wuersch et al., 2006). O nível elevado da uréia sanguínea associa-se à redução da perfusão renal em função da desidratação e aumento do catabolismo protéico. A hiponatremia, hipocloremia e anemia podem ser causadas pela deficiência de ferro em consequência da má-absorção intestinal. A hipocalcemia é provavelmente multifatorial e causada por perda de cálcio em fluidos gastrintestinais, baixa ingestão de cálcio, baixa absorção gastrintestinal. A elevação dos níveis de fosfatase alcalina são freqüentemente altos em eqüinos, refletindo o crescimento secundário dos ossos e enterites com oclusão parcial do ducto biliar (Wuersch et al., 2006).

1.6. PATOLOGIA

A *L. intracellularis* é uma bactéria intracelular obrigatória que habita células das criptas em proliferação do intestino delgado. As lesões macroscópicas são confinadas ao intestino delgado apresentando espessamento irregular do jejuno e do íleo, sendo o íleo a porção mais severamente afetada. No entanto, as lesões podem ser encontradas em qualquer segmento intestinal (Duhamel e Wheeldon 1982, Williams et al., 1996, Frank et al., 1998, Brees et al., 1999).

Os eqüinos afetados pela EP apresentam lesões que incluem parede intestinal espessada e irregular, edema e congestão de mesentério, mucosa espessada e rugosa com pregas evidentes. As lesões podem ser variáveis entre jejuno e íleo, podendo ser identificadas na porção média do jejuno áreas multifocais de espessamento discoidal e, na parte distal do jejuno e no íleo, espessamento difuso da mucosa de aspecto rugoso. Os animais podem apresentar, na macroscopia, edema transmural e lesões

ulcerativas focais (Schumacher et al., 2000; Al-Ghamdi, 2003; Kimberly et al., 2007).

Histologicamente, o intestino delgado apresenta-se com a mucosa irregular e difusamente espessada, caracterizado por hiperplasia do epitélio das criptas. A hiperplasia das criptas modifica a estrutura do epitélio, o que resulta na distorção e redução da estrutura dos vilos, com limitado desenvolvimento da borda em escova e diminuição da capacidade absorptiva, além de aumentar, nas áreas afetadas, o fluido proteináceo, restos celulares e neutrófilos (Duhamel e Wheeldon, 1982; Frank et al., 1998; Brees et al., 1999; Schumacher et al., 2000; Smith e Lawson, 2001; Bihl, 2003; Kimberly et al., 2007). As criptas intestinais apresentam-se alongadas, alargadas e distorcidas (Duhamel e Wheeldon, 1982; Brees et al., 1999; Kimberly et al., 2007) repletas de células epiteliais imaturas, enterócitos colunares pseudoestratificados, com citoplasma vacuolizado basofílico, núcleo grande e vesicular contendo nucléolo proeminente, figuras mitóticas freqüentes e redução do número de células globais nas criptas (Duhamel e Wheeldon, 1982; Frank et al., 1998; Brees et al., 1999; Smith e Lawson, 2001; Wuersch et al., 2006). Na lâmina própria visualiza-se um grande número de células mononucleares (plasmócitos e linfócitos, incluindo alguns macrófagos com citoplasma granular) e raras células gigantes multinucleadas (Brees et al., 1999; Lavoie et al., 2000; Al-Ghamdi, 2003). Há uma redução marcante do número de células calciformes nas criptas afetadas (Lawson e Gebhart, 2000) e redução funcional das células de Paneth (Duhamel e Wheeldon, 1982). Os linfonodos mesentéricos encontram-se difusamente edematosos e uniformemente hipercelulares e, em poucos linfonodos, os centros germinativos encontram-se pouco proeminentes na região cortical (Duhamel e Wheeldon, 1982).

Utilizando a técnica de coloração pela prata observa-se nas áreas afetadas, uma bactéria pequena e curva no citoplasma apical das células epiteliais em criptas afetadas. Lesões significativas não são observadas em outros tecidos (Williams et

al., 1996; Lavoie et al., 2000; Smith e Lawson, 2001; Wuersch et al., 2006).

1.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de eqüinos infectados por *L. intracellularis* é feito através da associação dos sinais clínicos com a realização de testes de diagnóstico para identificação da *L. intracellularis* (Al-Ghamdi, 2003).

O isolamento não deve ser considerado um método de diagnóstico de rotina, prático e eficiente, já que não se pode realizar o cultivo da bactéria em meio de cultura convencional, e somente algumas instituições de pesquisa realizam o cultivo da *L. intracellularis* (Lavoie et al., 2000). O isolamento e o cultivo da *L. intracellularis* são uns dos maiores desafios da bacteriologia, pois a bactéria é extremamente difícil de ser cultivada por requerer condições especiais, como meio específico, cultura de células de tecidos, reduzido oxigênio atmosférico (0-10%), em ambiente anaeróbios, a 37 °C por 5-7 dias (Lawson et al., 1993; McOrist et al., 1995a; Smith, 1998; Lawson e Gebhart, 2000; Schumacher et al., 2000; Al-Ghamdi, 2003).

O diagnóstico *post-mortem* é baseado nos achados macroscópicos e histopatológicos das lesões do intestino delgado (Duhamel e Wheeldon, 1982; Williams et al., 1996; Cooper et al., 1997b; Jensen et al., 1997; Frank et al., 1998; Smith, 1998; Schumacher et al., 2000; Al-Ghamdi, 2003; Deprez et al., 2005; Atherton e McKenzie III, 2006; Wuersch et al., 2006).

Exames de histopatológicos de rotina de fragmentos de intestino afetados em associação com a técnica de coloração pela prata (Warthin Starry, Young modificado ou Levaditi), para visualização em microscópio óptico da *L. intracellularis* no interior do citoplasma apical de enterócitos, é considerado um método de confirmação da doença (Rowland e Lawson, 1974; Williams et al., 1996; Cooper et al., 1997b; Frank et al., 1998; Lavoie et al., 1998 e 2000; Brees et al., 1999; Lavoie e Drolet, 2002; Al-Ghamdi, 2003; Bihr, 2003; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007).

O diagnóstico específico pode ser obtido através da utilização da IHQ em fragmentos de tecidos intestinais e PCR de mucosa intestinal (Williams et al., 1996; Smith, 1998). Al-Ghamdi (2003) utilizou o método de IHQ, considerado de alta sensibilidade, com anticorpos monoclonais e policlonais específicos para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003a) para detecção da bactéria em fragmentos de intestino parafinizados em estudo retrospectivo. Wuersch et al. (2006) demonstraram que a IHQ é o método de diagnóstico mais sensível comparado a outras técnicas. A técnica de IHQ em cortes histológicos, usando anticorpos específicos para *L. intracellularis*, demonstrou ser mais sensível que a coloração histológica de hematoxilina e eosina (HE), técnicas histoquímicas, como a coloração pela prata, e o PCR de amostras fecais (Guedes et al., 2002b).

A microscopia eletrônica é mais uma alternativa de diagnóstico utilizada para visualização de bacilos curvos ou retos no interior do citoplasma de enterócitos (Duhamel e Wheeldon, 1982; Williams et al., 1996; Frank et al., 1998).

Os métodos de diagnóstico *post-mortem* são limitados para investigação da epidemiologia da doença, prevalência e impacto econômico da EP, e apresentam como principal desvantagem a necessidade de coleta de material de animais que morreram ou foram sacrificados (Lavoie et al., 2000; Wuersch et al., 2006).

O diagnóstico *ante-mortem* requer elementos apropriados, como sinais clínicos da doença associados à presença da hipoproteinemia e à exclusão de doenças entéricas comuns em potros (Lavoie et al., 1998 e 2000; Lavoie e Drolet, 2002; Bihr, 2003; Atherton e McKenzie III, 2006; Dauvillier et al., 2006). A confirmação da EPE em animais vivos baseia-se na identificação do agente através de técnicas moleculares de diagnóstico, como PCR em material fecal (Frank et al., 1998; Brees et al., 1999; Lavoie et al., 2000; Smith e Lawson, 2001; Jacobson et al., 2004; Atherton e McKenzie III, 2006; Dauvillier et al., 2006) e testes sorológicos, como

imunofluorescência indireta em lâminas (IFA) (Lavoie et al., 2000), teste de imunoperoxidase em lâminas (IPX) e imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA) para identificação da titulação de anticorpos em amostras de soro (Guedes et al., 2002bc; Al-Ghamdi, 2003; Atherton e McKenzie III, 2006; Kimberly et al., 2007).

A sensibilidade e a especificidade de cada teste em eqüinos tem sido extrapolada da validação dos testes em suínos (Atherton e McKenzie III, 2006). Em suínos, o teste de PCR de fezes apresenta sensibilidade entre 39 e 67%, e testes sorológicos demonstram alta sensibilidade, de 90 a 91% (Guedes et al., 2002c).

O teste sorológico de IPMA foi validado com ponto de corte de 1:30 para suínos, especificidade de 100%, sensibilidade de 89% e a vantagem, em relação a IFA, de não requerer o uso de microscópio de fluorescência para interpretação dos resultados (Guedes et al., 2002b).

O uso da sorologia para diagnóstico da *L. intracellularis* em eqüinos infectados é promissor, pois permite a identificação de títulos de anticorpo com duas a três semanas após a contaminação (Lavoie et al., 2000; Huerta et al., 2003; Wuersch et al., 2006), embora a detecção do aparecimento do título de anticorpos possa ser tardia ao curso da doença (Deprez et al., 2005). A sorologia é um método de diagnóstico de grande importância para determinação da prevalência da doença na população de eqüinos (Lavoie et al., 2000; Kimberly et al., 2007).

A técnica qualitativa de PCR detecta o DNA da *L. intracellularis*, e, em amostras fecais, pode determinar se o eqüino suspeito está eliminando a bactéria no meio ambiente, sendo esta a melhor forma de identificar eqüinos vivos infectados. O PCR é um teste sensível e específico para detecção da *L. intracellularis*, especialmente quando realizado em mucosa intestinal afetada. No entanto, esta técnica é menos sensível nas fezes, ocorrendo resultados falso-negativos (Knittel et al., 1998).

Os diagnósticos diferenciais da EP em eqüinos estão relacionados com os sinais clínicos, principalmente de diarreia e hipoproteinemia, estando associadas a condições severas que podem resultar na perda de proteínas via trato gastrointestinal, incluindo helmintoses (*Strongylus spp.*, *Strongyloides westeri*), protozooses (*Criptosporidium spp* e *Giardia*); bacterioses (*Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, *Rhodococcus equi*; *Mycobacterium avium*; *Neorickettsia risticii*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus durans*, *Bacterioides fragilis*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter fetus*), viroses (Rotavírus, Coronavírus, Adenovírus, Parvovírus) (Bihl, 2003), agentes não infecciosos e doenças que resultam em enterocolites ulcerativas, enterites granulomatosas idiopáticas, gastroenterite eosinofílica e linfossarcoma intestinal (Frank et al., 1998; Smith, 1998; Brees et al., 1999; Lavoie et al., 2000; Lavoie e Drolet, 2002; Bihl, 2003).

Poucos laboratórios têm condições de identificação da *L. intracellularis*. É indispensável promover a melhora dos procedimentos de diagnóstico para aumentar a sensibilidade, confiabilidade, facilidade e rapidez na detecção desta bactéria, auxiliando no tratamento precoce da EPE (Al-Ghamdi, 2003).

1.8. TRATAMENTO

O tratamento da EPE é sintomático e as opções bem sucedidas no combate da doença incluem terapia de suporte através da administração endovenosa de fluidos e eletrólitos para correção da desidratação, suporte nutricional, transfusão de plasma para reduzir a perda de proteína, administração de antiinflamatórios como Flunixinina meglumina (0,25 mg/Kg p.v., intravenoso, três vezes por dia), dexametasona (Azium, 40 mg, via oral, diariamente, durante 14 dias) ou prednisona (1 mg/Kg p.v., via oral, diariamente durante 14 dias); protetores gastrintestinais como cimetidina ou sulcrafato; e antimicrobianos (Frank et al., 1998; Brees et al., 1999; Lavoie et al., 2000; Schumacher et al., 2000; Lavoie e Drolet, 2002; Al-Ghamdi, 2003; Bihl, 2003; Deprez et al., 2005;

Artheton e McKenzie III., 2006; Sampieri et al., 2006; Macedo et al., 2008).

O principal grupo de antimicrobianos comprovadamente eficientes no tratamento da EP em eqüinos é o dos macrolídeos. A antibioticoterapia mais indicada para potros infectados é à base de eritromicina (15-25mg/ Kg), administrada por via oral, a cada 6-8 horas, de forma isolada ou combinada com rifampicina (7-10 mg/ Kg) por via oral a cada 12 horas. Os antibióticos são administrados por, no mínimo, 21 dias (Lavoie et al., 1998 e 2000; Schumacher et al., 2000; Lavoie e Drolet, 2002; Bihl, 2003; McClintock e Collins, 2004; Deprez et al., 2005). Artheton e McKenzie III (2006) relataram a eficiência clínica de outros macrolídeos como a claritromicina (7,5 mg/Kg p.v., via oral, a cada 12 horas) e azitromicina (10 mg/Kg p.v., via oral, a cada 12 horas), como alternativas de tratamento da EPE em potros.

Outros antibióticos como o cloranfenicol (50 mg/kg p.v., via oral, a cada seis horas) (Lavoie et al., 1998 e 2000; Artheton e McKenzie III, 2006), clortetraciclina, doxiciclina (10 mg/Kg p.v., via oral, a cada 12 horas), penicilina, enrofloxacina e ampicilina (Artheton e McKenzie III, 2006) já foram utilizados com sucesso, mas não são considerados de escolha para o tratamento da EP em eqüinos (Schumacher et al., 2000; Artheton e McKenzie III, 2006).

Sampieri et al. (2006) demonstraram que o tratamento com tetraciclina, administrando oxitetraciclina (6,6 mg/Kg) administrada a cada 12 horas, IV, durante sete dias e por mais 10 dias administrando a doxiciclina (10mg/Kg) a cada 12 horas, ou administrando somente doxiciclina durante os 17 dias, foram consideradas terapias eficientes no combate da EPE, apresentando a vantagem dos antibióticos utilizados potencialmente mais baratos, quando comparada a terapia com macrolídeos.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para se conhecer antibióticos eficientes no controle e tratamento da EP em suíno, no entanto, em eqüinos não existem estudos

com esse objetivo. É preciso que novas pesquisas *in vivo* sejam realizadas para avaliar a eficácia de antimicrobianos, além das concentrações nas quais essas substâncias têm ação bactericida contra *L. intracellularis* em eqüinos. O prognóstico favorável dependerá de um tratamento de suporte e antibioticoterapia adequada e eficiente no combate a *L. intracellularis* (Lavoie et al., 1998).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ESTUDO RETROSPECTIVO

O estudo retrospectivo foi realizado a partir de amostras em blocos de parafina, provenientes de casos compilados de eqüinos com desordens entéricas, ocorridos na Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG) no período entre 1970 e 2006 e da UFLA no período de 2000 a 2007.

No setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG foram avaliadas aproximadamente 16.700 fichas, sendo somente selecionadas as fichas que continham informações sobre casos de envio de amostras ou necropsia de eqüinos, que mencionavam acometimentos enterocolíticos e citavam a análise histopatológica destes órgãos, com a possível presença dos respectivos blocos de parafina.

Inicialmente foram selecionados 91 casos de eqüinos com acometimento entérico. Posteriormente, foram selecionados os casos em que os blocos de parafina sugerissem que fossem fragmentos do estômago ou intestinos, restando 51 casos e totalizando 105 blocos.

Após a seleção dos blocos, foram realizados os cortes histológico em lâminas silanizadas. Durante este processamento, alguns fragmentos de tecido se soltaram, restando para leitura 86 lâminas. Destas 86, somente 35 lâminas, que representavam 26 diferentes casos, eram fragmentos de intestino ou estômago, sendo as demais de outros órgãos tubulares. Da UFLA foram enviados nove blocos de parafina com tecidos de animais provenientes de nove

casos com algum tipo de afecção gastroentérica.

Estes cortes foram submetidos a IHQ utilizando o método da Streptavidina Marcada (Dako¹), anticorpo policlonal contra *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003a) e solução de cromógeno de AEC (Amino Etil-carbazol) (Dako¹). Procedimento detalhado da técnica de IHQ se encontra no Anexo 1.

As preparações foram testadas em baterias que continham nove lâminas de casos selecionados e um controle positivo. Três casos foram considerados suspeitos, com um total de sete blocos, por apresentarem pequenas marcações no citoplasma de macrófagos da lâmina própria, de difícil diferenciação com marcação inespecífica. Destes blocos, foram feitas outras três preparações seriadas e as lâminas processadas pela mesma técnica, porém, em baterias de oito lâminas, sendo uma lâmina sabidamente positiva para *L. intracellularis* na IHQ como controle positivo e uma lâmina sem a presença da bactéria como controle negativo.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico da seguinte forma: duas pessoas analisaram as lâminas separadamente e, posteriormente, foram analisadas pelas duas pessoas juntas para comparação.

2.2. PESQUISA POR PCR EM FEZES E SOROLOGIA

2.2.1. Coleta de amostras

A pesquisa por PCR em fezes e sorologia foi realizada utilizando amostras de fezes e de soro de 223 eqüinos, provenientes de 14 propriedades localizadas no Estado de Minas Gerais e da Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG). Os haras submetidos a coleta de amostras estão localizados na região metropolitana de Belo Horizonte, especificamente dos municípios de Pedro

Leopoldo, Lagoa Santa, São Sebastião das Águas Claras, Nova Lima e Inhaúma.

A amostragem foi realizada durante o ano de 2007 até maio de 2008. Nos haras visitados foram obtidas informações sobre a propriedade como nome da propriedade e do proprietário, nome dos animais, idade, sexo, histórico de diarreia, período da ocorrência da diarreia, característica das fezes quando o animal apresentou diarreia, características das mucosas, escore corporal e característica das fezes no momento da coleta (Anexo 2). Durante a coleta das amostras foi realizado em cada animal avaliação clínica.

A coleta de amostras de fezes foi feita diretamente da ampola retal (Fig. 1), sendo armazenadas em sacos plásticos identificados com o número da amostra do animal. Após a coleta, as amostras de fezes foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFMG e armazenadas à - 20°C até serem testadas pela técnica de PCR, para detecção do DNA da *L. intracellularis*, como descrito por Jones et al. (1993). Destes animais também foram coletadas amostras de sangue, que foram centrifugadas para obtenção do soro, que foram refrigerados 4°C até a realização do teste sorológico.

¹ Dako, Carpinteria, CA, USA

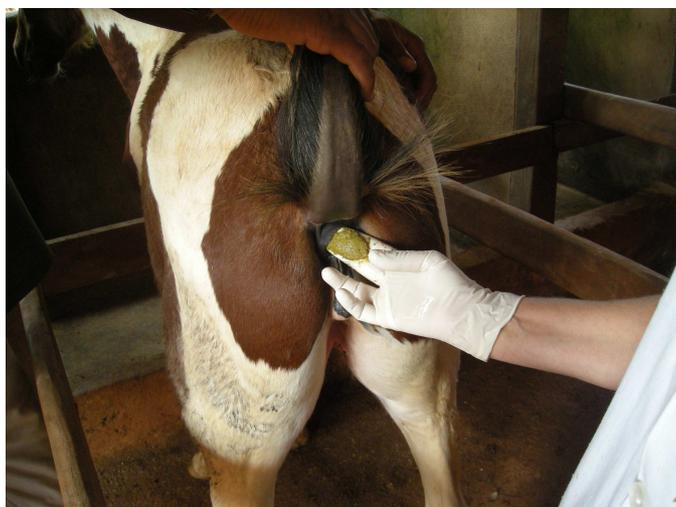


Figura 1 – Coleta de fezes diretamente da ampola retal do potro

2.2.2 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 Kit (#51504; Qiagen¹), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados iniciadores A e B complementares a 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 amplificações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, em termo-ciclador MiniCycler MJ Research. Para a reação de PCR, foram adicionados 25 µL em um microtubo de 1,5 mL: 1 µL de DNA bacteriano, 14 µL de água milique autoclavada, 10 x de tampão de PCR, 50 mM de MgCl₂, 2 mM de cada dNTP (Invitrogen²) que são os quatros nucleotídeos do DNA – adenina, citosina, guanina e timina, 20 mM de cada iniciador, e 5 U / µL de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec³). Água milique autoclavada foi usada

como controle negativo da PCR e, para o controle positivo, 200 µL de uma suspensão contendo 5×10^6 organismos de *L. intracellularis* por mL, adicionada a 0,18 g de fezes de eqüinos 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 a 95°C para ativar a Taq polimerase, seguida de 40 ciclos de 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 em gel de agarose a 2%, com 0,004 % de brometo de etídio e, posteriormente, visualizados em transiluminador com luz ultravioleta e fotografados com filme Polaroid.

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*.

¹ QIAGEN, Valencia, CA, USA

² Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

³ Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil

O procedimento de avaliação da sensibilidade analítica da técnica de PCR foi realizado utilizando uma suspensão de bactéria contendo 5×10^6 organismos de *L. intracellularis* / mL. As diluições seriadas foram feitas utilizando seis microtubos contendo 450 μ L de PBS (Solução salina fosfatada tamponada) estéril. No microtubo 1 foi adicionado 50 μ L de 10^6 organismos de *L. intracellularis* / mL, no microtubo 2 foi adicionado 50 μ L do microtubo 1, no microtubo 3 foi adicionado 50 μ L do microtubo 2 e assim sucessivamente, até o microtubo 6. Foram adicionadas 0,18 g de fezes oriundas de animais não infectados pela *L. intracellularis* em seis outros microtubos e adicionados 200 μ L de cada diluição. Posteriormente, foi feita amplificação do DNA das amostras conforme a técnica mencionada. As amostras amplificadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 2%, com 0,004% de brometo de etídio e, posteriormente, visualizados em transiluminador com luz ultravioleta e fotografados.

2.2.3 Sorologia

Foi utilizado para o teste sorológico a técnica de imunoperoxidase em lâminas de vidro, descrita por Al-Ghamdi (2003). Brevemente, 10 μ L de suspensão contendo $1,5 \times 10^6$ bactérias/mL, cepa VPB4 (isolado mantido e propagado no Laboratório de Enteropatia Proliferativa da University of Minnesota, Estados Unidos), foram adicionados a cada uma das 12 concavidades de uma lâmina de vidro (Perfecta¹) (Fig. 2). Estas lâminas foram secas em estufa (37°C) e, posteriormente, fixadas em acetona gelada (-20°C), por 20 segundos. As amostras de soro foram diluídas em PBS, em diluições seriadas (1:30 e 1:60). Após rehidratação das lâminas com PBS, 10 μ L das amostras diluídas foram adicionados a cada concavidade. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida por 45 minutos a 37°C e lavadas em PBS. Em seguida, 10 μ L de anticorpo anti-IgG de equino,

conjugado com peroxidase (Sigma²), 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 incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e foi adicionada solução de AEC diluída em tampão acetato e peróxido de hidrogênio, de acordo com as recomendações do fabricante (Sigma²), sendo incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram montadas com meio de montagem aquoso (Dako Faramount Aqueous Mounting Medium³) e examinadas em microscópio óptico. Foram utilizados controles positivos e negativos em cada lâmina. Para controle positivo foram utilizadas amostras de soro positivo, gentilmente 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. As amostras só eram consideradas positivas quando as bactérias fossem visualizadas nas preparações.

¹ Perfecta, São Paulo, SP, Brasil

² Sigma, St. Louis, MO, USA

³ Dako, Carpinteria, CA, USA USA

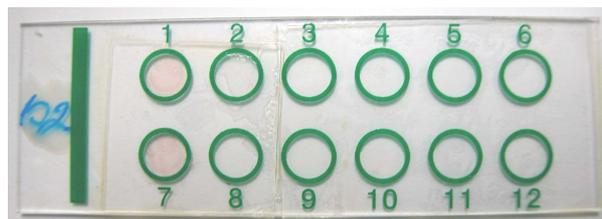


Figura 2 – Lâmina (Perfecta) para sorologia. 1: Controle positivo 1:30; 7: Controle positivo 1:60; 2 e 8: Controles negativos; 3 e 9, 4 e 10, 5 e 11, 6 e 12 para as amostras testadas nas diluições de 1:30 e 1:60, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ESTUDO RETROSPECTIVO

A avaliação dos fragmentos de tecidos dos três casos considerados suspeitos utilizando a técnica de IHQ não revelou nenhuma amostra positiva.

Segundo Williams et al. (1996) a técnica utilizada do anticorpo específico para *L. intracellularis* para detecção do antígeno em fragmento de tecido intestinal é considerada como um método de diagnóstico confiável e definitivo para EPE, o que garantiu que a escolha do teste fosse apropriada, permitindo a geração de resultados confiáveis.

Os 26 casos avaliados no Setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG eram provenientes de seis potros entre 1-30 dias de idade, um com 4 meses, outro com 11 meses, um potro de 27 meses de idade, três adultos de 5-6 anos e quatorze eqüinos sem informação da idade. Da UFLA foram avaliados nove casos provenientes de quatro eqüinos adultos, um potro de 7 dias de idade, dois potros de 2 meses de idade, e outros dois animais sem informação da idade.

A negatividade dos fragmentos de tecidos dos eqüinos com idade de 1-30 dias e dos adultos poderia ser explicada pelos relatos na literatura que demonstram que a faixa etária acometida pela EPE abrange animais na fase pós desmame (3-6 meses) até um ano de idade. Entretanto, potros de 4 e 11

meses de idade se enquadram nesta faixa etária, mas não foram detectadas marcação específica nos tecidos analisados. Estes resultados demonstram que dentre os casos do arquivo de blocos de parafina, não houve indicação de infecção pela *L. intracellularis*. Desta forma, aparentemente, a EPE não foi problema relacionado com mortalidade de animais em nossa região a partir de 1970. De qualquer forma, deve-se ressaltar que a casuística foi pequena e pouco representativa.

3.2. PESQUISA POR PCR EM FEZES E SOROLOGIA

Testes de diagnóstico ante mortem são necessários para identificação precoce da EPE, proporcionando aos clínicos aplicação de tratamento específico e eficiente. Testes sorológicos como imunoperoxidase em lâminas de vidro (IPX) são de alta sensibilidade para detecção da exposição de suínos à *L. intracellularis* (Guedes et al., 2002c), sendo a técnica de PCR considerada um método de diagnóstico de alta eficiência e alta especificidade (Williams et al., 1996; Frank et al., 1998; Knittel et al., 1998; Schumacher et al., 2000; Guedes et al., 2002c; Al-Ghamdi, 2003; Huerta et al., 2003; Deprez et al., 2005; Wuersch et al., 2006; Kimberly et al., 2007). Portanto, neste trabalho foram otimizadas e utilizadas as técnicas de sorologia (IPX), e PCR para identificação de eqüinos infectados.

A sensibilidade analítica da PCR em amostras de fezes no presente estudo foi de 5×10^3 organismos de *L. intracellularis*, demonstrando ser sensível e adequada para o diagnóstico ante-mortem.

Foram selecionados para coleta de amostras 150 animais jovens de 3 a 12 meses de idade, já que, baseado na literatura, esta é a faixa etária mais afetada pela EPE (Frank et al., 1998; Smith, 1998; Brees et al., 1999; Al-Ghamdi, 2003; Wuersch et al., 2006). Além disto, foram coletadas amostras de cinco potros de 45 a 60 dias de idade, de 51 potros de 13 a 24 meses e de 17 éguas na tentativa de identificar a doença em animais adultos e em potros acima e abaixo da idade especificada nos relatos de caso de EPE.

Após avaliação das 223 amostras, utilizando a sorologia e a técnica de PCR para detecção da exposição e infecção por *L. intracellularis*, identificou-se vinte e um eqüinos sorologicamente positivos (9,42%) (Fig. 3) e sete eqüinos positivos na técnica de PCR (3,14%)(Fig.4) (Tab.1).

A diluição de 1:60 foi escolhida como ponto de corte para positividade em eqüinos, pois as marcações na diluição de 1:30 apresentavam marcação inespecífica, mesmo no controle negativo. Além disto, a diluição de 1:60 vem sendo utilizada como ponto de corte no laboratório de Enteropatia Proliferativa da University of Minnesota (Gebhart, C.J, comunicação pessoal, 2007¹).

Dos vinte e um eqüinos considerados positivos na sorologia, dez tinham 5 e 12 meses de idade seis de 14 a 18 meses de idade e cinco eram éguas (Tab. 1).

A partir da soropositividade destes 21 animais pode se considerar a exposição prévia de eqüinos a infecção *pela L. intracellularis* em haras do Estado de Minas Gerais. Interessante a verificação de

soropositividade de animais acima de 13 meses de idade, que pode indicar infecção tardia subclínica ou persistência prolongada de anticorpos séricos contra *L. intracellularis* em eqüinos. Estudos em suínos inoculados indicam que os animais infectados com *L. intracellularis* eliminam a bactéria três a quatro dias após a contaminação e desenvolvem um padrão consistente de resposta de anticorpos, com títulos de imunoglobulinas séricas específicas detectáveis aproximadamente três semanas após infecção (Knittel et al., 1998;), podendo a soropositividade durar por até 13 semanas (Guedes et al, 2002a; Guedes e Gebhart, 2003). Al-Ghamdi (2003), ao reproduzir a EPE experimentalmente, relatou que a soroconversão no eqüino demora 14 dias após a inoculação, sem demonstração de sinais clínicos, no entanto não existem informações sobre a duração de destes anticorpos séricos no eqüino. Foram também coletas amostras de sangue e fezes dos potros filhos das éguas amostradas, mas nenhum destes potros de 45 dias a 5 meses de idade foi soropositivo ou estava eliminando bactéria nas fezes.

¹ Gebhart, C.J. Comunicação pessoal, 2007 (Laboratório de enteropatia proliferativa da University of Minnesota), USA.

Tabela 1 – Amostras positivas (pos) na sorologia e na PCR, relacionadas as informações da origem, idade dos animais avaliados (meses), histórico de diarreia, característica das fezes no momento da coleta, porcentagem de amostras positivas na sorologia e na PCR / haras.

Amostra	Haras	Nº amostras/ haras	Sexo	Idade	Histórico de Diarreia	Características das Fezes na coleta	Resultado Sorologia	PCR	% de amostras pos. sorologia / haras	% de amostras pos. PCR / haras
1	A	13	F	5 m	Não	Pastosa	pos	neg	7,69	0,00
39			F	7-8 m	Diarreia do cio do potro	Normais	neg	pos		
42	D	28	F	8-9 m	Não	Normais	pos	neg	3,57	10,71
47			M	8-9 m	Não	Normais	neg	pos		
52			F	7-8 m	Não	Normais	neg	pos		
Mãe 83	I	16	F	ADULTO	Não	Normais	pos	neg	6,25	0,00
92			F	12 m	Diarreia com 1 m idade	Normais	neg	pos		
93			F	13 m	Diarreia com 2 m idade	Normais	neg	pos		
94			F	14 m	Diarreia com 2 m idade	Normais	pos	neg		
97	J	24	F	15 m	Diarreia antes de desmamar	Normais	pos	neg	16,67	12,50
102			F	5-6 m	Não	Normais	pos	neg		
107			F	16 m	Não	Pastosa	neg	pos		
110			F	5 m	Não	Normais	pos	neg		
124	K	12	F	5 m	Não	Normais	neg	pos	8,33	8,33
Mãe 121			F	ADULTO	Não	Normais	pos	neg		
130			F	7 m	Não	Normais	pos	neg		
141			F	8 m	Não	Normais	pos	neg		
157	L	55	M	6 m	Não	Normais	pos	neg	9,09	0,00
172			M	14 m	Não	Normais	pos	neg		
176			F	8 m	Não	Normais	pos	neg		
187			M	18 m	Não	Normais	pos	neg		
191			M	17 m	Diarreia com 2-3 m idade	Normais	pos	neg		
Mãe 201	M	38	F	ADULTO	Não	Normais	pos	neg	13,16	0,00
Mãe 202			F	ADULTO	Não	Normais	pos	neg		
Mãe 203			F	ADULTO	Não	Normais	pos	neg		
214			M	5-6 m	Não	Normais	pos	neg		
216	EV-UFGM	3	M	15 m	Diarreia antes de desmamar	Normais	pos	neg		
217			F	12 m	Não	Normais	pos	neg		

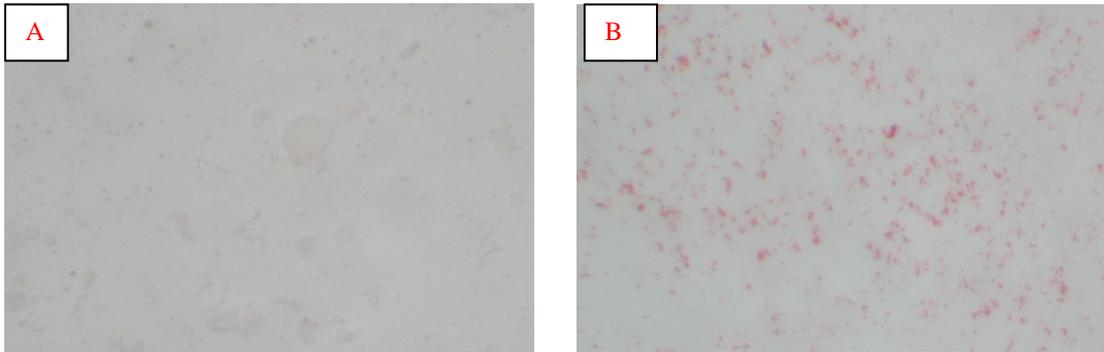


Figura 3 - Fotomicrografia de preparação negativa (A) e positiva, 1:60, (B) à sorologia utilizando a técnica de imunoperoxidase em lâminas para detecção de anticorpos contra *L. intracellularis*. Estruturas de cor vermelha são bactérias positivamente marcadas por anticorpos presentes no soro de animais positivos (400x).

Praticamente todos os casos de EPE relatados na literatura cita que os animais com sorologia positiva apresentavam sinais clínicos da doença, como a presença de diarreia. No entanto, os animais sorologicamente positivos neste estudo estavam aparentemente normais, indicando exposição prévia a bactéria, mas sem indícios da doença.

Estes achados podem indicar soropositividade mais longa que o período de infecção ou a presença de animais subclínicamente infectados. Apenas quatro potros, todos acima de 12 meses de idade (um de 14 meses, dois de 15 meses e um de 17 meses de idade), dos vinte e um eqüinos sorologicamente positivos, tinham histórico de diarreia anterior. Ou seja, existe a possibilidade de terem desenvolvido a forma clínica leve da EP e terem se recuperado, lembrando todavia que esta diarreia poderia ter tido outra causa que não a infecção por *L. intracellularis*.

Nenhum dos animais soropositivos apresentou eliminação da bactéria nas fezes de acordo com os resultados da PCR. Estes resultados poderiam ser explicados ou pela menor sensibilidade da técnica de PCR comparado ao teste sorológico e/ou por estes animais já terem parado de eliminar bactérias nas fezes. A menor sensibilidade do teste de PCR em amostras de fezes se justifica pela presença de

inibidores neste material, que são moléculas inativadoras de DNA polimerase, que causam degradação ou captura de ácidos nucléicos ou interferem com a lise celular durante o processo de extração (Jones et al., 1993; Knittel et al., 1998; Jacobson et al., 2003 e 2004; Sampieri et al., 2006; Wuersch et al., 2006).

A técnica de PCR identificou sete animais positivos, sendo estes das seguintes idades: cinco animais com 5 a 12 meses de idade, um com 13 meses e um com 16 meses de idade (Tab. 1 e Fig. 4). Esta detecção de eliminação de *L. intracellularis* nas fezes comprova que o agente está presente e infecta eqüinos na região estudada.

Nenhum dos animais deste estudo apresentaram qualquer tipo de alteração clínica. Dos sete eqüinos positivos na técnica de PCR, três animais (7-8 meses, 12 e 13 meses de idade) apresentaram histórico de diarreia antes do desmame, porém as fezes no momento da coleta estavam normais. A detecção de eliminação da bactéria nas fezes de animais sadios é informação de grande relevância epidemiológica, uma vez que a disseminação do agente pode ocorrer de maneira silenciosa no rebanho, o que torna seu controle mais difícil. Esta forma subclínica da infecção já foi comprovada em suínos (Paradis et al., 2005).

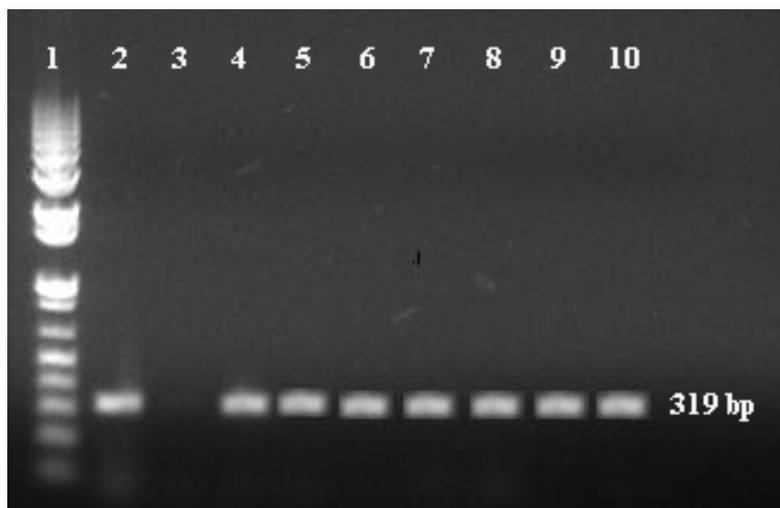


Figura 4 - Eletroforese em gel da agarose de produto da amplificação para *L. intracellularis* em amostras de fezes de potros. Coluna 1: Peso molecular padrão; Coluna 2 Controle positivo; Coluna 3: Controle negativo; Coluna 4-10: Amostras positivas

Os sete eqüinos positivos na PCR estavam distribuídos em três haras, sendo três animais do haras D, três do J e um potro no haras K. Os três eqüinos positivos no haras D representam 10,71% das amostras coletadas nesta propriedade e os três animais do haras J representam 12,5%.

Todos os eqüinos PCR positivos tiveram resultados negativos à sorologia. Estes resultados poderiam ser explicados caso os animais estivessem em estágio inicial da infecção e ainda não tivessem desenvolvido títulos detectáveis de anticorpos à sorologia, ou tivessem apresentando títulos baixos de anticorpos séricos que não seriam detectados pela técnica sorológica utilizada.

Diferentemente do descrito na literatura que relata a maioria dos casos em animais até um ano de idade (Duhamel e Wheeldon, 1982; Williams et al., 1996; Frank et al., 1998; Smith, 1998; Brees et al., 1999; Lavoie et al., 2000; Schumacher et al., 2000; Al-Ghamdi, 2003, Bihl, 2003; Wuersch et al., 2006), dois eqüinos, um de 13 e outro de 16 meses de idade, ambos do mesmo propriedade (haras J) (Tab. 1), estavam infectados por *L. intracellularis* e eliminando bactérias na fezes (PCR positivo). O animal de 16 meses apresentava fezes pastosas. Assim sendo,

podem existir fatores predisponentes que poderiam estar associados ao desencadeamento da infecção e doença. Dentre as possibilidades incluem-se o tempo de exposição a bactéria, quantidade de bactéria a que o animais foram expostos e o status imune do animal.

Dos 14 haras incluídos na pesquisa, sete possuíam animais positivos pela técnica de PCR e/ou sorológica. Os vinte e um eqüinos positivos na sorologia estavam distribuídos em sete haras e no hospital da EV-UFGM, sendo que em um único haras (J) foram encontrados quatro animais soropositivos, o que corresponde 16,67% das 24 amostras coletadas neste haras (Tab. 1). Além disto, foi o haras que apresentou as maiores porcentagens de animais positivos tanto na PCR (12,5%), o que demonstra ser este um rebanho candidato para o estudo aprofundado para averiguação dos fatores predisponentes para infecção da *L. intracellularis*.

Na escola de veterinária da UFMG foram coletadas amostras de fezes e soro de quatro potros hospitalizados e desses equinos, três apresentaram-se sorologicamente positivos. Importante salientar que estes animais estavam internados por motivos outros que não diarreia. Estes animais tinham 5-6 meses, 12 meses, 15 e 16 meses de idade. Apenas o equino de 15 meses apresentava histórico de diarreia antes do desmame e todos os quatro equinos apresentavam se com as fezes normais no momento da coleta. Uma das possibilidades a ser considerada neste caso seria uma imunossupressão destes animais em decorrência de outra condição e a predisposição à infecção subclínica por *L. intracellularis*.

A identificação de potros desmamados positivos na sorologia e/ou PCR indicam que a mudança da microbiota normal do intestino, induzida pelo desmame, pode resultar em uma maior susceptibilidade de potros à doença, corroborando o que há na literatura. Outro argumento para susceptibilidade dos equinos no desmame seria a remoção do leite da dieta desses animais, pois o leite teria componentes moleculares como a secreção de IgA, citoquinas, lactoferrina, oligossacarídeos, nucleotídeos, lisozima e outras proteínas que conferem proteção intestinal (Kelleher e Lonnerdal, 2001).

Três potros de 45 a 60 dias de idade, soronegativos e PCR negativos, apresentaram diarreia poucos dias antes da coleta e foram tratados com antibióticos. Desta forma, aspecto importante que deve ser levado em consideração casos esses potros estivessem infectados pela *L. intracellularis* é a interferência da antibioticoterapia na eliminação da bactéria nas fezes, após o início do tratamento. Dauvillier et al. (2006) demonstraram que o DNA da *L. intracellularis* foi identificado na amostra de fezes dois dias após o início da administração da eritromicina, mas não após quatro dias de início do tratamento, sugerindo então que a infecção de potros é mínima através da contaminação ambiental pelas fezes, uma vez que o tratamento com antibióticos tenha se iniciado possivelmente

a contaminação e excreção da bactéria durante todo o período da terapia se reduz dificultando a identificação de animais positivos.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a *L. intracellularis*, causadora da EPE, está presente na população equina dos haras do Estado de Minas Gerais e, portanto, deve ser considerada como diagnóstico diferencial para doenças entéricas em equinos de várias idades. As técnicas de diagnóstico *ante mortem* de sorologia e PCR se mostraram eficientes para detecção da *L. intracellularis* e estão disponíveis para auxiliar os médicos veterinários na detecção precoce da doença, tornando possível a realização de um tratamento de sucesso para EPE. A avaliação retrospectiva de casos nos arquivos dos laboratórios de histopatologia, apesar da reduzida amostragem, aparentemente demonstrou que a enfermidade não foi causadora de óbitos nos casos avaliados no passado recente no estado de Minas Gerais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-GHAMDI, G. *Characterization of proliferative enteropathy in horses*. 2003. 157f. Tese (PhD em Clínica). Programa de pós-graduação em Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, Minnesota, USA.
- ATHERTON, R.P.; MCKENZIE III, H.C. Alternative antimicrobial agents in the treatment of proliferative enteropathy in horses. *J. Equine. Vet. Sci.*, v.26, 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 weanling foal. *Can. Vet. J.*, v.44, p-65-66, 2003.
- BREES, J.; SONDRHOFF, A.H.; KLUGE, J.P. et al. *Lawsonia intracellularis*-like organism infection in a miniature foal. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, n. 4, p. 511-514, 1999.
- COOPER, D.M.; GEBHART, C.J. Comparative aspects of proliferative enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 212, p. 1446-1451, 1998.
- COOPER, D.M.; SWANSON, D.L.; BARNES, S.M. et al. Comparison of the 16S ribosomal DNA sequence from the intracellular agent of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 47, n. 3, p. 635-639, 1997a.
- COOPER, D.M.; SWANSON, D.L.; GEBHART, C. J. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer, and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. *Vet. Microbiol.*, v. 54, p. 47-62, 1997b.
- 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, p. 774-776, 2005.
- DROLET, R., LAROCHELLE, D., GEBHART, C.J. Proliferative enteritis in white – tailed deer. *J. Vet. Diag. 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, n. 1, p. 136-139, 1981.
- ERICKSEN; LANDSVERK, K. T.; BRATBERG, B. Morphology and immunoperoxidase studies of intestinal adenomatosis in the blue fox, *Alopex lagopus*. *J. Comp. Pathol.*, v. 102, p. 265-278, 1990.
- FEARY, D.J.; GEBHART, C.J.; PUSTERLA, N. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a foal. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, v. 149, n. 3, p. 129-133, 2007.
- 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.
- FRANK, N; FISHMAN, C.E.; GEBHART, C.J. et al. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal. *Equine Vet. J.*, v.30, n. 6, p. 549-552, 1998.
- GEBHART, C.J.; JONES, G.F.; McORIST, S. et al. Porcine proliferative enteropathy: Etiology and diagnosis. *Swine Health and Production.*, v.1, n. 6, p. 24-25, 1993.

- GUEDES, R. M. C. *Porcine proliferative enteropathy: diagnosis, immune response and pathogenesis*. 2002. 261f. (PhD Thesis). St. Paul: University of Minnesota.
- GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diag. Invest.*, v. 15, n. 5, p. 438-446, 2003a.
- GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Comparison of intestinal mucosal homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet. Microbiol.*, v. 93, p. 159-166, 2003b
- 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, 2003c.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; WINKELMAN, N.A. 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. Diag. 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. Diag. Invest.*, v. 14, p. 528-530, 2002b.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; WINKELMAN, N.A. et al. Comparison of different methods for diagnosis of Porcine Proliferative Enteropathy. *Can. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 99-107, 2002c.
- HERBST, W.; HERTRAMPF, B.; SCHMITT, T. et al. Diagnosis of *Lawsonia intracellularis* using the polymerase chain reaction (PCR) in pigs with and without diarrhea and other animal species. *Dtsch. Tierarzti. Wochenschr.*, v. 110, n. 9, p. 361-364, 2003.
- 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. Pathol.*, v. 129, p. 179-185, 2003.
- JACOBSON, M.; EBGLUND, S.; BALLAGI-PORDANY, A. et al. The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory factors in feces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diag. Invest.*, v. 15, p.268-273, 2003.
- JACOBSON, M.; ASPAN, A.; KONOSSON, 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.
- JENSEN, TK.; MOLLER, K.; SESER, T.D. et al. Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy. *Eur. J. Vet. Pathol.*, v. 3, p. 115-123, 1997.
- JOHNSON, E. A.; JACOBY, R. O. Transmissible ileal hyperplasia of hamsters. *Am. J. Pathol.*, v. 91, n. 3, p. 451-459, 1978.
- JONES, G. F.; WARD, G. E.; MURTAUGH, G.; et al. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, *Ileal symbiont intracellularis*, in feces by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 10, p. 2611-2615, 1993.
- KELLEHER, S.L.; LONNERDAL, B. Immunological activities associated with milk. *Adv. Nut. Res.*, v, 10, p. 39-45, 2001.

- KIMBERLY, M.; McGURRIN, J.; MODEST VENGUST. et al. An outbreak of *Lawsonia intracellularis* infection in a standardbred herd in Ontario. *Can. Vet. J.*, v. 48, p. 927-930, 2007.
- 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.
- KROLL, J.J.; ROOF, M.B.; HOFFMAN, J.L. et al. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Res. Reviews.*, v.6, n. 2, p. 173-197, 2005.
- LAVOIE, J.P.; PARSONS, D; DROLET, R. Proliferative enteropathy in foals: A cause of colic, diarrhea, and protein-losing enteropathy. *AAEP Proceedings.*, v.44, 1998.
- LAVOIE, J.P.; DROLET, R.; PARSONS, D. et al. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhea, and hipoproteinemia in foals on three breeding farms in Canada. *Equine Vet. J.*, v.32, p. 418- 425, 2000.
- LAVOIE, J.P.; DROLET, R. Proliferative enteropathy in foals. In: Mair, T; Divers, T; Ducharme, N. Manual of equine gastroenterology. 1st ed. WB Saunders pp, 2002. p. 508-509.
- LAWSON, G.H.K.; GEBHART, C. J. Proliferative enteropathy: review. *J. Comp. Pathol.*, v. 122, p. 77-100, 2000.
- LAWSON, G. H. K.; McORIST, S.; JASNI, S. et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 5, p. 1136-1142, 1993.
- LEBLANC, B.; FOX, J. G.; LE NET, J. L. et al. Hyperplastic gastritis with intraepithelial *Campylobacter*-like organism in a beagle dog. *Vet. Pathol.*, v. 30, p. 391-194, 1993.
- LEMARCHAND, T. X.; TULLY, T. N.; SHANE, S. M. et al. Intracellular *Campylobacter*-like organisms associated with rectal prolapse and proliferative enteropathy in emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.*, v. 34, p. 152-156, 1997.
- MACEDO, N.R.; AL-GHAMDI, G.; GEBHART, C.J. et al. Enteropatia proliferativa em eqüinos. *Cienc. Rural.*, v.38, n.3, p.889-897, 2008.
- McCLINTOCK, S.A.; COLLINS, A.M. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal in Australia. *Aust. Vet. J.*, v.82, p. 750-752, 2004.
- McCLUSKEY, J.; HANNIGAN, J.; HARRIS, J. D. et al. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection in vitro and in vivo. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 6, p. 2899-2907, 2002.
- McORIST, S., GEBHART, C.J. Porcine proliferative enteropathies. In: STRAW, B.E., ALLAIRE, S.D., MENGELING, W.L. (Ed.) Disease of swine, 8. ed. Iowa State University Press Ames, 1999. p. 521-534.
- 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, 1995a.
- 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.; JASNI, S.; MACKIE, R.A. 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.; MACKIE, R.A.; LAWSON, G.H.K. Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.5, p.1314-1317, 1995c.
- McORIST, S.; MACKIE, R. A.; LAWSON, G. H. K. et al. In vitro interactions of *Lawsonia intracellularis* with cultured enterocytes. *Vet. Microbiol.*, v. 54, p. 385-392, 1997
- McORIST, S.; ROBERTS, L.; JASNI, S. et al. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic mechanisms. *J. Comp. Pathol.*, v. 115, p. 35-45, 1996.
- PARADIS, M.A.; MCKAY, R.I.; WILSON, J.B. et al. Subclinical ileitis produced by sequential dilutions of *Lawsonia intracellularis* in a mucosal homogenate challenge model. In: American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting, 2005, Minneapolis. *Anais...* Minneapolis, 2005. p. 189-191.
- 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.
- SAMPIERI, F.; HINCHCLIFF, K.W.; TORIBIO, R.E. Tetracycline therapy of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in foals. *Equine. Vet. J.*, v.38, n.1, p. 89-92, 2006.
- SCHUMACHER, J.; SCHUMACHER, J.; ROLSMA, M. et al. Surgical and medical treatment of an Arabian filly with proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Int. Med.*, v.14, p. 630-632, 2000.
- SMITH, D.G.E. Identification of equine proliferative enteropathy. *Equine Vet. J.*, v. 30, n. 6, p. 452-453, 1998.
- SMITH, D.G.E.; LAWSON, G.H.K. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.*, v.82, p. 331-345, 2001.
- SMITH, S. H.; McORIST, S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res. Vet. Sc.*, v. 62, p. 6-10, 1997.
- SMITH, D. G. E.; MITCHELL, S. C.; NASH, T. et al. Gamma interferon influences intestinal epithelial hyperplasia caused by *Lawsonia intracellularis* infection in mice. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 12, p. 6737-6743, 2000.
- VANDENBERGHE, J.; VERHEYEN, A.; LAUWERS, S. et al. Spontaneous adenocarcinoma of the ascending colon in Wistar rats: the intracytoplasmic presence of a *Campylobacter*-like bacterium. *J. Comp. Pathol.*, v. 95, p. 45-55, 1985.
- 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.
- WUERSCH, K.; HUESSY, D.; KOCH, C. et al. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a filly. *J. Vet. Med.*, v.53, p. 17-21, 2006.

6. ANEXO

ANEXO 1

PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA PARA *LAWSONIA INTRACELLULARIS*

1. Xilol: 5 min
2. Xilol: 5 min
3. Xilol: 5 min
4. Álcool 100%: 5 min
5. Álcool 96%: 3 min
6. Álcool 70%: 3 min
7. Água destilada: 3 min
8. PBS H₂O₂ 3% (block PX endóg): 15 min
9. Lavar com água destilada
10. Proteinase K (20 µg/mL): 5 min à 37°C (câmara úmida)
11. Lavar em água de torneira: 10 min
12. PBS Tween 20 0,05% (PBST): 5 min
13. Leite em pó Molico (0,5g-20mL): 40 min RT (câmara úmida)
14. Incubar policlonal (1:30.000): 30 min 37°C (câmara úmida)
15. PBST: 5 min
16. Anticorpo biotilado **1**: 30 min RT (câmara úmida)
17. PBST: 5 min
18. Streptavidin-HRP **2**: 25 min RT (câmara úmida)
19. PBST: 5 min
20. Solução AEC (pronta para uso): 10 min RT (câmara úmida)
21. Lavar com água destilada: 5 min
22. Água de torneira corrente: 5 min
23. Hematoxilina de Mayer's: 2-5 min
24. Lavar em água de torneira: 5 min
25. Montar lamínula usando meio aquoso

