

MICHELLE DE PAULA GABARDO

***LAWSONIA INTRACELLULARIS*: ESTUDO DA TRANSMISSÃO
INTERESPÉCIES E DA UTILIZAÇÃO DO FLUIDO ORAL NA DETECÇÃO
DE IMUNOGLOBULINAS**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Roberto M.C.Guedes
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Augusto Vannucci
Área de concentração: Patologia Animal

Belo Horizonte/MG
Escola de Veterinária - UFMG
Agosto de 2015

G1121

Gabardo, Michelle de Paula, 1984-

Lawsonia intracellularis: estudo da transmissão interespécies e da utilização do fluido oral na detecção de imunoglobulinas / Michelle de Paula Gabardo. – 2015. 92 p. : il.

Orientador: Roberto M. C. Guedes

Coorientador: Fábio Augusto Vannucci

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 2. Suíno – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Imunohistoquímica – Teses. 5. Patologia veterinária – Teses. 6. Epidemiologia – Teses. I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II. Vannucci, Fábio Augusto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

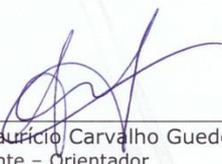
CDD – 636.089 607

FOLHA DE APROVAÇÃO

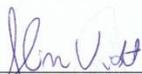
MICHELLE DE PAULA GABARDO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Patologia Animal.

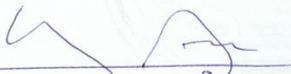
Aprovada em 28 de Agosto de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes
Presidente – Orientador



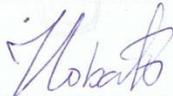
Prof. Aline de Marco Viott
Universidade Federal do Paraná- UFPR



Prof. Geraldo Camilo Alberton
Universidade Federal do Paraná- UFPR



Prof. Roselene Ecco
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Zélia Inês Portela Lobato
Escola de Veterinária - UFMG



Dedico este trabalho aos meus pais, Bertolino e Maria de Fátima.
Que sempre incentivaram e auxiliaram na minha formação e que são tudo para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos espíritos de luz que me acompanharam, ajudaram e ampararam por todo o caminho.

A minha família, que entendeu a distancia, os momentos de ausência e que me deu suporte para passar por essa etapa. Sem eles nada seria possível. Agradeço aos meus pequenos, que a cada foto e a cada dia me fazem mais feliz, a tia mesmo longe ama vocês.

Agradeço a minha nova “família” (FEAK) que me acolheu com carinho, e que me deu conhecimento, conforto e força na hora de maior dificuldade. Vou levar vocês e seus sorrisos no coração para sempre.

À todas as pessoas que passaram pela minha casa nesses quatro anos, cada uma com um pouquinho a mais a acrescentar. Em especial a Tamara Castro, Pamela Furini, Cacilda Cavalcante e Luciano Carvalheira, que fizeram minhas noites mais gordas e mais cheias da alegria.

Agradeço ao meu orientador Prof. Roberto Guedes pela oportunidade. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, experiência e exemplo de profissional e pessoa. A Profa. Roselene Ecco pelos conhecimentos e amizade nesses quatro anos. Aos demais professores do setor de patologia veterinária pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço aos amigos, técnicos e funcionários do laboratório e dos diferentes departamentos da Escola de Veterinária. Se for citar o nome de todos que me acompanharam, ajudaram e me deram apoio nesse período do Doutorado, encheria tantas páginas quanto essa tese e correria o risco de esquecer alguém. Mas em especial agradeço à Eliana Paladino, Saira Neves, Juliana Saes, Ana Patrícia Carvalho, Auricélio de Macedo, Érica Costa, Izabele Behfeld, Grazi Cossenzo, Cintia Randt, Juneo Silva, Karine Damacedo, Karem Maciel, Mariana Andrade, Amanda Gabrielle, José Paulo Sato, Matheus Loes e Juliana Fortes, Dyeime e Marília Sousa e Adão que foram mais que companheiros de trabalho, foram amigos. Acredito que só a palavra amigo por si só já diz tudo. Muito obrigada a Leimar Marques por ser minha mãe, amiga e psicóloga de BH.

À equipe do professor Roberto, mestrandos, doutorandos, técnicos e ICs, que tanto me ajudaram durante os períodos de experimentos, os tornados mais leves e mais divertidos. Não conseguiria nada sozinha, obrigada!

Ao médico veterinário José Eustáquio pela ajuda nas coletas a campo. Aos funcionários da Granja Pau Preto e Fazenda Igarapé pela ajuda na captura dos roedores.

A Universidade Federal de Minas Gerais –UFMG e a Escola de Veterinária muito obrigada por me acolher durante os quatro anos de doutorado. Agradeço a Capes, ao CNPq e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
HIPÓTESES	15
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO 1: Revisão de literatura.....	16
1.1. <i>Lawsonia intracellularis</i> e patogênese.....	16
1.2. Modelos experimentais para avaliação da doença.....	18
1.3. Enteropatia proliferativa em suínos.....	18
1.3.1. Aspectos clínicos e patológicos.....	18
1.3.2. Aspectos epidemiológicos	19
1.3.3. Soro perfil e soro prevalência.....	21
1.3.4. Diagnóstico.....	22
1.4. Técnicas de detecção de agentes e anticorpos através de fluido oral...	24
1.5. Referências.....	28
CAPITULO 2 Avaliação do envolvimento de Camundongos (<i>Mus musculus</i>) na epidemiologia da Enteropatia Proliferativa Suína.....	37
Resumo.....	37
Abstract.....	38
2.1. Introdução.....	39
2.2. Material e métodos.....	40
2.2.1. Comitê de ética.....	40
2.2.2. Fase 1 – Amostras de campo.....	40
2.2.3. Fase 2 - Fase experimental.....	40
2.2.3.1. Animais.....	41
2.2.3.2. Etapa 1.....	41
2.2.3.3. Etapa 2.....	42
2.2.3.4. Avaliações macroscópica, histológica e imuno- histoquímica.....	44
2.2.5. Extração de DNA e reações de PCR.....	44
2.3. Resultados.....	45
2.3.1. Amostra de campo.....	45
2.3.2. Fase experimental	45
2.3.3. Etapa 1.....	45

	2.3.4. Etapa 2.....	47
	2.4. Discussão.....	48
	2.5. Conclusão.....	51
	2.6. Referência.....	52
CAPITULO 3	Detecção de anticorpos anti- <i>Lawsonia intracellularis</i> em fluidos orais de suínos experimentalmente inoculados.....	55
	Resumo.....	55
	Abstract.....	56
	3.1. Introdução.....	57
	3.2. Material e método.....	57
	3.2.1. Animais e delineamento experimental.....	57
	3.2.2. Preparação do inóculo e inoculação.....	58
	3.2.3. Avaliação clínica e coleta de amostras.....	58
	3.2.4. Análise do soro e fluido oral.....	58
	3.2.5. Avaliação macroscópica.....	59
	3.2.6. Análise estatística.....	59
	3.3. Resultados.....	59
	3.3.1. Animais einoculação.....	59
	3.3.2. Imunoperoxidase em monocamada de célula em soro e fluido oral.....	61
	3.3.3. Avaliação anatomopatológica	61
	3.4. Discussão.....	65
	3.5. Conclusão.....	67
	3.6 Referência.....	68
	Conclusões gerais.....	71
ANEXO 1	Detecção de <i>Lawsonia intracellularis</i> em fezes de cães no Brasil.....	72
	Resumo.....	72
	Abstract.....	72
	1. Nota.....	73
	2. Referência.....	75
ANEXO 2	Enteropatia proliferativa equina em um haras brasileiro.....	77
	Resumo.....	77
	Abstract.....	78
	1. Introdução.....	78
	2. Material e métodos.....	79
	3. Resultados.....	80

4. Discussão.....	83
5. Conclusão.....	85
6. Referência.....	86
ANEXO 3.....	88
ANEXO 4.....	89
ANEXO 5.....	90
ANEXO 6.....	91
ANEXO 7.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detecção direta de agentes infecciosos utilizando amostras de fluido oral de suínos.....	26
Tabela 2	Detecção de anticorpos contra agentes infecciosos utilizando amostras de fluido oral de suínos.....	27
Tabela 3	Grau de lesão macroscópica e microscópica; grau de marcação pela imuno-histoquímica e comprimento de intestinos lesionados dos suínos, dos quais foram coletadas as fezes para a exposição aos camundongos.....	46
Tabela 4	Resultados dos testes realizados nos suínos expostos às fezes de camundongos infectados e não infectados com <i>L. intracellularis</i>	49
Tabela 5	Porcentagem de concordância entre resultados do teste de imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) para <i>L. intracellularis</i> IgG específica em soro e IgA e IgG em fluido oral aos 21 e 28 dpi.....	65
Tabela 6	Número de animais de acordo com os escores de lesão macroscópica, microscópica e de imuno-histoquímica observadas nos intestinos de suínos aos 49 dias pós-inoculação com <i>L. intracellularis</i>	65
Tabela 7	Exames realizados em amostras de fezes e soro para agentes causadores de diarreia em potros, amostras de 11 potros.....	83
Tabela 8	Quantidade de fezes de camundongos experimentalmente inoculados com <i>L. intracellularis</i> expostas aos suínos por dia de exposição.....	89
Tabela 9	Número de animais positivos por baía e baias positivas para IgA em amostras individual e coletiva, respectivamente, de fluido oral de suínos nos diferentes dias após a inoculação experimental com <i>L. intracellularis</i>	91
Tabela 10	Número de animais positivos por baía e baias positivas para IgG em amostras individual e coletiva, respectivamente, de fluido oral de suínos nos diferentes dias após a inoculação experimental com <i>L. intracellularis</i>	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Lesão macroscópica de Enteropatia Proliferativa suína (EPS) e imuno-histoquímica (IHQ) de <i>L. intracellularis</i>	20
Figura 2	Cinética de detecção de anticorpos anti- <i>L. intracellularis</i> em uma granja de suínos.....	24
Figura 3	Fase experimental - etapa 1, esquema do fornecimento das fezes de suínos positivas e negativas para <i>L. intracellularis</i> para camundongos de linhagem Swiss.....	43
Figura 4	Fase experimental - etapa 2, esquema do fornecimento das fezes de camundongos Swiss experimentalmente inoculados com <i>L. intracellularis</i> e negativos, controle, para suínos suscetíveis.....	45
Figura 5	Marcação positiva para <i>L. intracellularis</i> em camundongos expostos as fezes de suínos experimentalmente inoculados com <i>L. intracellularis</i> , 32 dpe.....	48
Figura 6	Imuno-histoquímica de suínos expostos às fezes de camundongos experimentalmente infectados com <i>L. intracellularis</i> , 30 dpe.....	49
Figura 7	Escore fecal de suínos controle (T1) e experimentalmente inoculados (T2) aos 2 a 42 pós-inoculação com <i>L. intracellularis</i>	61
Figura 8	Porcentagem de suínos positivos para <i>L. intracellularis</i> na PCR em amostras fecais e porcentagem de animais soropositivos na imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) para detecção de anticorpo IgG anti- <i>L. intracellularis</i> no soro.....	63
Figura 9	Porcentagem de animais positivos para IgA e IgG anti- <i>L. intracellularis</i> em fluido oral (FO), de suínos experimentalmente inoculados, detectados pelo teste de imunoperoxidase em monocamada de célula (IMPC).....	64
Figura 10	Positividade de suínos para IgG detectados em soro e IgA e IgG anti- <i>L. intracellularis</i> em fluido oral (FO).....	65
Figura 11	Fragmentos de intestino delgado, fixados em formol 10%, de um equino de 7 meses de idade, com diagnóstico de EPE.....	82
Figura 12	Lesões microscópica de intestino de equino de sete meses de idade com EPE.....	85
Figura 13	Etapa 1 – fase experimental. Fornecimento de fezes suínas aos camundongos.....	89
Figura 14	Imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) em amostras de fluido oral...	91

LISTA DE ABREVIATURAS

IPMC – Imunoperoxidase em monocamada de célula

FO – Fluido oral

dpi – Dias pós-inoculação

dpe – Dias pós-exposição

PCR – Reação em cadeia da polimerase

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

IgG – Imunoglobulina G

IgA – Imunoglobulina A

IgM – Imunoglobulina M

PBS - Phosphate-buffered saline

EPS – Enteropatia proliferativa suína

HE - Hematoxilina e eosina

IHQ – Imuno-histoquímica

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

EP - Enteropatia proliferativa

µm – Micrometro

g – Grama

Kg – Quilograma

mL – Mililitro

DNA - Ácido desoxirribonucléico

Rep-PCR - *Repetitive-polymerase chain reation*

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

VNTRs - *Variable Numbers of Tandem Repeats*

RNA - Ácido ribonucleico

qRT-PCR – Reação quantitativa através da transcriptase reversa reação em cadeia da polimerase

SPG – Solução de sacarose fosfato glutamato

RESUMO

A 1ª etapa do 1º projeto objetivou verificar se camundongos se infectam com fezes de suínos inoculados com *L. intracellularis*. Camundongos (C1) ou (C2) foram expostos à fezes de suínos infectados ou negativos, respectivamente. Os camundongos foram testados pela nested-PCR e IHQ. A segunda etapa objetivou induzir contaminação de suínos com fezes de camundongos inoculados com o agente. Foram expostos 12 suínos às fezes dos camundongos positivos (S1) e dois à fezes negativas (S2). Os suínos foram testados pela sorologia, PCR e IHQ. A nested-PCR dos C1 foi positiva em pelo menos uma coleta e três C1 foram IHQ positivos. Onze suínos S1 foram positivos na PCR, nove soroconverteram e cinco foram positivos na IHQ. O segundo projeto objetivou padronizar a técnica IPMC para detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis* em FO. Suínos foram separados em controle (T1) e inoculados com *L. intracellularis* (T2). Amostras individuais e coletivas de FO e sangue foram coletadas, testadas pela IPMC para detectar IgG no soro e IgA e IgG em FO. A maior porcentagem de animais positivos para IgA e IgG no FO foi na 5ª semana. A sensibilidade da IPMC foi de 84,62% para IgA e 88,46% para IgG no FO e 100% no soro, com especificidade de 100%. Houve alta concordância entre FO individual e baias. Conclui-se que camundongos são capazes de se infectar e eliminar o agente em quantidade suficiente para infectar suínos, e que FO possui potencial para ser utilizado como alternativa ao soro na detecção de IgG anti-*L. intracellularis*.

Palavras chaves: Epidemiologia, fluido oral, ileíte, EPS

ABSTRACT

This thesis was divided in two studies. The first part of first study aimed to check if mice could be infected by feces from *L. intracellularis* infected pigs. Thirty-four mice received feces of experimentally infected pigs (C1) and 11 received feces from negative pigs (C2). Mice were test by nested-PCR and immunohistochemistry (IHC). The second aimed to test if pigs could be infected when exposed to infected mice. Twelve pigs received positive mice feces (S1), and 2 received negative mice feces (S2). Pigs were tested by serology, PCR and IHC. C1 mice were nested-PCR positive at least one collection and 3 mice were IHC positive. Ten S1 were PCR positive, 9 seroconverted and 5 were IHC positive. The second study aimed to investigate the presence of IgA and IgG anti-*L. intracellularis* in oral fluid (OF) samples. Pigs were separate into control (T1) and inoculated groups (T2). Blood and OF samples were collected from each animal and pen. These samples were tested by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) for detection IgG in serum and IgA and IgG in OF. The IPMA showed 84.62% of sensitivity in detection of IgA, 88.46% in IgG in OF and 100% in serum, and specific was 100% in both samples. There was high agreement between the individual and pen OF. In conclusion, this thesis demonstrated that mice may be infect and eliminate the agent in sufficient quantity to infect pigs. And, OF samples might be useful for profiling herds, but on farm experiments are still pending.

Keywords: epidemiology, oral fluid, ileitis, proliferative enteropathy

INTRODUÇÃO

Lawsonia intracellularis é o agente causador da enteropatia proliferativa, já descrita em várias espécies animais. Sua importância como agente causador de perdas produtivas na produção de suínos em todo o mundo é bem conhecida. Em hamsters, assim como em suínos, a doença é bem estudada. Em equinos, é crescente o número de relatos e estudos da doença em diferentes países (Pusterla e Gebhart, 2013).

A importância dos animais assintomáticos, suínos e equinos, como fontes de infecção da *L. intracellularis* para animais susceptíveis da mesma espécie é bem conhecida (Guedes 2007b; Pusterla *et al.*, 2010), porém pouco se sabe sobre o papel de outros animais atuando como possíveis vetores na transmissão e manutenção do agente em granjas de suínos e haras. Identificação de animais domésticos e silvestres positivos para a bactéria já foi relatado, mas o papel dessas espécies na epidemiologia da doença não é esclarecido (Friedman *et al.*, 2008; Pusterla *et al.*, 2008b; Collins *et al.*, 2011).

A grande prevalência de casos subclínicos faz com que a enteropatia proliferativa suína (EPS) passe despercebida, o que dificulta o diagnóstico de rebanhos infectados. Sendo assim, pesquisas epidemiológicas com coleta de fezes e/ou sangue, para a detecção de ácido nucléico de *L. intracellularis* e anticorpos específicos contra este agente, respectivamente, são realizadas para o entendimento da cinética de infecção no rebanho e assim adotar medidas de controle da doença. A cinética de anticorpos anti-*L. intracellularis* no soro pós-infecção é bem caracterizada (Guedes *et al.*, 2002), mas, não se conhece o potencial da utilização de fluidos orais como amostra clínica alternativa para se inferir o mesmo.

O presente trabalho é constituído de três capítulos. O capítulo 1 é uma revisão de literatura sobre a *L. intracellularis*, e a dinâmica de infecção em rebanhos de suínos. Além disto, aborda a utilização de amostras de fluido oral para o diagnóstico de diferentes agentes etiológicos para suínos e seus anticorpos específicos, como alternativa ao soro sanguíneo.

O capítulo 2 tem como objetivo avaliar se camundongos podem atuar como vetores biológicos na transmissão de *L. intracellularis* para suínos. A primeira parte deste capítulo descreve a pesquisa de *L. intracellularis* em roedores em granjas. As seções 2 e 3 descrevem a parte experimental a qual objetiva provar a transmissão da bactéria entre suínos e camundongos experimentalmente inoculados.

No capítulo 3 é descrito um estudo de detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis* (IgA e IgG) em amostras de fluido oral de suínos experimentalmente infectados, comparando com a sorologia, utilizando a técnica sorológica de imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC).

Devido aos crescentes relatos de casos da doença causada pela *L. intracellularis* e a detecção de seu DNA em diferentes espécies animais, foram acrescentadas em anexo dois relatos de detecção da *L. intracellularis* em outras duas espécies animais. Anexo 1 descreve a ocorrência de enteropatia proliferativa equina em um haras brasileiro na região Centro Oeste do Brasil, abordando aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. O anexo 2 relata a detecção do DNA de *L. intracellularis* através de *nested*-PCR em amostras de fezes de cães com histórico de diarreia na região metropolitana de Belo Horizonte, MG.

HIPÓTESES

Camundongos são capazes de se infectar com cepas de *Lawsonia intracellularis* e eliminar quantidade suficiente de bactéria para infectar suínos suscetíveis.

Amostras de fluido oral de suínos contém anticorpos específicos IgA e IgG anti-*L. intracellularis* detectáveis em técnicas sorológicas.

OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi provar a transmissão fecal-oral de cepas suínas de *L. intracellularis* entre suínos e camundongos e demonstrar a potencial importância de roedores na epidemiologia da enteropatia proliferativa suína. Em adição, padronizar uma técnica de diagnóstico de anticorpos anti-*L. intracellularis* em amostras de fluido oral de suínos, para que seja uma ferramenta a mais no entendimento da cinética de infecção do agente em rebanhos suínos.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

1.1. *Lawsonia intracellularis* e patogênese

O agente etiológico da enteropatia proliferativa (EP) é uma bactéria intracelular obrigatória (McOrist *et al.*, 1995a), agente esse encontrado em diversas espécies de animais. As primeiras associações de uma bactéria como agente causador da EP em hamsters e suínos, ocorreram nas décadas de 70 e 80 (Rowland e Lawson, 1974). Inicialmente, esta bactéria foi denominada como organismo semelhante à *Campylobacter* (*Campylobacter-like organism*), porém estudos antigênicos e moleculares com *Campylobacter* sp. e *Campylobacter-like organism* demonstraram que essas bactérias não pertenciam ao mesmo gênero (Fox e Lawson, 1988; McOrist *et al.*, 1989; McOrist *et al.*, 1990). Com base em estudos fenotípico e genotípico posteriores (Gebhart *et al.*, 1991; 1993; Fox *et al.*, 1994) e de um isolado de suíno concluiu-se que as bactérias anteriormente denominadas *Campylobacter-like organism* pertenciam a um gênero e espécie anteriormente não descritos e para as quais foi proposto o nome de *Lawsonia intracellularis* (McOrist *et al.*, 1995b). Desta forma, *L. intracellularis* foi caracterizada como sendo um bacilo curvo, Gram-negativo, não formador de esporos, que mede 1,25-1,75 µm de comprimento e 0,25–0,50 µm de diâmetro, com crescimento intracelular obrigatório, que pertence à família *Desulfovibrionaceae*. Na microscopia eletrônica, esta bactéria apresenta parede trilaminar e flagelo longo unipolar, visualizado em bactérias extracelulares em cultivos celulares (Gebhart *et al.*, 1993; McOrist *et al.*, 1995a; Lawson e Gebhart, 2000). *In vivo* está localizada livre no citoplasma apical de enterócitos infectados, associada a ribossomos. Por ser uma bactéria intracelular obrigatória e microaerófila, a *L. intracellularis* necessita de cultivo celular e ambiente adequado para seu crescimento (Lawson *et al.*, 1993; Vannucci *et al.*, 2012c).

In vivo, Boutrup e colaboradores (2010) detectaram bactérias individuais em enterócitos no ápice de vilosidades nas primeiras 12 horas pós-inoculação, com aumento da infecção aos cinco dias. Outros trabalhos detectaram a bactéria precocemente em enterócitos em segmento aboral do jejuno e íleo 3 a 5 dias após infecção (MacIntyre *et al.*, 2003; Guedes e Gebhart, 2004). Os prováveis fatores de patogenicidade nessa fase de colonização, detectados em análise funcional do genoma da *L. intracellularis*, foram a presença do sistema glutamato descarboxilase (GAD) e operon F₀F₁-ATPase, que podem ser cruciais na manutenção da bactéria em ambiente estressante (pH baixo) ou competitivo (Vannucci *et al.*, 2013a). Além da presença de um flagelo polar (Lawson e Gebhart, 2000; Vannucci *et al.*, 2013a).

Muitos aspectos relacionados à capacidade de entrada da bactéria nas células em cultivo e em enterócitos ainda não estão elucidados. Entretanto, há evidências que o processo de internalização da bactéria depende da atividade da célula hospedeira, visto que internalização de bactérias mortas em cultivo celular foi relatada (Lawson *et al.*, 1995). Outro fator que pode estar relacionado a esse processo é a expressão do sistema de secreção do tipo três (Alberdi *et al.*, 2009).

A multiplicação da *L. intracellularis* ocorre através de fissão binária livre no citoplasma de enterócitos e em células em cultivo (Lawson *et al.*, 1993; McOrist *et al.*, 1995a). Três horas pós-infecção a bactéria já se encontra livre no citoplasma celular, permanecendo por curto período no vacúolo formado após sua entrada na célula (McOrist *et al.*, 1995a). Estudos transcricionais e baseados em microarranjos detectaram, *in vivo* e *in vitro*, fatores que podem favorecer a

permanência da bactéria no interior da célula hospedeira. Alguns são relacionados ao escape do endossomo e translocação de fatores de virulência no citoplasma celular como a Ilha de Patogenicidade 2 da *Salmonella* (SPI -2) (Vannucci, *et al.*, 2013c). Avaliação do perfil de transcrição de *L. intracellularis* *in vitro* e *in vivo* revelaram níveis elevados de expressão de um sofisticado mecanismo de proteção oxidativo que envolve o Cu-Zn superóxido dismutase (*sodC*), operon rubrerythrin-rubredoxin (*rubY-rubA*) e dioxigenases. Esses mecanismos juntamente com a codificação do gene da ATP/ADP translocase sugerem que *L. intracellularis* é capaz de superar o estresse oxidativo enquanto utiliza energia da célula hospedeira (Vannucci e Gebhart, 2014). Sugere-se que a multiplicação bacteriana intracelular requer atividade de divisão celular para se multiplicar (Lawson *et al.*, 1995; McOrist *et al.*, 1996). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram alterações na transcrição de genes relacionados ao ciclo celular (Oh *et al.*, 2010; Jacobson *et al.*, 2011; Vannucci *et al.*, 2013a), com ativação significativa de transcrição do DNA, biossíntese de proteína e de genes que atuam na fase G1 do ciclo celular (Vannucci *et al.*, 2013c).

Em estudo com hamsters foi observado que há uma baixa significativa na absorção de glicose e eletrólitos (K⁺ e Cl⁻) em animais infectados com *L. intracellularis* (Vannucci *et al.*, 2010). Mais tarde, através de estudos moleculares foi observada a repressão de transportadores de membrana relacionados com a digestão e aquisição de nutrientes (Jacobson *et al.*, 2011; Vannucci *et al.*, 2013c; Smith *et al.*, 2014). A redução na absorção de nutrientes indica que a *L. intracellularis* é capaz de afetar a diferenciação de enterócitos infectados e, por sua vez, o aumento de células imaturas nas criptas aumenta a secreção de eletrólitos para o lúmen intestinal. Esse excesso de eletrólitos, juntamente com a presença de solutos não absorvidos na luz intestinal que osmoticamente retém água, resultam em diarreia osmótica de má absorção (Vannucci *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2014; Vannucci e Gebhart, 2014).

Com propósitos clínicos e, principalmente para estudos epidemiológicos da EP, a classificação *L. intracellularis* através de métodos moleculares pode permitir maior precisão na determinação das fontes de transmissão. O agente intracelular da EP, encontrado nas diferentes espécies animais, é morfologicamente idêntico e antigenicamente semelhante (Lawson *et al.*, 1985; Fox e Lawson 1988; Schoeb *et al.* 1990; Drolet *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996). Análises de sequência do rDNA 16S completo demonstraram que o agente intracelular causal de EP em furão, hamster, veados e avestruzes naturalmente infectados é idêntica ao agente em suínos (Cooper *et al.*, 1997a). Não sendo então possível a diferenciação entre cepas por esses métodos. Para isso, algumas técnicas baseadas em PCR como *repetitive-polymerase chain reaction* (Rep-PCR) e *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Variable Numbers of Tandem Repeats* (VNTRs) têm sido descritas (Beckler *et al.*, 2004ab). Diferente das outras duas técnicas, o PCR baseado em VNTRs não requer o cultivo puro da *L. intracellularis* e nem outras técnicas moleculares além do PCR, sendo estável em diferentes procedimentos laboratoriais (Beckler *et al.*, 2004ab). Os VNTRs são sequências do DNA que se repetem aleatoriamente, e possuem alto nível de polimorfismo entre procariotos, e podem ser empregadas para identificar cepas e pesquisar a existência de vínculo genético entre elas, diferenciando isolados obtidos de diferentes espécies animais, localizações geográficas e surtos de campo (Beckler *et al.*, 2004ab; Gebhart, 2006).

Os perfis do VNTR de *L. intracellularis* demonstram utilidade como marcadores de cepas, pois a bactéria detectada em surtos de EP epidemiologicamente não relacionados apresentaram perfis de VNTR distintos. Estes dados são consistentes com a hipótese de que há diferenças genéticas bem definidas no loci VNTR em *L. intracellularis* recuperados a partir de fontes clínicas. Em

contraste, amostras de fezes positivas dos mesmos surtos, tanto em suínos como em equinos, compartilharam perfis de VNTR idênticos. Sendo assim, é provável que o VNTR seja de utilidade considerável na análise de diferenciação epidemiológica de surtos de *L. intracellularis* (Beckler *et al.*, 2004ab, Nogradi *et al.*, 2012).

Em estudo comparativo de sequências genômicas de *L. intracellularis* detectadas em equinos e suínos demonstrou uma ilha genômica profago associada presente especificamente em *L. intracellularis* patogênica de suínos. Essa diferença genética também pode ser uma possível forma molecular de marcar e determinar a origem das espécies e isolados bacterianos para traçar a história evolutiva relacionada com as espécies hospedeiras em infecções *L. intracellularis* (Vannucci *et al.*, 2013a).

1.2. Modelos experimentais para avaliação da doença

Estudos experimentais da EPS têm sido mais realizados na espécie suína (Guedes e Gebhart 2003ab). Entre os animais de laboratório, hamsters são conhecidos por serem naturalmente e experimentalmente infectados pelo agente. Por ser um animal susceptível ao agente do suíno, hamsters foram, portanto, também utilizados como um modelo animal para estudos de EPS. A infecção nesses animais, assim como em suínos, é produzida através da inoculação utilizando homogeneizado de mucosa de intestino de suínos doentes ou cultivo bacteriano (McOrist *et al.* 1989; Vannucci *et al.* 2010). Para cepas de *L. intracellularis* de equinos, hamsters não apresentaram a mesma susceptibilidade dos coelhos (Sampieri *et al.*, 2013). Assim como coelhos inoculados com cepas suínas da bactéria não apresentaram a mesma susceptibilidade (Sampieri *et al.*, 2013). Esses achados demonstram que diferentes cepas de *L. intracellularis* podem ter especificidade em relação aos hospedeiros assim como a hospedeiros secundários. Alguns pesquisadores tentaram infectar outros roedores como ratos e camundongos e obtiveram resultados variáveis de acordo com a linhagem estudada (Collins *et al.* 1999, Murakata *et al.* 2008, Collins *et al.* 2011, Viott *et al.* 2013).

1.3. Enteropatia proliferativa em suínos

1.3.1. Aspectos clínicos e patológicos

A enteropatia proliferativa em suínos (EPS) possui três formas de apresentação clínica, a aguda, a crônica e a subclínica. A forma aguda é caracterizada por diarreia hemorrágica e morte em animais de reposição e suínos próximos à idade de abate. A forma crônica caracteriza-se por redução no ganho de peso, diminuição do crescimento e desuniformidade em lotes de animais da mesma idade e diarreia transitória que acomete animais de faixa etária de 6 a 20 semanas. A forma subclínica é assintomática e induz desempenho reduzido nos animais (Guedes, 2007b). A identificação de animais em crescimento com a forma crônica da EPS é difícil, mas animais com diarreia evidente são os candidatos mais prováveis para a identificação de lesões macroscópicas (Guedes, 2007b).

As lesões de EPS são observadas com maior frequência no terço final do intestino delgado e início do ceco (Guedes e Gebhart 2003). As lesões características são edema de mesentério próximo à inserção com a alça intestinal lesada, serosa intestinal com aspecto cerebróide, parede intestinal espessada e a mucosa com pregas bem evidentes (Guedes, 2007b) (Figura 1-A). Na forma aguda, observam-se lesões intestinais características, porém com conteúdo fibrino-hemorrágico preenchendo o lúmen intestinal (Guedes *et al.*, 2002a; França *et al.*, 2010). As

lesões macroscópicas podem ser inicialmente observadas aos 11 dias pós-inoculação (Guedes e Gebhart, 2004) com regressão progressiva sem visualização de lesão na 13ª semana pós-inoculação (Guedes e Gebhart, 2003b).

Todas as formas possuem as mesmas características histopatológicas, em graus variados. Histologicamente caracteriza-se pela proliferação de células epiteliais imaturas das criptas com elevado índice mitótico e a redução intensa do número de células caliciformes nas criptas afetadas (Lawson e Gebhart, 2000). Os animais com a forma subclínica, apesar de não apresentarem diarreia ou lesões macroscópicas, apresentam lesão histológica discreta (Guedes, 2007a, Paradis *et al.*, 2007). A hiperplasia de cripta em suínos é inicialmente observada aos sete dias pós-inoculação (MacIntyre *et al.*, 2003) e marcações pela imuno-histoquímica (IHQ) (Figura 1-B) são observadas a partir de três dias pós-inoculação e aumentam de acordo com o grau hiperplasia de criptas (MacIntyre *et al.*, 2003). A resolução das lesões inicia-se a partir da terceira semana pós-inoculação (MacIntyre *et al.*, 2003), sem evidências da doença na 13ª semana após a inoculação (Guedes e Gebhart, 2003a). Com a resolução da infecção há a observação de marcação pela IHQ somente em células mononucleares na lamina própria (Guedes e Gebhart, 2003a).

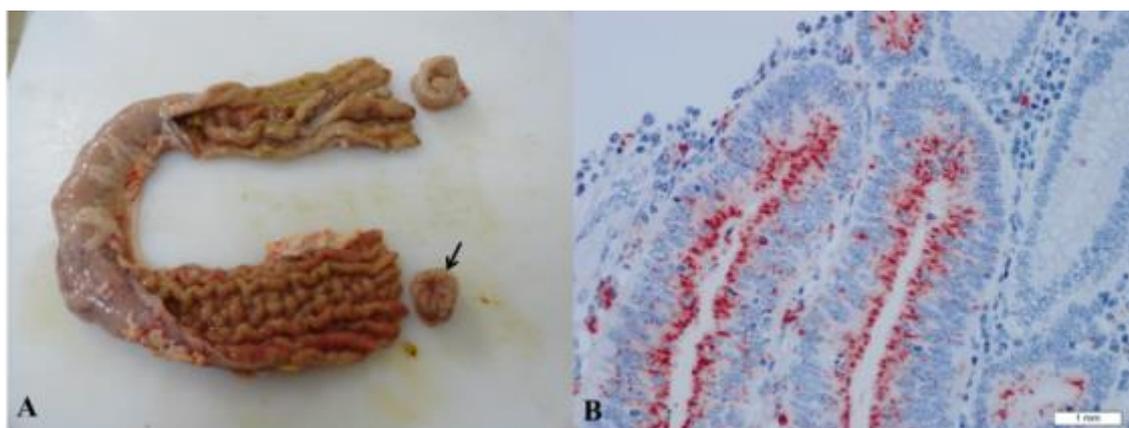


Figura 1: Lesão macroscópica de Enteropatia Proliferativa suína (EPS) e imuno-histoquímica (IHQ) de *L. intracellularis*. A – Segmento de íleo de suíno com espessamento de mucosa e diminuição da luz intestinal (seta) e pregas espessas e evidentes. B *L. intracellularis*. L. *Intracellularis* - Fotomicrografia do íleo mostrando na figura A. Hiperplasia de criptas associada à marcação positiva (marcação granular vermelha) para *L. intracellularis* no citoplasma apical de enterócitos. Imuno-histoquímica utilizando método de biotina-estreptavidina, com anticorpo policlonal anti-*L. intracellularis* e revelação com AEC).

1.3.2 Aspectos epidemiológicos

A infecção de suínos ocorre por via fecal-oral (Lawson e Gebhart, 2000) sendo que a principal fonte de contaminação são animais que apresentam a forma subclínica da doença. A presença da bactéria nas fezes é observada na primeira semana após a inoculação dos animais e ocorre de forma intermitente até 12 semanas (Guedes e Gebhart, 2003a; Guedes *et al.*, 2002a), com picos entre 14 e 28 dpi, com excreção entre 10^7 a 10^8 *L. intracellularis* por grama de fezes (Smith e McOrist, 1997; Vannucci *et al.*, 2012). Doses menores entre 10^3 a 10^5 *L. intracellularis* são suficientes para infectar suínos suscetíveis (Collins *et al.*, 2001; Collins e Love, 2007).

Após a eliminação, a bactéria pode sobreviver nas fezes por um período de até duas semanas em temperatura ambiente (Collins *et al.*, 2000). Com base nesses dados é possível observar que a *L. intracellularis* é eliminada em grande quantidade e por um longo período nas fezes de suínos infectados, além de resistir por certo tempo no meio ambiente e não necessitar de uma dose infectante elevada. Por esses motivos, estudos sorológicos de prevalência da enfermidade vêm mostrando índices entre 30 e 95% de rebanhos positivos em diferentes países (Lawson e Gebhart, 2000; Marsteller *et al.*, 2003; Paradis *et al.*, 2007).

Fatores relacionados ao manejo de animais e instalações, como manejo “todos dentro todos fora”, limpeza e desinfecção, instalações antigas, tipo de piso, tipo de produção, fluxo de suínos na granja e entre granjas, mistura de lotes, número de matrizes, concentração elevada de animais, grande número de múltiparas, uso de antimicrobianos e vacina, são fatores que podem contribuir para a diferença de prevalência de *L. intracellularis* em rebanhos de suínos (Bronsvoort *et al.*, 2001; Corzo *et al.*, 2005; Kroll *et al.*, 2005; Paradis *et al.*, 2007).

A transmissão indireta da *L. intracellularis* não é bem conhecida, mas a disseminação do agente em espaços curtos, como entre baias na mesma sala, já foi documentada (Jordan *et al.*, 2004). Essa constatação que sugere o papel de fomites na disseminação da bactéria para animais susceptíveis, assim como baias e equipamentos sujos com fezes podem manter um ciclo contínuo de infecção em animais recentemente alojados (Collins *et al.*, 2000).

A ocorrência de surtos de EPS em granjas nunca antes povoadas e que receberam animais de reposição de granjas sem histórico clínico da doença também já foi relatada (Guedes *et al.*, 2002a). O mesmo foi detectado em um haras, no qual houve a entrada do agente sem a introdução de novos cavalos, nem o contato com suínos (Lavoie *et al.*, 2000). Desta forma, surgiram suspeitas com relação a possível existência de vetores biológicos ou mecânicos capazes de carrear a *L. intracellularis*.

O DNA da bactéria já foi detectado em várias espécies de animais silvestres e domésticas (Pusterla *et al.*, 2008; 2012). Em granjas de suínos positivas para o agente já foram detectados roedores silvestres positivos para o DNA da *L. intracellularis* (Friedman *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2011; Backhans *et al.*, 2013). Ratos capturados em granjas são capazes de eliminar em média 10^3 – 10^5 organismos/g fezes (Collins *et al.*, 2011). Considerando as doses infectantes para suínos, sugere-se que seria suficiente apenas um grama de fezes dos roedores para suínos susceptíveis se infectarem. A susceptibilidade de camundongos a cepas suínas de *L. intracellularis* já foram testadas, com evidente infecção dos mesmos, porém sem apresentação clínica evidente e com diferença na susceptibilidade entre as diferentes linhagens (Collins *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000; Fortier *et al.*, 2005; Go *et al.*, 2005; Murakata *et al.*, 2008; Viott *et al.*, 2013).

Outras espécies associadas a granjas de suínos e haras, como, marsupiais, coelhos, coiotes e gatos selvagens foram positivas para a presença do DNA de *L. intracellularis* nas fezes (Friedman *et al.*, 2008; Pusterla *et al.*, 2008b; Collins *et al.*, 2011; Pusterla *et al.*, 2012; Backhans *et al.*, 2013). Todavia, a epidemiologia do agente nesses animais e o papel desses animais na epidemiologia da doença em suínos não está bem esclarecida.

Há na literatura trabalhos que relatam casos naturais de EP em duas espécies de aves, avestruz (Cooper *et al.*, 1997ab) e emu (Lemarchand *et al.*, 1997), ambas com lesões histológicas características da infecção pela *L. intracellularis*, confirmada pela coloração pela prata. Esses casos sugerem a susceptibilidade de aves ao agente, porém não houve infecção de galinhas

(Collins *et al.*, 1999) ou pardais (Viott *et al.*, 2013) inoculados com cultura pura de cepas de *L. intracellularis* isoladas de suíno. Esses resultados indicam que essas aves não são susceptíveis a infecção por *L. intracellularis* suína e, conseqüentemente, não apresentam papel epidemiológico significativo na EPS como reservatório para o agente (Collins *et al.*, 1999; McOrist *et al.*, 2003; Viott *et al.*, 2013).

1.3.3. Soroperfil e soroprevalência

A maior prevalência de rebanhos suínos positivos para a *L. intracellularis* foi encontrada na Austrália, onde 100% dos rebanhos estudados foram positivos (Holyoake *et al.*, 2010). Na Alemanha detectou-se a menor porcentagem de rebanhos positivos (33,7% - 403/826) na sorologia, com maior prevalência de anticorpos em marrãs e matrizes (71,8% e 74,4%, respectivamente), seguida de animais em terminação (60,4%) (Wendt *et al.*, 2004).

Pesquisa realizada na Dinamarca através de PCR encontrou 93,7% (74/79) de rebanhos positivos (Stege *et al.*, 2000). Na Rússia, 86,5% das propriedades pesquisadas foram positivas na sorologia (Kukushkin e Okovytaya, 2012), e na Suécia, a porcentagem foi de 48% (50/105) (Löfstedt *et al.*, 2004). No Japão, cerca de 94% dos rebanhos são positivos (McOrist, 2005b) e na China a soroprevalência foi de 57% (Wu *et al.*, 2014).

Em uma região do Canadá, Paradis *et al.* (2007) encontraram, na sorologia, 91,7% de prevalência em rebanhos de ciclo completo, 50% em rebanhos de terminação e 16,7% em rebanhos com sítios separados. No mesmo país, em outra região, esse resultado foi de 87,5% em granjas com ciclo completo e 95,5% em propriedades terminadoras. Em Quebec, 100% dos rebanhos apresentaram-se positivos (Paradis *et al.*, 2007).

Nos EUA, Marsteller *et al.* (2003) encontraram 75% de prevalência em rebanhos suínos de terminação e 78% em rebanhos de reprodução, através da sorologia. Bronsvort *et al.* (2001) observaram que de 184 rebanhos avaliados, 48,9% das unidades reprodutivas foram soropositivos para *L. intracellularis*, enquanto unidades de recria e terminação apresentaram 66,9% de soropositividade.

Assim como em diferentes países, no Brasil a prevalência da EPS varia. Em levantamento sorológico da EPS suína em rebanhos de Minas Gerais, 105 das 109 granjas amostradas (96,33%) foram positivas na sorologia (Ristow *et al.*, 2001). Em outro estudo no mesmo estado, utilizando a técnica de PCR, Viott e colaboradores (2013a) encontraram 50% das granjas positivas (23/46) para *L. intracellularis* isoladamente ou em associação com outros enteropatógenos.

Moreno *et al.* (1999) encontraram 40,5% de rebanhos positivos na PCR de um total de 148 granjas estudadas. Em estudo posterior, Moreno *et al.* (2002) encontraram 30% de rebanhos positivos, por meio de PCR de fezes provenientes de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio de Janeiro, Pernambuco, Ceará e Distrito Federal. Foram analisadas amostras de 207 rebanhos.

A prevalência da EPS encontrada em animais com lesão de EPS na linha de abate foi de 3% (20/663 amostras) no Rio Grande do Sul (Faccini *et al.*, 2005) e de 16,87% (123/735) apresentaram lesões compatíveis com a EPS, mas somente três com marcação positiva à IHQ, no estado de Mato Grosso (Alberton *et al.*, 2011). A baixa prevalência encontrada pode ser

devido ao tempo de resolução das lesões e/ou características da suinocultura industrial, respectivamente em cada estudo. (Faccini et al., 2005; Alberton et al., 2011).

A resposta imune humoral, IgG específica, é detectada inicialmente em animais experimentalmente inoculados duas a três semanas após a exposição à bactéria (Guedes e Gebhart, 2003b; Vannucci *et al.*, 2012b; 2013b) e pode se estender até 13 semanas (Guedes e Gebhart, 2003b). Em pesquisa a campo, o intervalo entre a primeira detecção do agente em PCR e a soroconversão pode ser de 2 a 8 semanas (Hammer, 2004) e está correlacionada com a pressão de infecção, pois a resposta imune contra o agente é dose dependente (Collins *et al.*, 2001; Guedes e Gebhart 2003a; Nogueira *et al.*, 2013). Fatores como tipo de manejo, fluxo de suíno, uso de antimicrobianos e vacina, e tipo de piso interferem na dinâmica de soroconversão no campo (Collins *et al.*, 2001; Stege *et al.*, 2004).

Leitões após o desmame podem permanecer soropositivos até a quinta semana de idade, sugerindo a passagem passiva de anticorpos da fêmea para o leitão (Guedes *et al.*, 2002a; Stege *et al.*, 2004). Com a queda do título de anticorpos maternos, entre a 5^o e 7^o abre uma janela imunológica, onde ocorre a infecção dos animais suscetíveis, com aumento da eliminação de *L. intracellulares*, com picos de animais eliminando o agente na 13^a e 16^a semanas de idade. Com isso, há início da soroconversão, IgG específica, em torno da 16^a semana, com permanência soropositividade até a 22^a semana de idade (Figura 2) (Guedes *et al.*, 2002a).

A proteção de mucosa através de IgA desempenha um papel relevante na proteção contra *L. intracellularis*. Imunoglobulina IgA presente no leite das porca restringe a janela de oportunidade da transmissão fecal/oral entre os leitões (Collins *et al.*, 2001). Em suínos inoculados, a detecção de IgA anti-*L. intracellularis* na luz intestinal na região do íleo inicia aos 15 dias pós-inoculação e perdura por 29 dias, com títulos que variam de 1:4 a 1:64 (Guedes e Gebhart, 2004; 2010). No soro, a detecção de IgA específica é dose dependente e inicia a partir do 7^o dpi (<1:20), com aumento significativo do título aos 21 dias pós inoculação (1:120) (Nogueira *et al.*, 2013).

1.3.4. Diagnóstico

Casos agudos e crônicos de EPS podem ser facilmente diagnosticados pela necropsia, mas o exame histopatológico complementar é normalmente necessário para confirmação do diagnóstico. Casos severos de EPS são prontamente diagnosticados com o uso da coloração histológica de rotina. Entretanto, para visualização da bactéria no citoplasma de enterócitos, aumentando a sensibilidade do diagnóstico, colorações especiais são necessárias, como a coloração pela prata (Warthin Starry) (Driemeier *et al.*, 2002), e a técnica de imunohistoquímica, que apresenta sensibilidade claramente superior as demais colorações (Guedes *et al.*, 2002b). Os exames anatomopatológicos dependem da ocorrência de casos clínicos da doença e a morte de animais. Porém, há grande prevalência de casos subclínicos de EPS que passam despercebidos pelo produtor e dificulta assim o diagnóstico da doença a campo (Kroll *et al.*, 2005).

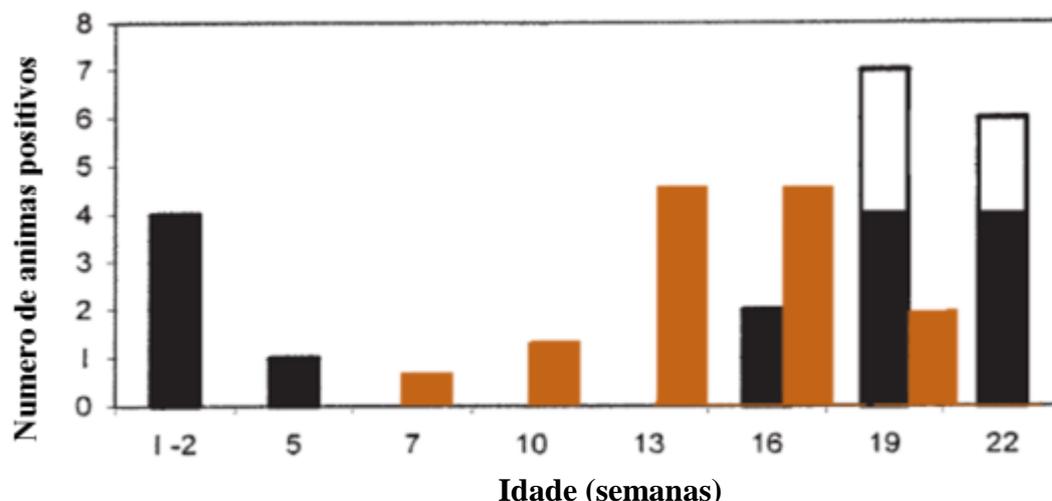


Figura 2: Cinética de detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis* em uma granja de suínos. As barras em preto ilustram o número de animais soropositivos com títulos de 1:30 e em branco títulos de 1:60, na imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC). As barras em vermelho ilustram o número de animais positivos na PCR para *L. intracellularis* nas fezes. Fonte modificada de Guedes *et al.*, (2002a).

Diferente de outras bactérias enteropatogênicas para suínos, como *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *Salmonella sp.* (Fellström *et al.*, 2001; Viotti *et al.*, 2013), o diagnóstico da EPS através do isolamento do agente não é realizado, pois a *L. intracellularis* é uma bactéria intracelular obrigatória e microaerófila, e necessita de cultivo celular e ambiente adequado para seu crescimento (Lawson *et al.*, 1993; Vannucci *et al.*, 2012c). O isolamento primário é laborioso, e apesar do método convencional para isolamento e cultivo do agente em monocamada de célula ser bem estabelecido, esse utiliza vários requisitos como antibióticos e misturas de gases (Lawson *et al.*, 1993; Guedes *et al.*, 2003b). Com isso, o custo destes requisitos tem limitado a manutenção deste microrganismo *in vitro*. Além disso, uma vez que esta doença foi relatada pela primeira vez, houve apenas poucos isolados de *L. intracellularis* cultivados em todo o mundo (Vannucci *et al.*, 2012c).

Existem duas formas de diagnosticar EPS em animais vivos: sorologia e PCR em amostras fecais (Guedes *et al.*, 2002b). A técnica de PCR, que é extremamente específica, apresenta limitações quanto à sensibilidade em amostras de fezes, devido a inibidores presentes nas mesmas, além de detectar apenas animais que estão eliminando o agente naquele momento. A sorologia é uma ferramenta utilizada para traçar o soroperfil da doença nos rebanhos e determinar histórico de exposição dos animais a bactéria (Guedes *et al.*, 2004). Testes sorológicos, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), a imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) e imunofluorescência indireta em placa, são utilizados para determinação de perfil sorológico do rebanho e compreensão da cinética de infecção (Guedes *et al.*, 2002b; Kroll *et al.*, 2005). Com essas informações, pode-se definir programas medicamentosos ou uso da vacina para o controle da enteropatia no rebanho (Guedes *et al.*, 2002a).

Uso de antimicrobianos e vacina são os dois métodos de controle da EPS. A vacina presente no mercado é viva atenuada (Enterisol® Ileitis - Boehringer Ingelheim Vetmedica) (Walter *et al.*, 2004), aprovada e comercialmente disponível, porém ainda pouco utilizada nos rebanhos brasileiros. A administração de antimicrobianos para tratamento de EPS vem sendo utilizada em rebanhos com a forma crônica da EPS, nos quais a taxa de mortalidade é mínima, mas com impacto significativo no desempenho, com objetivo principal de melhorar os índices produtivos. Em casos de granjas com a forma aguda/hemorragica da EPS, o objetivo do tratamento é minimizar as mortes e reduzir as chances de ocorrência da doença em lotes subsequentes (Lawson e Gebhart, 2000; França e Guedes, 2008).

1.4. Técnicas de detecção de agentes e anticorpos através de fluido oral

A resposta imune humoral é dependente da dose infectante, esquema de medicação entre outros fatores, o que faz com que cada granja tenha um soroperfil particular (Collins *et al.*, 2001; Hammer, 2004). Com isso, testes sorológicos para determinação de soroperfil de rebanhos e compreensão da cinética de infecção vêm sendo utilizados como ferramenta para definição do programa medicamentoso e/ou uso da vacina para o controle de enteropatia no rebanho (Walter *et al.*, 2004). Tradicionalmente, a amostra clínica utilizada nos testes de diagnósticos para monitorias de rebanho é o soro sanguíneo.

O fluido oral (FO) é o líquido presente na cavidade oral, resultante da combinação da saliva, transudado da mucosa oral e restos de alimentos. A saliva é produzida pelas glândulas salivares, já o transudado entra na cavidade oral através dos capilares da mucosa. Além disso, o fluido oral contém agentes patogênicos e anticorpos originados do soro ou produzidos nos tecidos associados à cavidade bucal (Prickett *et al.*, 2008a).

A facilidade na coleta, custos baixos no processamento de amostras, aumento do número de animais amostrados comparado com amostras de soro e menos estresse na coleta são fatores que fazem com que testes baseados em amostras de FO sejam cada vez mais realizados na vigilância de doenças infecciosas e para estudos epidemiológicos em medicina veterinária (Prickett e Zimmerman, 2011).

Há estudos utilizando amostras de FO em diversas espécies animais (Prickett *et al.*, 2011) para a detecção de agentes e anticorpos específicos contra os mesmos, além de antibióticos (Prickett *et al.*, 2011; Oruç *et al.*, 2013). Em suínos, amostras de FO vêm sendo utilizadas para estudos epidemiológicos em granjas, principalmente para a detecção de agentes infecciosos e anticorpos específicos contra os mesmos (Tabela 1 e 2). Na tentativa de detectar *L. intracellularis* em amostras de FO, dois trabalhos apresentaram amostras positivas para o agente (Frana *et al.*, 2014; Strobel *et al.*, 2014).

A maioria ou quase a totalidade dos estudos realizados até hoje com suínos utilizaram como material de coleta cordas de algodão (Tabela 1 e 2). Porém, dois trabalhos demonstraram uma melhor resposta na detecção de IgA total e específica em cordas com materiais sintéticos (nylon, poliamida e poliéster) (Olsen *et al.*, 2013a; Decorte *et al.*, 2014). Para a detecção de IgG no estudo de Olsen e colaboradores (2013a) não foi encontrada essa diferença entre materiais, diferente de Decorte *et al.* (2014) que observaram uma melhor resposta em cordas de algodão. Para a detecção de IgM há uma baixa na concentração quando coletado com cordas de algodão. Já para a detecção de agentes através da PCR em transcriptase reversa (RT-PCR), houve uma melhor detecção com alta correlação entre os resultados, para a detecção do vírus da PRRS,

entre soro e amostras de FO coletados com cordas de algodão (Kittawornrat *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 2013b).

As coletas são em sua grande maioria realizadas em baias, com o acesso de todos os animais ao material de coleta (Prickett e Zimmerman, 2011). Porém, o uso efetivo de FO em *pool* (coletivo) na vigilância de doenças exige que as amostras sejam representativas do grupo. Sendo assim, o tempo que a corda fica exposta e a interação dos animais com a mesma também pode interferir nos resultados de detecção de agente e anticorpos. A maioria dos estudos utilizam a permanência da corda por 30 minutos (Prickett *et al.*, 2008a, 2011), porém em alguns casos esse tempo não é suficiente para que uma parcela de animais entre em contato com a mesma. A presença de um animal treinado a interagir com a corda faz reduzir o tempo necessário para a interação, (White *et al.*, 2014) já em baias sem animais treinados esse tempo passa para em média 60 minutos (Seddon *et al.*, 2012; White *et al.*, 2014).

Anticorpos permanecem estáveis em amostras de fluido oral em suínos por período indeterminado desde que as amostras sejam armazenadas a 4 °C ou congeladas a -20 °C (Prickett *et al.*, 2010; Decorte *et al.*, 2013; Jones e Muehlhauser, 2014). Temperaturas mais elevadas provocam diminuição dos títulos detectáveis (Prickett *et al.*, 2010). Tratamentos com estabilizantes ou antimicrobianos também não proporcionam melhorias na estabilidade de RNA viral e anticorpos (Prickett *et al.*, 2010; Decorte *et al.*, 2013; Jones e Muehlhauser, 2014).

Estudos demonstraram que a concentração de IgA total em amostras de fluido oral de suínos é superior as de IgM e IgG, e que as três concentrações são dependentes da saúde do animal. Animais doentes possuem concentração maior de imunoglobulinas totais em FO comparado a animais saudáveis, com destaque a IgG, a qual aumenta significativamente dentre as demais imunoglobulinas (Escribano *et al.*, 2012). E, como demonstrado em alguns trabalhos, a cinética de anticorpos em fluido oral é proporcional a cinética de anticorpos no soro (Pacheco *et al.*, 2010; Prickett e Zimmerman, 2011; Panyasing *et al.* 2013; 2014), com picos de anticorpos coincidindo em ambas as amostras (Prickett *et al.*, 2011; Kittawornrat *et al.*, 2013; Ouyang *et al.*, 2013).

Em coletas de FO em baias experimentais e a campo, foi observado que as imunoglobulinas IgM, IgA e IgG anti-PRRSV foram prontamente detectadas em populações em que a infecção foi sincronizada entre todos os indivíduos, ou seja, amostras experimentais, no entanto, não foi o caso em amostras de campo. A razão para a diferença entre as amostras é desconhecida, mas os autores sugerem que a falta de sincronia na propagação da infecção do vírus no campo resultou em animais em diferentes fases de resposta humoral. Consequentemente, IgM e IgA de suínos em fases iniciais da infecção teriam sido diluídas por FO de animais que não secretavam esses isotipos. Em contraste, a IgG foi prontamente detectada em níveis de padrões de referência para diagnósticos por um período prolongado, tanto em amostras experimentais quanto de campo (Kittawornrat *et al.*, 2012a).

Em um estudo padronizando a técnica de ELISA comercial para a detecção de anticorpo IgG anti-PRRSV em FO foram obtidas sensibilidade e especificidade de 94,7% e 100%, respectivamente (Kittawornrat *et al.*, 2012a), além do teste apresentar repetibilidade e reprodutibilidade (Kittawornrat *et al.*, 2012b). Teste para a detecção de anticorpo neutralizante para o mesmo agente apresentou 94,3% de especificidade e 90,5% repetibilidade (Ouyang *et al.*, 2013).

Tabela 1: Detecção direta de agentes infecciosos utilizando amostras de fluido oral de suínos.

Agente	Rebanho	Forma de detecção	Referencia
PCV2	Experimental	qPCR	Prickett <i>et al.</i> , 2011
	Comercial	PCR	Ramirez <i>et al.</i> , 2012
PRRSV	Comercial	qRT-PCR e qPCR	Prickett <i>et al.</i> , 2008b
	Experimental	qRT-PCR	Prickett <i>et al.</i> , 2008a
	Experimental	qRT-PCR	Kittawornrat <i>et al.</i> , 2010
	Experimental	qRT-PCR	Chittick <i>et al.</i> , 2011
	Comercial	PCR	Ramirez <i>et al.</i> , 2012
	Comercial	qRT-PCR	Decorte <i>et al.</i> , 2013
	Comercial	qRT-PCR	Olsen <i>et al.</i> , 2013b
	Experimental e comercial	ELISA – IgA, IgG e IgM	Kittawornrat <i>et al.</i> , 2012a
Vírus da influenza	Experimental	qRT-PCR e isolamento	Detmer <i>et al.</i> , 2011
	Experimental	qRT-PCR e isolamento	Goodell <i>et al.</i> , 2013
	Experimental	qRT-PCR	Romagosa <i>et al.</i> , 2012
	Comercial	PCR	Ramirez <i>et al.</i> , 2012
Vírus da febre aftosa	Experimental	qRT-PCR	Vosloo <i>et al.</i> , 2013
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Comercial	qPCR e isolamento	Giménez-Lirola <i>et al.</i> , 2013
<i>L. intracellularis</i>	Comercial	LAMP e PCR	Strobel <i>et al.</i> , 2014
	Comercial	qPCR	Frana <i>et al.</i> , 2014
<i>Brachyspira sp.</i>	Experimental	Cultivo	Warneke <i>et al.</i> , 2013
Torque teno virus	Comercial	PCR	Ramirez <i>et al.</i> , 2012
<i>Haemophilus parasuis</i>			
<i>Streptococcus suis</i>	Experimental	PCR	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>A. pleuropneumoniae</i>			

Tabela 2: Detecção de anticorpos contra agentes infecciosos utilizando amostras de fluido oral de suínos.

Agente	Rebanho	Material corda	Forma de detecção	Referencia
PRRSV	Experimental	algodão	IFAT – IgA e IgG; ELISA - IgG	Prickett <i>et al.</i> , 2008a
	Experimental	Algodão , linho, poliéster e poliamida	IPMC, IFA e ELISA – IgA, IgM e IgG	Decorte <i>et al.</i> , 2014
	Experimental e comercial	algodão	ELISA – IgA, IgG e IgM	Kittawornrat <i>et al.</i> , 2012a
	Experimental	algodão	ELISA – IgA, IgG e IgM	Kittawornrat <i>et al.</i> , 2013
	Experimental e comercial	algodão	Anticorpo neutralizante	Ouyang <i>et al.</i> , 2013
	Comercial e experimental	NI	FMIA*	Langenhorst <i>et al.</i> , 2012
	Comercial	algodão	LISA – IgA, IgG e IgM	Kittawornrat <i>et al.</i> , 2014
<i>E. rhusiopathiae</i>	Comercial	algodão	ELISA e FMIA* – IgG e IgM	Giménez-Lirola <i>et al.</i> , 2013
Febre aftosa	Experimental	NI	ELISA captura e ELISA duplo- IgA, IgG e IgM	Pacheco <i>et al.</i> , 2010
	Experimental	NI	ELISA IgA, IgM e IgG	Panyasing <i>et al.</i> , 2013
Vírus da influenza	Experimental	algodão	ELISA	Panyasing <i>et al.</i> , 2014
	Experimental	algodão	ELISA – IgA, IgG e IgM	Prickett <i>et al.</i> , 2011
Peste suína africana	Experimental	algodão	ELISA e IPT** - IgG	Mur <i>et al.</i> , 2013
PCV2	Experimental e comercial	Swab de algodão	ELISA - IgA	Loftager <i>et al.</i> , 1993
	comercial		ELISA	Ramirez <i>et al.</i> , 2012

NI – não informado; *Imunoensáio com microesferas fluorescentes

**Imunoperoxidase indireta

1.5.REFERÊNCIAS

- ALBERDI, M.P.; WATSON, E.; MCALLISTER, G.E.; *et al.* Expression by *Lawsonia intracellularis* of type III secretion system components during infection. *Vet Microbiol*, v.139, n.3-4, p.298-303, 2009.
- ALBERTON E. L., SALES DA CRUZ R. A., CALDEIRA F. H.B. *et al.*, Prevalência da enteropatia proliferativa suína causada por *Lawsonia intracellularis* em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.39, n1, p.1-4, 2011.
- BACKHANS, A.; JACOBSON, M.; HANSSON, I.; *et al.* Occurrence of pathogens in wild rodents caught on Swedish pig and chicken farms. *Epidemiol Infect*, v.141, n.9, 1885-1891, 2013.
- BECKLER, D.C.; AMONSIN, A.; KAPUR, V.; *et al.* Molecular epidemiologic typing of *Lawsonia intracellularis*. In: 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany. Proceedings ... Proceedings of the 18th IPVS Congress, v.1, p 249. 4004(a).
- BECKLER, D.C.; AMONSIN, A.; KAPUR, V.; *et al.* Multiple-Locus variable number tander repeat analysis for the differentiation of *Lawsonia intracellularis* isolates. *American association of Swine Veterinarians*, p.41-43, 2004(b).
- BOUTRUP, T.S.; BOESEN, H.T.; BOYE, M.; *et al.* Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol*, v.143, n.2-3, p.101-109, 2010.
- BRONSVOORT M, NORBY B, BANE DP, *et al.* Management factors associated with seropositivity to *Lawsonia intracellularis* in US swine herds. *J Swine Health Prod*. v.9, n.6, p.285-289, 2001.
- BRONSVOORT, M.; NORBY, B.; BANE, D.P. *et al.* Management factors associated with seropositivity to *Lawsonia intracellularis* in US swine herds. *J. Swine Health Prod.*, v.9, p.285-290, 2001.
- CHITTICK, W.A.; STENSLAND, W.R.; PRICKETT, J.R.; *et al.* Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine oral fluid specimens. *J Vet Diagn Invest*, v.23, n.2, p.248-253, 2011.
- COLLINS AM, LOVE RJ, JASNI S, MCORIST S. Attempted infection of mice, rats and chickens by porcine strains of *Lawsonia intracellularis*. *Aust Vet J*. Feb. v.77, n.2, p.120-122, 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., DIJK, M.V.; VU N.Q.; *et al.* Immunity to *Lawsonia intracellularis*. In: Allen D. Leman Swine Conference, 2001, Minneapolis. Allen D. Leman Swine Conference. Saint Paul: Veterinary Outreach Programs/University of Minnesota, 2001. p. 115-120.
- COLLINS, A.M.; FELL, S.; PEARSON, H.; *et al.* Colonisation and shedding of *Lawsonia intracellularis* in experimentally inoculated rodents and in wild rodents on pig farms. *Vet Microbiol*, v.150, p.384-388, 2011.
- COLLINS, A.M.; LOVE, R.J.; Re-challenge of pigs following recovery from proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.*, v.120, 381-386, 2007.

COOPER, D.M., SWANSON, D.L., BARNS, S.M., GEBHART, C.J. Comparison of the 16S ribosomal DNA sequences from the intracellular agents 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.635-9, 1997(a).

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, n.1, p.47-62, 1997(b).

CORZO CA, FRIENDSHIP R, DEWEY C, BLACKWELL T. Comparison of 2 serologic tests for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *The Canadian Veterinary Journal.* v.46, n.5, p.433-435, 2005.

COSTA, G.; OLIVEIRA, S.; TORRISON, J. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs. *J Swine Health Prod*, v.20, n.2, p.78–81, 2012.

DECORTE, I.; VAN BREEDAM, W.; VAN DER STEDE, Y. *et al.* Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs. *BMC Vet Res*, v.10:134, 2014.

DECORTE, I.; VAN DER STEDE, Y.; NAUWYNCK, H. *et al.* Effect of saliva stabilisers on detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in oral fluid by quantitative reverse transcriptase real-time PCR. *Vet J*, v.197, n.2, p.224-228, 2013.

DETMER, S.E.; PATNAYAK, D.P.; JIANG, Y.; *et al.* Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *J Vet Diagn Invest*, v.23, n.2, p.241-247, 2011.

DRIEMEIER, D.; FACCINI, G.S.; OLIVEIRA, R.T. *et al.* Silver staining combined to alcian blue and hematoxylin-eosin for detection of swine proliferative enteropathy. *Acta Histochem*, v.104, p.285-287, 2002.

DROLET, R.; LAROCHELLE, D.; GEBHART, C.J. Proliferative enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* (ileal symbiont intracellularis) in white-tailed deer. *J Vet Diagn Invest.*, v.8, n.2, p.250-253, 1996.

ESCRIBANO, D.; GUTIÉRREZ, A.M.; MARTÍNEZ SUBIELA S.; *et al.* Validation of three commercially available immunoassays for quantification of IgA, IgG, and IgM in porcine saliva samples. *Res Vet Sci*, v.93, n.2, p.682-687, 2012.

FACCINI, G.S.; GUEDES, R.M.C.; PESCADOR, C.A. *et al.* Diagnóstico histoquímico e imunohistoquímico da enteropatia proliferativa (*Lawsonia intracellularis*) em suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.569-575, 2005.

FELLSTRÖM, C.; ZIMMERMAN, U.; ASPAN, A. *et al.* The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Animal Health Research Reviews*, v. 2, n. 1, p. 37–43. 2001. doi: 10.1079/AHRR200120

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

FOX, J.G.; LAWSON, G.H.K. Campylobacter-like omega intracellular antigen in proliferative colitis of ferrets. *Laboratory Animal Science*, Londres, v.38, p.34-36, 1988.

- FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; FRASER, G.J.; *et al.* Intracellular Campylobacter-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J Clin Microbiol*, v.32, n.5, p.1229-1237, 1994.
- FRANA, T.; WARNEK, H.; STENSLAND, W.; *et al.* Comparative detection of *Lawsonia intracellularis*, Salmonella, and Brachyspira from oral fluids and feces. In: 45nd Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, 2014, Dallas, Texas. Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians. p. 67-69, 2014.
- FRANÇA, S. de A. GUEDES, R.M.C. Antimicrobial use for the control of porcine proliferative enteropathy. *Cienc. Rural*, v.38, n.1, 2008.
- FRANÇA, S.A.; MACHADO, G.S.; ANDREOLI, P.R.; *et al.* In-feed macrolide Leucomycin (Leucomag 30% PR) for prevention of proliferative enteropathy in experimentally infected pigs. *Ciência Rural*, v.40 n.6, p.1376-1384, 2010.
- FRIEDMAN, M.; BEDNÁR, V.; KLIMES, J.; *et al.*, *Lawsonia intracellularis* in rodents from pig farms with the occurrence of porcine proliferative enteropathy. *Lett Appl Microbiol*. v.47, n.2, p.117-121, 2008.
- GEBHART, C. *Lawsonia intracellularis* infections. In: 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. Proceedings... Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, v. 1, p.48-53, 2006.
- GEBHART, C.J.; BARNS, S.M.; MCORIST, S.; *et al.* *Ileal symbiont intracellularis*, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int J Syst Bacteriol*, v.43 n.3, p.533-538, 1993.
- GEBHART, C.J.; LIN, G.F.; MCORIST, S.M.; *et al.* Cloned DNA probes specific for the intracellular Campylobacter-like organism of porcine proliferative enteritis. *J Clin Microbiol*, v.29 n.5, p.1011-1015, 1991.
- GIMÉNEZ-LIROLA, L.G., XIAO, C.T., ZAVALA, M.; *et al.* Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. *J Microbiol Methods*. v.92 n.2, p.113-21, 2013.
- GO, Y.Y.; LEE, J.K.; YE, J.Y.; *et al.* Experimental reproduction of proliferative enteropathy and the role of IFN- γ in protective immunity against *Lawsonia intracellularis* in mice. *J. Vet. Sci.*, v. 6, p.357-359, 2005.
- GOODELL, C.K.; PRICKETT, J.; KITTAWORNAT, A.; *et al.* Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. *Vet Microbiol*, v.166, n.3-4, p.450-60, 2013.
- GUEDES, R.M.C. Diarreias e enterites em leitões de recria e terminação. VII Seminário de Aves e Suínos – AveSui Regiões, Suinocultura, Belo Horizonte – MG, 2007a, p.39 – 43.
- GUEDES, R.M.C. Enteropatia proliferativa suína In: Sobestiansky, J. & Barcelos, D. Doenças dos suínos. Goiânia: Cãnone Editora, 2007b, p. 109 - 117.
- GUEDES, R.M.C.; 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, n.2, p.97-101, 2010.

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, p135-145, 2003(a).

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, 2003(b).

GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Progression of *L. intracellularis* infection and mucosal immune response in pigs. In: International Pig Veterinary Society, 2004, Hamburgo. Proceedings of the IPVS Congress, v. 18. p. 65, 2004.

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 hemorrhagic enteropathy. *Can J Vet Res*, v.66, n.4, p.258-63, 2002(a).

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, n.5, p.420-423, 2002 (b).

HAMMER, J.M. The temporal relationship of fecal shedding of *Lawsonia intracellularis* and seroconversion in field cases. *J Swine Health Prod*, v.12, n.1, p.29-33, 2004.

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

JACOBSON M, ANDERSSON M, LINDBERG R, *et al.* Microarray and cytokine analyses of field cases of pigs with diarrhoea. *Vet Microbiol*, v.153, p.307–314, 2011.

JONES, T.H.; MUEHLHAUSER, V. Effect of handling and storage conditions and stabilizing agent on the recovery of viral RNA from oral fluid of pigs. *J Virol Methods*, v.198, p:26-31. 2014.

JORDAN, D.M., KNITTEL, J.P., SCHWARTZ, K.J., ROOF, M.B., HOFFMAN, L.J. A *Lawsonia intracellularis* transmission study using a pure culture inoculated seeder-pig sentinel model. *Vet Microbiol.* v.104, n.1-2, p.83-90, 2004.

KITTAWORNAT, A.; ENGLE, M.; PANYASING, Y.; *et al.* Kinetics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) humoral immune response in swine serum and oral fluids collected from individual boars. *BMC Vet Res.* v.28 n.9, p.61. 2013.

KITTAWORNAT, A.; PANYASING, Y.; GOODELL, C.; *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) surveillance using pre-weaning oral fluid samples detects circulation of wild-type PRRSV. *Vet Microbiol.* v.168, n.2-4, p.331-339, 2014.

KITTAWORNAT, A.; PRICKETT, J.; CHITTICK, W.; *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.* v.154, n.1-2, p.170-176, 2010.

KITTAWORNAT, A.; PRICKETT, J.; WANG, C.; *et al.* Detection of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay *J Vet Diagn Invest.*, v.24, n.2, p.262-269, 2012 (a).

- KITTAWORN RAT, A.; WANG, C.; ANDERSON, G.; *et al.* Ring test evaluation of the repeatability and reproducibility of a Porcine reproductive and respiratory syndrome virus oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest*, v.24, p.6, p.1057-1063, 2012 (b).
- KROLL, J.J.; ROOF, M.B.; HOFFMAN, L.J.; *Et al.* Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim. Health Research Reviews*, v.6, n.2, p.173–197, 2005.
- KUKUSHKIN, S.; OKOVYTAYA, T. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and PCV2 in commercial pig farms in Russia. *Vet. Record*. 2012. doi: 10.1136/vr.100874
- LANGENHORST, R.J.; LAWSON, S.; KITTAWORN RAT, A. *et al.* Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using oral fluid samples as an alternative to serum-based assays. *Clin Vaccine Immunol*, v.19, n.2, p.180-189, 2012.
- LAVOIE, J.P.; DROLET, R.; PARSONS, D.; *et al.* Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhea and hypoproteinaemia in foals on breeding farms in Canada. *Equine Vet J*. v.32, n.5, p.418-25, 2000.
- LAWSON, G.H.; MACKIE, R.A.; SMITH, D.G.; *et al.* Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont *intracellularis* depends on host cell function and actin polymerisation. *Vet Microbiol*, v.45, n.4, p.:339–350, 1995.
- LAWSON, G.H.; MCORIST, S.; JASNI, S.; *et al.* Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *J Clin Microbiol*, v.31, n.5, p.1136–1142, 1993.
- LAWSON, G.H.; ROWLAND, A.C.; MACINTYRE, N. Demonstration of a new intracellular antigen in porcine intestinal adenomatosis and hamster proliferative ileitis. *Vet Microbiol*, v.10, n.4, p.303-13, 1985.
- LAWSON, G.H. & GEBHART, C.J. Proliferative enteropathy. *J Comp Pathol*, v.122, n.2-3, p.77–100, 2000.
- LEMARCHAND T.X., TULLY T.N. JR, SHANE S.M., DUNCAN D.E. Intracellular Campylobacter-like organisms associated with rectal prolapse and proliferative enteroproctitis in emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet Pathol*. v.34, n.2, p.152-156. 1997.
- LöFSTEDT, M.; HOLMGREN, N.; JACOBSON, M.; *et al.* *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* species in Swedish growers. *Proceedings 18th IPVS Cong.*, v.1, p.28, 2004.
- LOFTAGER, M.K.; ERIKSEN, L.; NIELSEN, R. Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci*, v.54, n.1, p.57–62, 1993.
- MACINTYRE N, SMITH DG, SHAW DJ, *et al.* Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Vet Pathol*, v.40, n.4, p.421–432, 2003.
- MARSTELLER TA, ARMBRUSTER G, BANE DP, *et al.* Monitoring the prevalence of *Lawsonia intracellularis* IgG antibodies using serial sampling in growing and breeding swine herds. *J Swine Health Prod*. v.11, n.3, p.127-130, 2003.

- MARSTELLER, T.A.; ARMBRUSTER, G.; BANE, D.P. et al. Monitoring the prevalence of *Lawsonia intracellularis* IgG antibodies using serial sampling in growing and breeding swine herds. *J. Swine Health Prod.*, v.11, p. 127-130, 2003.
- MCORIST S, JASNI S, MACKIE RA, *et al.* Entry of the bacterium ileal symbiont *intracellularis* into cultured enterocytes and its subsequent release. *Res Vet Sci*, v.14, n.3, p.255–260, 1995(a).
- McORIST, S. b Prevalence and impact of proliferative enteropathy (ileitis) in East Asia. *Proceedings 2nd Asian Pig Vet. Soc. Cong.*, p.24-37, 2005b.
- MCORIST, S.; BOID, R.; LAWSON, G.H. Antigenic analysis of *Campylobacter* species and an intracellular *Campylobacter*-like organism associated with porcine proliferative enteropathies. *Infect Immun*, v.57, n.3, p.957-62, 1989.
- 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*. n.45, n.4, p.820-825, 1995(b).
- MCORIST, S.; KELLER, L.; MCORIST, A.L. Search for *Lawsonia intracellularis* and *Bilophila wadsworthia* in malabsorption-diseased chickens. *Can J Vet Res*, v.67, n.3, p.23223-4, 2003.
- MCORIST, S.; LAWSON, G.H.; ROY, D.J.; *et al.* DNA analysis of intracellular *Campylobacter*-like organisms associated with the porcine proliferative enteropathies: novel organism proposed. *FEMS Microbiol Lett.*, v.57, n.3, p.189-93, 1990.
- MCORIST, S.; ROBERTS, L.; JASNI, S.; *et al.* Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. *J Comp Pathol*, v.115, n.1, p.:35–45, 1996.
- MORENO, A.M.; BACCARO, M.R.; COUTINHO, L.L. et al. Frequência de detecção de *Lawsonia intracellularis* através da PCR de suínos no período de dezembro de 1996 a fevereiro de 1999. *IX Cong. Brasil. Vet. Especial. Suínos*, p.205-206, 1999.
- MORENO, A.M.; BACCARO, M.R.; COUTINHO, L.L. *Lawsonia intracellularis* detection in swine feces from important producing regions in Brazil. *Arq. Inst. Biol.*, v.69, p.5-8, 2002.
- MUR, L.; GALLARDO, C.; SOLER, A. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Vet Microbiol*, v.165, n.1-2, 135-139, 2013.
- MURAKATA, K.; SATO A.; YOSHIYA, M. *et al.* Infection of different strains of mice with *Lawsonia intracellularis* derived from rabbit or porcine proliferative enteropathy. *J Comp Pathol*, v.139, n.1, p.8-15, 2008.
- NOGRADI, N.; SLOVIS, N.M.; GEBHART, C.J.; *et al.* Evaluation of the field efficacy of an avirulent live *Lawsonia intracellularis* vaccine in foals. *Vet J*, v.192, n.3, p.511-513, 2012.
- NOGUEIRA, M.G.; COLLINS, A.M.; DONAHOO, M.; *et al.* Immunological responses to vaccination following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. *Vet Microbiol*, 164, n.1–2, p.131–138, 2013.
- OH, Y.S.; LEE, J.B.; MCORIST, S. Microarray analysis of differential expression of cell cycle and cell differentiation genes in cells infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet J*, v.184, n.3, p.340–345, 2010.

- OLSEN, C.; KARRIKER, L.; WANG, C. *et al.* Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J*, v.198, n.1, p.158-163, 2013(a).
- OLSEN, C.; WANG, C.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J. *et al.* Probability of detecting Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence. *J Vet Diagn Invest*, v.25, n.3, p.328-335, 2013(b).
- ORUÇ, H.H.; RUMBEIHA W.K.; ENSLEY S.; *et al.* Simultaneous Detection of Six Different Groups of Antimicrobial Drugs in Porcine Oral Fluids Using A Biochip Array-Based Immunoassay. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, v.19, n.3 p.407-412, 2013.
- OUYANG, K.; BINJAWADAGI, B.; KITTAWORNARAT, A. *et al.* Development and validation of an assay to detect porcine reproductive and respiratory syndrome virus-specific neutralizing antibody titers in pig oral fluid samples. *Clin Vaccine Immunol*, v.20, n.8, p.1305-1313, 2013.
- PACHECO, J.M.; BUTLER, J.E.; JEW, J.; *et al.* IgA Antibody Response of Swine to Foot-and-Mouth Disease Virus Infection and Vaccination. *Clin Vaccine Immunol*; v.17, n.4, p.550–558. 2010.
- PANYASING, Y.; GOODELL, C.K.; GIMÉNEZ-LIROLA, L.; *et al.* Kinetics of influenza A virus nucleoprotein antibody (IgM, IgA, and IgG) in serum and oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions. *Vaccine*. v.31, n.52, p.6210-6215, 2013.
- PANYASING, Y.; GOODELL, C.K.; WANG, C.; *et al.* Detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies in oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions using a blocking ELISA. *Transbound Emerg Dis*. v.61, n.2, p.177-184, 2014.
- PARADIS, M.; GOTTSCHALK, M.; RAJIC, A. *et al.* Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. *Can. Vet. J.*, v.48, p.57-62, 2007.
- PARADIS, M.-ANNE, GOTTSCHALK, M.; RAJIC A. *et al.* Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. *Can Vet J*; v.48, p.57–62, 2007.
- PRICKETT JR, CUTLER S, KINYON JM, *et al.* Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *J Swine Health Prod*. v.18, n.4, p.187–195, 2010.
- PRICKETT, J.; SIMER, R.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; *et al.* Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest*. v.20, n.2, p.156-63, 2008 (a)
- PRICKETT, J.R., JOHNSON, J.; MURTAUGH, M.P.; *et al.* Prolonged Detection of PCV2 and Anti-PCV2 Antibody in Oral Fluids Following Experimental Inoculation. *Transbound Emerg Dis*, v.58, n.2, p.121–127, 2011.
- PRICKETT, J.R.; KIM, W.; SIMER, R.; *et al.* Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod*;v.16, n.2, p.86–91, 2008 (b).
- PRICKETT, J.R.; ZIMMERMAN, J.J. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Anim Health Res Rev*, v.11, n.2, p.207-216, 2011.
- PUSTERLA, N.; MAPES, S.; GEBHART, C. Further investigation of exposure to *Lawsonia intracellularis* in wild and feral animals captured on horse properties with equine proliferative enteropathy. *Vet J*,v.194, n.2, p. 253-255, 2012.

- PUSTERLA, N.; MAPES, S.; REJMANEK, D.; *et al.* Detection of *Lawsonia intracellularis* by Real-time PCR in the Feces of Free-living Animals from Equine Farms with Documented Occurrence of Equine Proliferative Enteropathy. *J Wildl Dis*, v.44, n.4, p. 992–998, 2008.
- RAMIREZ, A.; WANG, C.; PRICKETT, J.R.; *et al.* Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med.*,v.104, n.3-4, p.292-300, 2012.
- RISTOW, L.E.; SILVA, L.G.C.; PEREZ JR, A.A. Levantamento sorológico da enteropatia proliferativa dos suínos (ileíte) no estado de Minas Gerais. *X Cong. Brasil. Vet. Especial. Suínos*, p.43-44, 2001.
- ROMAGOSA, A.; GRAMER, M.; JOO, H.S.; *et al.* Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza Other Respir Viruses*, v.6, n.2, p.110–118, 2012.
- ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.; Intestinal adenomatosis in the pig: immunofluorescent and electron microscopic studies. *Res Vet Sci*, v.17, n.3, p.323–330, 1974.
- SAMPIERI F, VANNUCCI FA, ALLEN AL, *et al.* Species-specificity of equine and porcine *Lawsonia intracellularis* isolates in laboratory animals. *Can J Vet Res*. v.77, n.4, p.261-272, 2013.
- SCHOEB, T.R.; FOX, J.G. Enterococcolitis associated with intraepithelial *Campylobacter*-like bacteria in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Pathol.*; v.27, n.2, p.73–80, 1990.
- SEDDON, Y.M.; GUY, J.H.; EDWARDS, S.A. Optimising oral fluid collection from groups of pigs: effect of housing system and provision of ropes. *Vet J*, v.193, n.1, p.180-184, 2012.
- SMITH, D.G., MITCHELL, S.C., NASH, T., *et al.* Gamma Interferon Influences Intestinal Epithelial Hyperplasia Caused by *Lawsonia intracellularis* Infection in Mice. *Inf. Immunity*, v. 68, p. 6737-6743, 2000.
- SMITH, S.H.; McORIST, S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res. Vet. Sci.*, v.62, p.6-10, 1997.
- SMITH, S.H.; WILSON, A.D.; VAN ETTINGER, I.; *et al.* Down-regulation of mechanisms involved in cell transport and maintenance of mucosal integrity in pigs infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet Res*, v.20, p.45:55, 2014.
- STEGE, H.; JENSEN T.K.; MØLLER, K. *et al.* Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in pig herds. *Vet Microbiol*, v.104, n.3-4, p.197-206, 2004.
- 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.
- STROBEL, R.; KELLEY, M.; GEBHART C. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the detection of *L. intracellularis* in feces from experimentally and naturally infected pigs. In: 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, 2014, Cancun. Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Cancun: IPVS, 2014. v. I. p.319.
- VANNUCCI F.A., BORGES E.L, de OLIVEIRA J.S., *et al.* Intestinal absorption and histomorphometry of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet Microbiol*, 145, n.3–4, :p.286–291, 2010.

- VANNUCCI FA E GEBHART CJ. Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet Pathol.* v.51, n.2, p.465-477, 2014.
- VANNUCCI FA, FOSTER DN, GEBHART CJ. Laser microdissection coupled with RNA-seq analysis of porcine enterocytes infected with an obligate intracellular pathogen (*Lawsonia intracellularis*). *BMC Genomics*, v.14, p.421–436, 2013 (c).
- VANNUCCI, F.A.; BECKLER, D.; PUSTERLA, N.; *et al.* Attenuation of virulence of *Lawsonia intracellularis* after in vitro passages and its effects on the experimental reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol*, v.162, n.1, p.265–269, 2013(b).
- VANNUCCI, F.A.; FOSTER, D.N.; GEBHART, C.J. Comparative transcriptional analysis of homologous pathogenic and non-pathogenic *Lawsonia intracellularis* isolates in infected porcine cells. *PLoS One*, v.7, n.10, p.e46708. 2012 (a).
- VANNUCCI, F.A.; KELLEY, M.R.; GEBHART, C.J. Comparative genome sequencing identifies a prophage-associated genomic island linked to host adaptation of *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet Res*, v.4, n.44, p.49–58, 2013 (a).
- VANNUCCI, F.A.; PUSTERLA, N.; MAPES, S.M.; *et al.* Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet Res*, v.43, n.1, p.53, 2012 (b).
- VANNUCCI, F.A.; WATTANAPHANSAK, S.; GEBHART, C.J. An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. *J Clin Microbiol*, v.50, n.3, p.1070–1072, 2012 (c)
- VIOTT A. de M., FRANÇA, S.A., VANNUCCI F.A., *et al.* Infection of sparrows (*Passer domesticus*) and different mice strains with *Lawsonia intracellularis* *Pesq. Vet. Bras.* v.33, n.3, p.372-378, 2013.
- VIOTT, A.M., LAGE, A.P., CRUZ, E.C. JR, GUEDES, R.M. The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. *Braz J Microbiol.* v.44, n.1, p.145-51, 2013a.
- VOSLOO, W.; MORRIS, J.; DAVIS A. *et al.* Collection of Oral Fluids Using Cotton Ropes as a Sampling Method to Detect Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in Pigs. *Transbound Emerg Dis*, 2013.
- WALTER, D.; GEBHART, C.; KROLL, J.; *et al.* Serologic profiling and vaccination timing for *Lawsonia intracellularis*. *J Swine Health Prod*, v.12, n.6, p.310–313, 2004.
- WARNEKE, H.; KINYON, J.; BURROUGH, E.; *et al.* Use of oral fluids as a surveillance Tool for *Brachyspira* in swine herds. In: *Colonic Spirochaetal Infection in Animals and Humans*, 2013, Guildford. Spirochaete Conference Proceedings. Guildford: Univesity of Surrey, 2013. v. 1. p. 43-43.
- WENDT, M.; SCHULZE-JOHANN, R.; VERSPOHL, J. Epidemiological investigations on *Lawsonia intracellularis* infections in German pig herds. *Proceedings 18th IPVS Cong.*, v.1, p.52, 2004.
- WHITE, D.; ROTOLO, M.; OLSEN, C.; *et al.* Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *J. Swine Health Prod*, v.22, n.3, p.138–141, 2014.
- 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.
- WU, Z.; LING, Y.; TIAN, D. *et al.* Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* antibodies in intensive pig farms in China. *BMC Vet. Res.*, v.10, p.1-5, 2014.

CAPÍTULO 2

Avaliação do envolvimento de Camundongos (*Mus musculus*) na epidemiologia da Enteropatia Proliferativa Suína

*Evaluation of involvement of mice (*Mus musculus*) in the porcine proliferative enteropathy epidemiology*

RESUMO

Objetivou-se avaliar a presença da *L. intracellularis* em roedores oriundos de granjas com casos clínicos confirmados de enteropatia proliferativa suína (EPS), e demonstrar a transmissão fecal-oral da *L. intracellularis* entre suínos e camundongos. O trabalho foi realizado em duas fases, uma a campo e outra experimental, dividida em duas etapas. Na fase a campo, armadilhas foram armadas em 2 granjas com casos de EPS. Dos 62 roedores, ratos e camundongos coletados a campo, cinco possuíam DNA do agente nas fezes. Na etapa 1 da fase experimental, foram fornecidas fezes frescas de suínos inoculados com a bactéria à 34 camundongos Swiss (C1), divididos em quatro caixas, e fezes de suínos negativos à outros doze camundongos Swiss (C2). Amostras de fezes dos camundongos foram coletadas aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias pós-exposição (dpe) às fezes dos suínos e testadas pela *nested* PCR. Os animais foram eutanasiados aos 28 dpe. Na etapa 2, 12 suínos foram expostos à fezes de camundongos experimentalmente inoculados com *L. intracellularis* (S1), e dois à fezes negativas (S2), por 4 dias consecutivos. Os animais foram avaliados diariamente quanto aos sinais clínicos de diarreia e eutanasiados aos 30 dpe para avaliação anatomopatológica. Amostras de fezes e soro dos suínos foram coletadas aos 0, 7, 14, 21 e 30 dpe. Na primeira etapa da fase experimental, pelo menos uma das caixas dos camundongos C1 foi positiva para a *L. intracellularis* na *nested* PCR aos 7, 14 e 21 dpe. Na imuno-histoquímica (IHQ) apenas 3 animais apresentaram marcação positiva. Na segunda etapa, 10 suínos S1 apresentaram infecção pela *L. intracellularis*, pois foram positivos na PCR e/ou na IHQ. Os primeiros animais foram positivos na PCR aos 7 dpe, e 11 soroconverteram a partir de 21 dpe. Na IHQ, 50% dos animais foram positivos, confirmando a infecção. Nosso estudo demonstra que camundongos são capazes de se infectar e eliminar o agente nas fezes e serem, portanto, hospedeiros e fontes de infecção de *L. intracellularis* para suínos susceptíveis.

Palavras-chave: *L. intracellularis*; epidemiologia; suínos

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the presence of *L. intracellularis* in rodents trapped in swine farms with clinical signs of Porcine Proliferative Enteropathy (PPE), and evaluate the fecal-oral transmission of *L. intracellularis* between mice and pigs. The study was conducted in field and experimental trials, this divided into two stages. In the field trial, rodent traps were laid in two farms with cases of PPE. Of the 62 caught rodents, five had *L. intracellularis* DNA in stools. In the first part of the experimental study, thirty-four Swiss mice were allocated in 4 boxes, and received 20g/box of swine feces previously inoculated with *L. intracellularis* (C1), for four consecutive days. Twelve other mice received swine feces negative for *L. intracellularis* (C2). Pool of mice feces were collected from each box on 0, 7, 14, 21, 28 days post exposition (dpe). All mice were euthanized on day 28 dpe and intestinal samples were collected for immunohistochemistry (IHC). In second part of the study, twelve 5-week-old pigs were exposed to feces of experimental infected mice (S1) and other two pigs were exposed to negative mice feces (S2), for four consecutive days. Fecal and serum samples were collected from each pig on 0, 7, 14, 21, 28 dpe. All pigs were euthanized at 30 dpe and intestinal samples were collected for IHC. Pig serum samples were tested by IPMA. Pig and mice feces were tested by PCR. In the first study, at least one box of mice of M1 were PCR positive for *L. intracellularis* on 7, 14 and 21 dpe. Using IHC, three mice from the exposed group were positive at the end of the study. In the second study, 10 pigs (S1) were infected by *L. intracellularis*, based on PCR and/or immunohistochemistry positive results. PCR positive animals were detectable at 7 dpe, and seroconversion occurs at 21 dpe. Using IHC, 50% of the animals were positive. Our study demonstrates that mice can be infected and eliminated *L. intracellularis* in the feces and, therefore, can host and be a source of infection for susceptible pigs.

Keywords: *L. intracellularis*; epidemiology; pig

2.1. INTRODUÇÃO

Enteropatia Proliferativa Suína (EPS) é uma das doenças entéricas mais prevalentes em granjas de suínos em todo o mundo e tem como agente etiológico a bactéria *Lawsonia intracellularis*. Esse agente é capaz de infectar outras espécies animais como equinos e hamsters, e seu DNA já foi detectado em diversas espécies de animais domésticos e silvestres (Pusterla *et al.*, 2008; 2012a). A maior fonte de contaminação e disseminação do agente em granjas suínas e haras são os indivíduos das respectivas espécies que apresentam a forma subclínica da doença (Paradis *et al.*, 2012). Contudo, uma vez que há relato de surtos de EPS em granjas recém-povoadas por suínos provindos de granjas negativas para o agente ou em haras sem a introdução de novos equinos e, portanto, sem histórico clínico ou subclínico da enfermidade, considera-se a existência de vetores biológicos ou mecânicos que poderiam ser carreadores do agente (Lavoie *et al.*, 2000; Guedes *et al.*, 2002a).

Roedores são pragas comuns em criações de suínos devido à fartura de alimento, presença de água e oferta de abrigo, o que favorece a multiplicação dos mesmos. São animais que, além de causar prejuízos econômicos pelo consumo e contaminação de ração, são possíveis carreadores de diversos patógenos que afetam humanos e/ou outras espécies animais (Backhans, 2012). Alguns exemplos de patógenos causadores de doenças em suínos detectados em roedores capturados em granjas são Circovirus (Pinheiro *et al.*, 2012), *Brachyspira* sp. (Backhans *et al.*, 2011), *Leptospira* spp. (Backhans *et al.*, 2011) e *Toxoplasma gondii* (Kijlstra *et al.*, 2008). O DNA da *L. intracellularis* já foi detectado em ratos e camundongos capturados em haras e em granjas de suínos positivos para *L. intracellularis* (Friedman *et al.*, 2008; Pusterla *et al.*, 2008; 2012a; Collins *et al.*, 2011; Backhans, *et al.*, 2013). Como ratos capturados em granjas podem eliminar em média 10^3 – 10^5 *L. intracellularis*/g de fezes (Collins *et al.*, 2011), dose suficiente para infectar suínos susceptíveis, sugere-se que roedores possam se infectar com cepas suínas de *L. intracellularis* e servirem como vetores biológicos.

Inoculações experimentais interespecie de cepas suínas e equinas de *L. intracellularis* demonstraram que a bactéria apresenta certo grau de adaptação ao hospedeiro (Vannucci *et al.*, 2013; Sampieri *et al.*, 2013). Apesar desses achados, em estudo fornecendo fezes de coelhos experimentalmente infectados com cepa equina de *L. intracellularis* à equinos susceptíveis foi reproduzida a transmissão fecal-oral interespecie (Pusterla *et al.*, 2013), demonstrando que coelhos podem ser possíveis vetores biológicos para o agente. Não há trabalhos simulando essa transmissão fecal-oral interespecie com cepas de *L. intracellularis* suínas.

Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar a presença da *L. intracellularis* em roedores oriundos de granjas com casos clínicos confirmados de EPS, e confirmar a transmissão fecal-oral da *L. intracellularis* entre camundongos e suínos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Comitê de ética

Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo número 94/2012, aprovado em 14 de março de 2013.

2.2.2. Fase 1 – Amostras de campo

Ratos e camundongos foram capturados com armadilhas em duas granjas de suínos positivos e com quadro clínico de EPS (granjas A e B), localizadas no estado de Minas Gerais, Brasil. Os roedores foram coletados, de forma não contínua, no período de janeiro a junho de 2013, na granja A, e de julho de 2014 a fevereiro de 2015 na granja B.

A granja A não possuía nenhuma forma de controle de roedores durante o período de coleta. Na granja B o controle dos roedores era realizado através de produtos químicos (raticidas - Racumin® Isca), distribuídos por toda a granja, em períodos alternados, sendo que no período de coleta não foi realizado controle.

Para a coleta dos roedores, armadilhas foram dispostas na parte externa e interna dos galpões, em corredores e vigas de salas de ração e em salas vazias. As armadilhas foram armadas com iscas contendo pasta de amendoim, óleo de fígado de bacalhau, aveia e ração suína, sendo checadas diariamente, e realizada a troca das iscas se necessário.

Alguns roedores na granja A foram eutanasiados, necropsiados, e amostras de fezes e intestino coletadas e armazenadas a -20°C e em formol 10%, respectivamente. Os demais roedores da granja A e os roedores da granja B foram eutanasiados e armazenados a -20°C para posterior realização de necropsia e coleta de fezes. Para a eutanásia dos ratos e camundongo foi utilizado associação de Quetamina, dose superior a 100 mg/Kg, e Xilazina com dose superior a 15 mg/kg.

A necropsia dos animais foi realizada com material estéril e individual para cada animal. Fezes de cada porção do intestino, do intestino delgado, ceco e reto, foram coletadas. Para a realização da *nested* PCR (Jones *et al.*, 1993), foi priorizada as fezes do reto e ceco.

Fezes de 30 suínos diarreicos em fase de crescimento e terminação foram coletadas para a detecção de *L. intracellularis* pela PCR (Jones *et al.*, 1993) e verificar o status de infecção da granja no período de coleta dos roedores. Demais informação sobre as granjas foram obtidas com os médicos veterinários responsáveis.

2.2.3. Fase 2 - Fase experimental

A fase experimental teve como objetivo avaliar a transmissão fecal-oral da *L. intracellularis* entre camundongos e suínos. Essa fase foi dividida em duas etapas. Todos os procedimentos de inoculação em suínos e camundongos foram realizados nas dependências do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2.2.3.1. Animais

Camundongos

Foram utilizados no total 166 camundongos (*Mus musculus*) de linhagem Swiss, machos e fêmeas de 3 a 4 semanas de idade, pesando em média de 15g, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG). Os animais foram divididos em grupos de oito animais em caixas de polipropileno (41x34x16cm), com cama de maravalha, em ambiente controlado (12 horas de luz diária e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$) e fornecimento de água e ração peletizada comercial (Nuvilab CR1-Nuvital. ®) à vontade. Anteriormente à realização do experimento, os camundongos foram aclimatizados por uma semana e vermifugados (Ivermectina 1%).

Suínos

Foram utilizados no total 18 leitões com 35 dias de idade, com peso vivo variando entre 9 a 12 Kg, obtidos de uma granja multiplicadora, sem histórico e sem diagnóstico positivo na PCR para EPS ou outras doenças entéricas consideradas no diagnóstico diferencial da EP, com Disenteria suína e Colite espiroquetel. Os animais foram identificados por brincos, e alojados em baias suspensas, com fornecimento de água e ração à vontade.

2.2.3.2. Etapa 1

Essa etapa teve como objetivo induzir a contaminação por via oral de camundongos com fezes de suínos experimentalmente inoculados com cepa suína de *L. intracellularis* e, conseqüentemente, avaliar a capacidade dos camundongos de apresentarem a doença na forma clínica e/ou subclínica.

Para isso, foram utilizados 4 suínos, de 35 dias de idade, com peso vivo variando entre 9 a 12 Kg. No dia zero do experimento os suínos foram inoculados, por via intragástrica (Figura 3), com raspado de mucosa intestinal de suínos com lesão característica de EP e confirmada à infecção pelo método de IHQ. Todo o procedimento de preparação, inoculação e quantificação do inóculo foi realizado segundo protocolo já estabelecido (Guedes *et al.*, 2009; França *et al.*, 2010). Cada suíno recebeu 60 mL de inóculo contendo aproximadamente 10^9 organismos de *L. intracellularis*/mL.

Baseado em estudos anteriores (Vannucci *et al.*, 2012), amostras de fezes dos leitões foram coletadas aos 14 dias pós-inoculação (dpi) e testadas pela PCR, para confirmação da positividade dos mesmos. Ao 15° dpi amostras de fezes dos suínos foram coletadas diretamente da ampola retal, duas vezes ao dia por quatro dias consecutivos. Alíquotas de 2 a 3g foram separadas para a realização de PCR e o restante foi oferecido aos camundongos do grupo exposto. As fezes a serem fornecidas aos camundongos do grupo controle foram coletadas dos mesmos suínos no período anterior à inoculação e permaneceram armazenadas em freezer -80°C até serem utilizadas (Figura 3). Os suínos foram eutanaziados 25 dpi, e os intestinos delgado e grosso foram avaliados macroscopicamente.

Quarenta e quatro camundongos, distribuídos em 4 caixas, foram expostos às fezes dos suínos infectados e 12, distribuídos em duas caixas, à fezes negativas, uma vez ao dia por um período de quatro dias consecutivos (Figura 3). Para o fornecimento das fezes, os pellets de ração dos camundongos foram recobertas (Anexo 3) em proporção de 10g de fezes de suíno para 30g de ração para camundongos. Nesse período os camundongos permaneceram em restrição alimentar.

No 7º dia após a primeira exposição (dpe), iniciou-se a avaliação clínica e coleta de pool de fezes dos camundongos em dias alternados. Para isso, foi realizada a retirada de toda a maravalha das caixas por um período de 2 horas.

No 19 dpe, sete animais do grupo exposto e dois do grupo controle foram eutanasiados, necropsiados e analisados macroscopicamente. Os demais camundongos foram sacrificados 30 dpe às fezes dos suínos, e o intestino de cada animal foi avaliado macroscopicamente e coletado em formol tamponado a 10%. A eutanásia dos camundongos foi utilizada com associação de Quetamina, dose superior a 100 mg/Kg, e Xilazina com dose superior a 15 mg/kg.

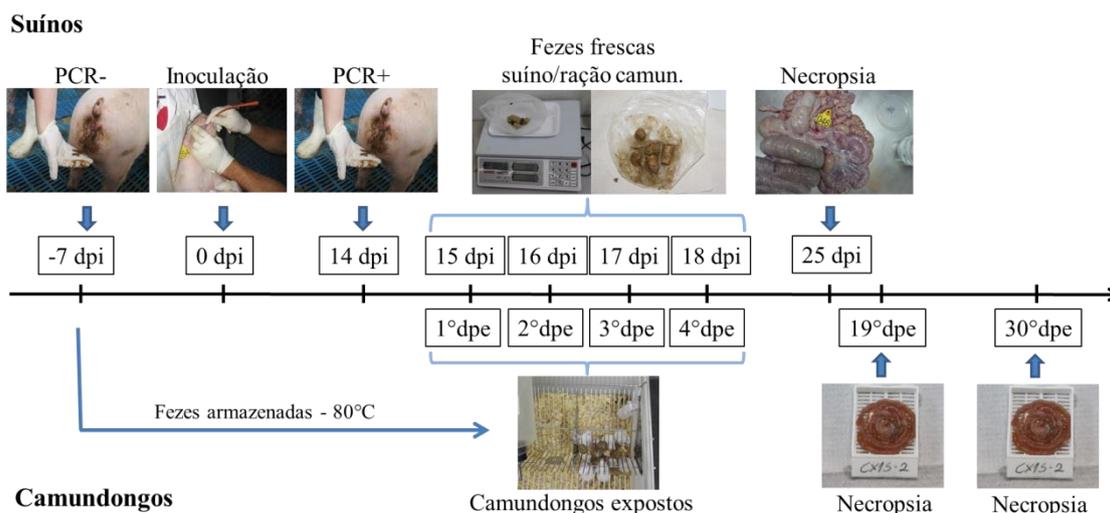


Figura 3: Fase experimental - etapa 1, esquema do fornecimento das fezes de suínos positivas e negativas para *L. intracellularis* para camundongos de linhagem Swiss. Dia -7 pós- inoculação (-7dpi), coleta de fezes dos suínos negativos para *L. intracellularis*, a serem fornecidas aos camundongos do grupo controle. 0 dpi - inoculação de 4 suínos com 60 mL de inóculo contendo aproximadamente 10^9 organismos de *L. intracellularis*/mL. 14 dpi – Confirmação da eliminação da bactéria nas fezes dos suínos. 15 - 18 dpi – coleta de fezes dos suínos a serem fornecidas aos camundongos do grupo infectado, duas vezes ao dia. 1º - 4º dias pós-exposição (1º-4ºdpe) fornecimento das fezes dos suínos a 12 e 34 camundongos dos grupos controle e inoculado, respectivamente. 25 dpi – eutanásia e necropsia dos suínos com avaliação das lesões macroscópicas. 19º e 32º dpe - eutanásia e necropsia de 9 e 35 camundongos, respectivamente, com avaliação de lesões macroscópicas. Camun. = camundongo.

2.2.3.3. Etapa 2

Essa etapa teve como objetivo induzir a contaminação por via oral de suínos com fezes de camundongos experimentalmente inoculados com cepa suína de *L. intracellularis*.

Para isso foram utilizados 120 camundongos, de linhagem Swiss, divididos em grupo inoculado e controle. No dia zero do experimento (Figura 4), 104 camundongos do grupo infectado foram inoculados, por via intragástrica utilizando agulha de gavagem, com 0,3 mL de cultura pura de *L. intracellularis* (cepa PHE/MN1-00), passagens entre 25 a 34, contendo em média 9.35×10^7 bactéria/mL. Para o grupo controle, 16 camundongos receberam solução de sacarose fosfato glutamato (SPG) pela mesma via.

Baseado em trabalhos anteriores, (Viott, et al., 2013) *pool* de fezes de cada grupo dos camundongos foram coletados aos 8 dpi e testados pela *nested* PCR (Jones et al., 1993), para confirmação da infecção. Ao 9º dpi amostras de fezes dos camundongos foram coletadas de cada caixa, uma vez ao dia por quatro dias consecutivos. As amostras de cada caixa foram homogeneizadas e alíquotas de 0,5 a 1g foram separadas para a realização de *nested* PCR e o restante foi fornecida aos suínos. Os camundongos foram eutanasiados 15 dias após a inoculação.

Para a exposição dos suínos ao agente, foram utilizados 14 suínos divididos em dois grupos: controle com dois e infectados com 12 suínos. Os leitões do grupo inoculado foram expostos às fezes dos camundongos inoculados com a *L. intracellularis* e os animais do grupo controle receberam as fezes dos camundongos controles (negativos) (Figura 4), por um período de quatro dias consecutivos e, posteriormente, foram observados diariamente para a avaliação dos sinais clínicos.

Os suínos foram alojados em baias individuais, e os animais de cada grupo permaneceram em salas separadas, com o mesmo manejo e ambiente. As atividades diárias de manejo dos suínos foram realizadas por pessoas diferentes para cada grupo.

Camundongos

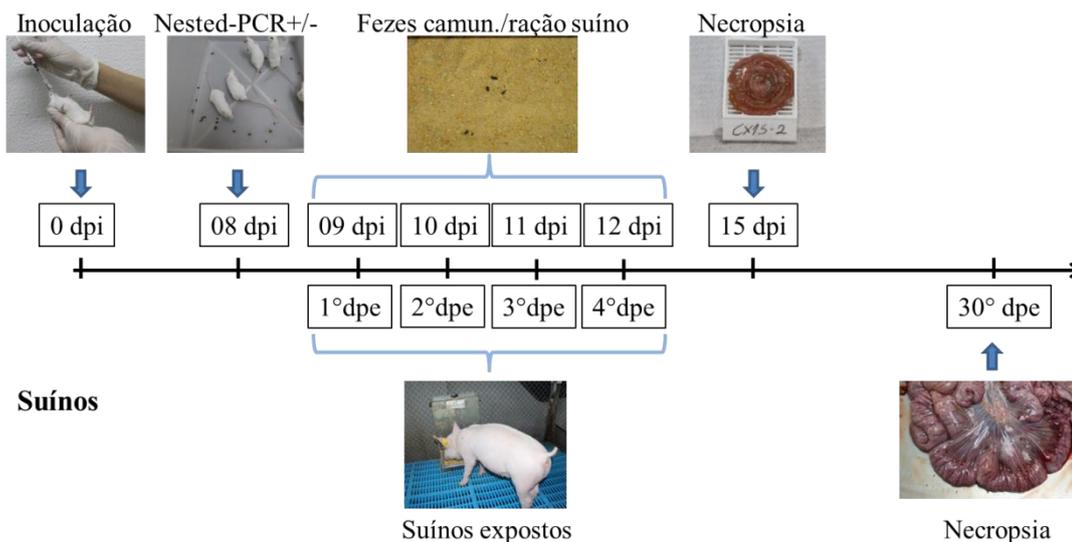


Figura 4: Fase experimental - etapa 2, esquema do fornecimento das fezes de camundongos Swiss experimentalmente inoculados com *L. intracellularis* e negativos, controle, para suínos suscetíveis. 0 dpi - inoculação de 104 camundongos (grupo inoculado) com 0,3 mL de cultura pura de *L. intracellularis* (cepa PHE/MN1-00), passagens entre 25 a 34, contendo em média 9.35×10^7 bactéria/ml. Para o grupo controle, 16 camundongos receberam solução de sacarose fosfato glutamato (SPG) pela mesma via. 8 dpi – Confirmação da eliminação da bactéria nas fezes dos camundongos do grupo inoculado. 9 - 12 dpi – coleta de fezes dos camundongos a serem fornecidas aos suínos do grupo infectado e controle, uma vez ao dia. 1º - 4º dias pós-exposição (1º-4º dpe) fornecimento das fezes dos camundongos a 12 e 2 suínos dos grupos controle e inoculado, respectivamente. 15 dpi – eutanásia e necropsia dos camundongos, com avaliação das lesões macroscópicas. 30º dpe - eutanásia e necropsia dos suínos com avaliação das lesões macroscópicas. Camun. = Camundongo

Avaliações clínicas com relação à característica das fezes dos suínos foram realizadas diariamente a partir da exposição às fezes de camundongos. O escore das fezes foi avaliado de acordo com Guedes *et al.* (2002a): brevemente: 1 - fezes normais; 2 - fezes pastosas sem sangue; 3 - diarreia aquosa, sem fezes escuras ou sangue; 4 - fezes tingidas de sangue; e 5 - diarreia profusa com sangue ou fezes escuras.

Amostras de sangue dos suínos foram coletadas nos dias -3, 7, 10, 17, 24 e 30 dpe, centrifugadas para a obtenção do soro que foram armazenados a -20°C. A sorologia foi realizada através da imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC), de acordo com protocolo descrito por Guedes *et al.* (2002b,c).

Aos 30 dias após a primeira exposição às fezes dos camundongos, os suínos foram eutanasiados. Os intestinos delgado e grosso dos suínos foram avaliados macroscopicamente, por um patologista sem conhecimento prévio dos grupos experimentais, com anotação da extensão e intensidade da lesão. A intensidade foi classificada do grau zero a 3, sendo zero intestinos normais; grau 1, intestino com espessamento de mucosa; grau 2, intestino com espessamento e necrose de mucosa e grau 3, intestino com espessamento de mucosa e hemorragia com formação de coágulo intraluminal (Guedes *et al.* 2002a).

3.2.4 Avaliações macroscópica, histológica e imuno-histoquímica

Intestino delgado, ceco e cólon dos camundongos e dois fragmentos de íleo, ceco e cólon dos suínos, de ambas as etapas experimental, foram coletados e fixados em formol tamponado 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Duas lâminas foram preparadas, uma corada pela técnica histológica de HE (Prophet, 1992) e a outra pela IHQ usando a técnica da Streptavidina marcada, usando anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003b).

Os achados histológicos foram classificados de grau 0 a 3, sendo zero histologicamente normal; grau 1, áreas focais de hiperplasia de criptas intestinais; grau 2, áreas multifocais de hiperplasia de criptas e grau 3, quase a totalidade das criptas hiperplásicas. A marcação pela IHQ foi graduada em escala de zero a quatro, sendo zero nenhuma marcação para *L. intracellularis*; grau 1, foco isolado de marcação antigênica; grau 2, múltiplos focos de marcação antigênica (cerca de 25% das criptas); grau 3 quando a maioria da mucosa apresentou marcação (26 a 75% das criptas) e grau 4, quase a totalidade da mucosa intestinal apresentou marcação antigênica (acima de 80% das criptas) (Guedes e Gebhart, 2003b).

2.2.5 Extração de DNA e reações de PCR

Os DNAs das fezes dos suínos e roedores de ambas as fases do trabalho foram extraídos com kit de extração comercial (QIAamp DNA Stool Mini Kit) de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA das fezes dos suínos e roedores foram submetidos às técnicas de PCR e *nested* PCR, respectivamente (Jones *et al.*, 1993).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Amostra de campo

Foram coletados 31 roedores em cada granja. Na granja A foram capturados 11 camundongos (*Mus musculus*) e 20 ratos (*Rattus rattus*). Na granja B foram obtidos cinco camundongos e 26 ratos.

Dos 31 roedores coletados em cada granja, quatro (12,9%) e um (3,3%) foram positivos na *nested* PCR, das fezes do reto e ceco, para *L. intracellularis* na granja A e B, respectivamente. Na análise histológica e IHQ de 21 animais avaliados da granja A não foram observadas lesões e nem imunomarcção, respectivamente.

Das 30 amostras de fezes dos suínos testadas na PCR, dois animais (6,66) foram positivos na granja A, e cinco animais (16,66) na granja B.

As instalações de creche e armazenamento de ração, nas quais a maioria dos roedores da granja A foram coletados, estavam localizadas no mesmo galpão das baias de terminação. Nessa granja, os suínos não recebiam nenhum tipo de medicação preventiva ou curativa.

Na granja B, segundo informações dos responsáveis pela propriedade, os roedores foram capturados nas instalações de creche e maternidade, e essas se encontravam distantes das instalações de terminação. Nessa granja, os suínos recebiam medicação preventiva em fases de creche, crescimento e terminação.

2.3.2. Fase experimental

2.3.2.1. Etapa 1

Suínos

Todos os suínos utilizados foram negativos na sorologia e na PCR para o agente no início dessa etapa.

Após a inoculação, o início dos sinais clínicos ocorreu aos 10 dpi (1 animal) e 14 dpi (4 animais). Todos os animais apresentavam diarreia no período de coleta das fezes a serem fornecidas aos camundongos, com um suíno apresentando diarreia de grau 3 e os demais apresentavam grau 2. Todos foram positivos na PCR nos quatro dias de coletas de fezes utilizadas como inóculos para os camundongos.

Na Tabela 3 pode-se observar os dados de necropsia, HE e IHQ dos suínos aos 25dpi.

Tabela 3: Grau de lesão macroscópica e microscópica; grau de marcação pela imuno-histoquímica e comprimento de intestinos lesionados dos suínos, dos quais foram coletadas as fezes para a exposição aos camundongos.

Animal	Intestino delgado				Intestino grosso			
	Grau lesão macroscópica *	Extensão total da lesão macroscópica	HE ^{&}	IHQ [#]	Grau lesão macroscópica	Extensão total da lesão macroscópica	HE	IHQ
6	2	172cm	3	3	0	0cm	1	3
9	0	0cm	2	0	0	0cm	1	2
38	2	179cm	3	4	1	18cm	1	3
51	1	4cm	2	2	0	0cm	1	0
721	2	174cm	2	2	0	0cm	0	0

Dados adquiridos 25 dias pós-inoculação. HE = hematoxilina e eosina; IHQ = imuno-histoquímica. & - Grau 1 = intestino com espessamento de mucosa; 2 = intestino com espessamento e necrose de mucosa; 3 = intestino com espessamento de mucosa e hemorragia com formação de coágulo intraluminal. [&] Grau 1 = áreas focais de hiperplasia de criptas intestinais; 2 = áreas multifocais de hiperplasia de criptas; 3 = quase a totalidade das criptas hiperplásicas. [#] Grau 1 = foco isolado de marcação antigênica; 2 = cerca de 25% das criptas marcadas; 3 = cerca de 26 a 75% das criptas marcadas; 4 = > de 80% das criptas.

Camundongos

Os camundongos utilizados foram negativos para o agente no início dessa etapa. Em ambos os grupos não foram observados sinais clínicos de diarreia. Os camundongos do grupo controle permaneceram negativos na PCR e não apresentaram lesões microscópicas ou marcação na IHQ ao término do experimento.

Na *nested* PCR dos pools de fezes de cada caixa do grupo exposto as fezes dos suínos positivos para *L. intracellularis*, uma caixa foi positiva aos 7 dpi, as quatro caixas aos 14 dpi e uma aos 21 dpi.

Aos 19 dpi não foram observadas lesões macroscópicas, microscópicas ou imuno-marcação nos 16 animais sacrificados. Dos 36 camundongos inoculados restantes, apenas 3 animais apresentaram lesão microscópica e marcação positiva na IHQ aos 32 dpe. Todos estes três camundongos estavam alojados em caixas diferentes (caixa 4, 5 e 6) e apenas uma caixa (caixa 3) não apresentou animal com lesão e marcação positiva na IHQ. A lesão histológica observada consistia em proliferação (hiperplasia) leve focal a multifocal de células epiteliais das criptas de Lieberkühn no intestino delgado (um animal) (Fig. 5A e 5B) e glândulas mucosas do cólon (três animais) (Fig. 5C e 5D). Não foi observada reação inflamatória nos intestinos dos camundongos que apresentaram lesão.

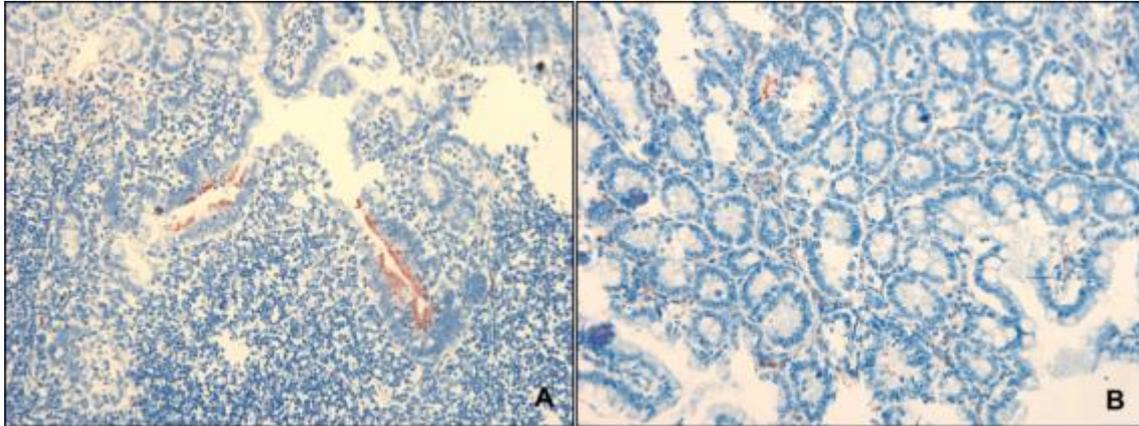


Figura 5: Marcação positiva para *L. intracellularis* em camundongos expostos as fezes de suínos experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*, 32 dpe. A e B: Marcação positiva em vermelho em enterócitos de criptas no intestino delgado. Observa-se também proliferação acentuada de enterócitos com diminuição de células caliciformes. B: Marcação positiva nas glândulas mucosas do colón. Revelação em AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) (20X).

2.3.2.2 Etapa 2

Camundongos

Os 120 camundongos utilizados nessa etapa foram negativos para o agente no início do projeto. Todos os pool de fezes do grupo inoculado foram positivos na *nested* PCR dos 8 aos 12 dpi. Na histologia, 22 animais do grupo inoculado apresentaram alterações histológicas sugestivas de EP, e 7 de 56 animais testados apresentaram marcação positiva na IHQ. Os animais do grupo controle não apresentaram lesões histológicas e foram negativos na IHQ.

Suínos

Os 14 suínos utilizados foram negativos para o agente no início do projeto. Os suínos do grupo controle permaneceram negativos em todas as análises do início ao final do experimento (Tabela 4).

Foi fornecida ao final do período de exposição uma média de $18,93 \pm 2,53$ de fezes de camundongos por suínos (Anexo 4). Os primeiros sinais clínicos apresentados pelos suínos expostos às fezes dos camundongos ocorreram aos 19 dpe com três animais (animal 5, 6 e 14) apresentando fezes pastosas que permaneceram com a mesma constância até 26 dpe. Na PCR, os primeiros suínos positivos foram detectados aos 7 dpe. Na sorologia, cinco animais foram positivos aos 21 dpe e, ao fim do experimento, 9 animais haviam soroconvertido (Tabela 4).

Na necropsia não foram observadas lesões macroscópicas sugestivas de EP nos suínos expostos as fezes dos camundongos. Lesões histológicas características, como hiperplasia de criptas foram observadas em dois animais, um com grau 1 (suíno 6) e outro com grau 2 (suíno 3). Na IHQ, cinco suínos (42%) apresentaram marcação positiva para *L. intracellularis*. A imunomarcação em sua grande maioria foi encontrada em macrófagos, multifocais na lamina própria do íleo e início do ceco. Três animais apresentaram marcação em criptas e em enterócitos da superfície de vilosidades em grau 1 (suínos 6 e 14) e 2 (suínos 3) (Figura 6).

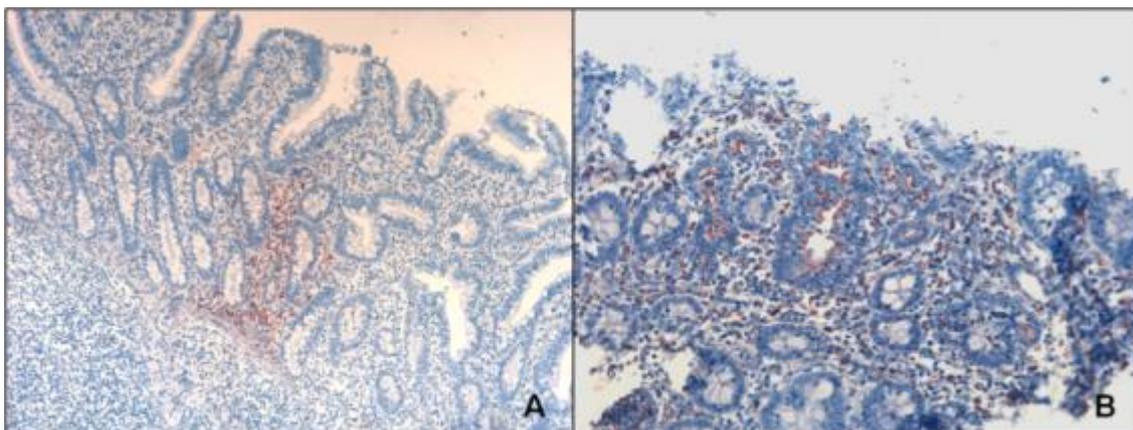


Figura 6: Imuno-histoquímica de suínos expostos às fezes de camundongos experimentalmente infectados com *L. intracellularis*, 30 dpe. A: Área de imunomarcação em macrófagos na lamina própria do íleo (10X). **B:** Imunomarcação em enterócitos de criptas e macrófagos na lamina própria do íleo (3-Amino-9-Ethylcarbazol) (20X).

2.4. DISCUSSÃO

A circulação da *L. intracellularis* nas granjas foi confirmada através da positividade da PCR nas fezes dos suínos, coletadas no início da coleta dos roedores. Na granja A, apesar da baixa porcentagem de animais positivos no trabalho, suínos positivos para o agente haviam sido detectados tanto na PCR quanto em avaliações anatomopatológica em período anterior e posterior as coletadas dos roedores. A porcentagem de roedores positivos na *nested* PCR variou de 12,90% e 3,33% nas granjas A e B, respectivamente. Essa diferença pode ter sido influenciada pelo local de coleta dos roedores. Na granja A, apesar da maioria dos roedores terem sido coletados em instalações de creche e sala de armazenamento de ração, esses locais estão localizados no mesmo galpão das baias de terminação, o que aumenta a possibilidade de contato dos roedores com animais de terminação.

A ausência de medicação nos suínos em todas as fases de produção pode antecipar a infecção dos suínos para a fase de creche (Guedes e Gebhart, 2003), o que pode ter possibilitado também o contato dos roedores com as fezes de suínos positivos nessa fase. Na granja B, a maior quantidade de roedores coletados foi na maternidade e creche, fases onde há alguma circulação do agente em granjas (Guedes e Gebhart, 2003). As instalações de terminação são afastadas dos locais onde os animais foram coletados. Como não houve identificação de coleta para cada

animal, não podemos afirmar o local de coleta do único animal positivo. Como observado no presente trabalho, a porcentagem de positividade para a *L. intracellularis* em roedores varia entre granjas (Friedman *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2011), mas está correlacionada com a circulação do agente (Backhans *et al.*, 2013).

Tabela 4: Resultados dos testes realizados nos suínos expostos as fezes de camundongos infectados e não infectados com *L. intracellularis*.

Suíno	Soroconversão	IHQ ^{&}	HE [#]	PCR					g fezes [@]
				0 dpe [§]	7dpe	14dpe	21 dpe	30 dpe	
1*	-	-	-	-	-	-	-	-	15.95 g
2*	-	-	-	-	-	-	-	-	16.9 g
3	30 dpe	+	+	-	-	+	+	+	18.02 g
4	21 dpe	-	-	-	-	-	-	-	18.92 g
5	21 dpe	-	-	-	+	+	+	-	20.49 g
6	30 dpe	+	+	-	+	-	-	-	19.39 g
7	21 dpe	+	-	-	+	-	-	-	15.12 g
8	-	-	-	-	+	-	-	+	18.43 g
9	21 dpe	-	-	-	+	-	+	-	16.22 g
10	-	-	-	-	-	-	+	+	20.42 g
11	30 dpe	-	-	-	-	+	+	-	22.13 g
12	21 dpe	+	-	-	-	+	+	+	18.98 g
13	-	-	-	-	-	-	+	+	19.30 g
14	21 dpe	+	-	-	-	+	+	+	24.82 g
Total positivos	9	5	2	0	5	5	8	6	

[§]Imuno-histoquímica; [#]Hematoxilina e eosina; [§]Dias pós-exposição dos suínos as fezes dos camundongos. *Suínos controle negativo. [@] Total de grama de fezes de camundongos ingerida por suíno.

Ratos coletados em granjas são capazes de eliminar quantidade suficiente do agente para infectar um suíno (Collins *et al.*, 2011). Em inoculação experimental, tanto ratos como camundongos demonstraram-se susceptíveis a cepas de *L. intracellularis* suína (Collins *et al.*, 1999; Go *et al.*, 2005; Murakata *et al.*, 2008), com eliminação da bactéria por um período de até 14 e 21 dpi, respectivamente (Collins *et al.*, 2011). Porém, não há trabalhos que comprovem a teoria que *L. intracellularis* eliminada nas fezes de roedores são capazes de infectar suínos. Com isso, foi realizada a segunda parte do trabalho, que objetivou a transmissão fecal-oral entre camundongos e suínos semelhante ao que ocorre a campo.

Sabe-se que as diferentes linhagens de camundongos possuem suscetibilidade diferente para a *L. intracellularis* (Go *et al.*, 2005; Murakata *et al.*, 2008; Viott *et al.*, 2013). Linhagens *inbred* (animais consanguíneos) seriam mais susceptíveis ao agente comparada a linhagens *outbred* (animais não consanguíneos) (Go *et al.*, 2005; Murakata *et al.*, 2008). Como nosso objetivo foi simular ao máximo as condições de campo, foi escolhida a linhagem de camundongo Swiss, linhagem considerada *outbred*, constituída de animais que apresentam na constituição genética

uma alta heterozigose, o que faz com que seja mantida numa mesma colônia uma grande diversidade genética, possibilitando a reprodução de populações naturais (dos Santos, 2002). Além disso, essa linhagem demonstrou suscetibilidade a *L. intracellularis* em experimento anterior realizado por nosso grupo (Viott *et al.*, 2013). Assim, a linhagem de camundongo, *outbed*, utilizada no presente estudo, pode ter influenciado na intensidade de lesão e imunomarcacão nos camundongos expostos as fezes dos suínos, na primeira etapa, e inoculados com cultura pura, na segunda etapa. Com linhagem semelhante, Collins e colaboradores (2011) observaram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Na etapa um, a carga bacteriana fornecida aos camundongos pode ter sido baixa, pois foi exposta uma quantidade de 20g/dia de fezes dos suínos a oito camundongos em uma mesma caixa. Apesar de todos terem ficado em restrição alimentar e terem visivelmente entrado em contato com as fezes, não se pode afirmar ao certo a dose ingerida por camundongo. De qualquer forma, foi suficiente para que houvesse eliminaçãõ da bactéria aos 7 e 14 dias pós-exposiçãõ.

Na etapa dois, o número de passagens (passagens 25 a 34) em cultivo celular da *L. intracellularis* utilizadas como inóculos para os camundongos pode também ter interferido na infecçãõ, pois a dose fornecida aos mesmos é semelhante a trabalhos anteriores (Viott *et al.*, 2013). Segundo Vannucci *et al.* (2013) há uma atenuaçãõ do agente entre as passagens 20 e 40, o que justificaria o menor grau de infecçãõ demonstrado pelos camundongos na segunda etapa do experimento em relaçãõ a trabalhos anteriores (Viott *et al.*, 2013). Porém, a baixa infecçãõ na segunda etapa mimetizou a infecçãõ observada na primeira etapa do experimento. Com isso, mesmo com baixa infecçãõ, a quantidade de bactéria eliminada pelos camundongos foi suficiente para infectar suínos suscetíveis.

Na etapa de transmissãõ da *L. intracellularis* de suínos para camundongos, o fornecimento da bactéria aos camundongos do grupo positivo foi garantido pela positividade na PCR de todas as fezes dos suínos fornecidas aos camundongos, além da positividade dos suínos na IHQ, que confirmou a infecçãõ dos mesmos. Da mesma forma, foi confirmado na etapa de transmissãõ da bactéria de camundongos para suínos, que todos os pools de fezes dos camundongos fornecidos aos suínos foram positivos na *nested* PCR, e alguns camundongos foram positivos na IHQ.

A não observaçãõ de sinais clínicos e lesões macroscópicas nos camundongos expostos às fezes dos suínos já era esperada, pois estudos com inoculaçãõ de cultura pura, com maior carga bacteriana obtiveram resultados similares (Collins *et al.*, 2011; Viott *et al.*, 2013). Apesar da *nested* PCR positiva aos 14 dpi em todos os pools de fezes dos camundongos do grupo positivo na segunda etapa, não foram observadas lesões nem imunomarcacão nos intestinos aos 15 dpi. Esses achados podem ser explicados pela baixa infecçãõ dos animais e pela alta sensibilidade da técnica de neste PCR (Jones *et al.*, 2013). No período de 15 dpi foi observada maior intensidade de lesão em experimentos anteriores, porém com inoculaçãõ com doses entre 10^6 a 10^7 *L. intracellularis* por animal (Smith *et al.* 2000; Murakata *et al.* 2008; Viott *et al.* 2013). Aos 28 dpe apenas 3 animais (8,33%) do grupo exposto as fezes dos suínos apresentaram lesão de EP leve e foram positivos na IHQ. A eutanásia nesse período pode ter interferido, pois outros autores relataram a regressãõ das lesões em camundongos da mesma linhagem antes dos 21 dpi (Viott *et al.*, 2013). Com base nisso, diferentes períodos de infecçãõ entre os animais pode explicar a visualizaçãõ de lesões e imunomarcacão aos 32 dpe em três animais. Esses podem ter se contaminado com as fezes de camundongos que inicialmente infectaram e eliminaram o agente, entre 7 e 21 dpe, e não diretamente com as fezes dos suínos. Com isso pode-se inferir

que camundongos, além de se infectarem com fezes de suínos, podem eliminar o agente em quantidade suficiente para infectar outros camundongos. Além da observação de lesão, outro objetivo foi acompanhar o período de eliminação do agente pós-período de exposição às fezes dos suínos, justificando assim a escolha de um período maior entre a inoculação e a eutanásia dos animais. Nessa etapa a eliminação da bactéria ocorreu entre 7 e 21 dpe nas fezes dos suínos, com positividade em intervalos de sete dias. Esse período é suficiente para a infecção de suínos, pois na etapa dois, quatro dias de exposição dos suínos as fezes dos camundongos foi suficiente para que houvesse infecção.

Na etapa de transmissão da *L. intracellularis* entre camundongos e suínos, todos os suínos foram positivos em pelo menos um teste realizado. Houve um animal com apenas sorologia positiva e dois animais com apenas PCR positiva. Os demais animais foram positivos em pelo menos duas análises, confirmando a infecção dos mesmos.

Um animal apresentou apenas sorologia positiva, o que significa que o animal entrou em contato com a bactéria, porém não teve a infecção detectada. Três animais (8, 10 e 13) foram apenas positivos na PCR aos 21 dpi e não soroconverteram, uma possível explicação para isso são as baixas doses de *L. intracellularis* as quais os animais tiveram contato, apresentando baixa infecção inicial. Com isso, ocorreu eliminação tardia de quantidade suficiente de bactéria detectável na PCR. Como a soroconversão é dose dependente (Nogueira *et al.*, 2013) essa ocorreria em média 14 dias após a infecção, porém, como o abate dos animais ocorreu oito dias após a primeira detecção da bactéria, justifica a não soroconversão dos mesmos. A coleta de fragmentos de intestinos sem lesão e infecção justificaria a negatividade na IHQ.

A negatividade nas análises anatomopatológicas dos suínos expostos as fezes dos camundongos pode ser devido ao tempo transcorrido entre a infecção e a eutanásia, realizada 30 dias após a primeira exposição às fezes dos camundongos, pois há a regressão das lesões a partir da terceira semana pós-inoculação (MacIntyre *et al.*, 2003). Com a regressão das lesões, há a observação de marcações na IHQ somente em células mononucleares na lamina própria (Guedes e Gebhart, 2003a), marcações estas presentes nos casos dos animais positivos na IHQ no presente trabalho.

A não visualização de sinais clínicos de diarreia aquosa, apenas pastosa e refugagem e sem lesão macroscópicas, mas com diagnósticos positivos na PCR, sorologia e imuno-histoquímica, representa que os suínos expostos às fezes dos camundongos se infectaram e apresentaram a forma subclínica da doença, eliminando o agente nas fezes sem apresentarem os sinais clínicos (Guedes, 2007a). Diante disso, esses suínos tornam-se uma importante fonte de infecção a outros suínos suscetíveis (Guedes, 2007a, Paradis *et al.*, 2007).

2.5. CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstrou que camundongos expostos à fezes frescas de suínos infectados por *L. intracellularis* podem se infectar e eliminar o agente nas fezes, e suínos expostos a fezes de camundongos positivos para *L. intracellularis* se infectam e apresentam a forma subclínica da EPS. A detecção de ratos e camundongos positivos para *L. intracellularis* em granjas e os achados experimentais no presente trabalho indicam camundongos são capazes de se infectar e eliminar o agente nas fezes e serem, portanto, hospedeiros e fontes de infecção de *L. intracellularis* para suínos susceptíveis.

2.6. REFERÊNCIAS

- BACKHANS A e FELLSTRÖM C. Rodents on pig and chicken farms – a potential threat to human and animal health. *Infection Ecology & Epidemiology*.v.2, n.10 p.3402 2012.
- BACKHANS A, JANSSON DS, ASPÁN A, *et al.* Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Vet Microbiol.* v.153, n.1-2, p.156-62, 2011.
- BACKHANS, A.; JACOBSON, M.; HANSSON, I.; *et al.* Occurrence of pathogens in wild rodents caught on Swedish pig and chicken farms. *Epidemiol Infect*, v.141, n.9, 1885-1891, 2013.
- COLLINS AM, LOVE RJ, JASNI S, *et al.* Attempted infection of mice, rats and chickens by porcine strains of *Lawsonia intracellularis*. *Aust Vet J.* v.77, n.2, p.120-122, 1999.
- COLLINS, A.M.; FELL, S.; PEARSON, H.; *et al.* Colonisation and shedding of *Lawsonia intracellularis* in experimentally inoculated rodents and in wild rodents on pig farms. *Vet Microbiol*, v.150, p.384–388, 2011.
- DOS SANTOS B. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status genético - Belmira Ferreira In: ANDRADE, A., PINTO, S.C., e OLIVEIRA, R.S., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books.
- França, S.A., Machado, G.S., Andreoli, P.R., Santos, J.C.B., Guedes, R.M.C. 2010. In-feed macrolide Leucomycin (Leucomag 30% PR) for prevention of proliferative enteropathy in experimentally infected pigs. *Ciência Rural*, 40(6):1376-1384.
- FRIEDMAN, M.; BEDNÁR, V.; KLIMES, J.; *et al.*, *Lawsonia intracellularis* in rodents from pig farms with the occurrence of porcine proliferative enteropathy. *Lett Appl Microbiol.* v.47, n.2, p.117-121, 2008.
- GO, Y.Y.; LEE, J.K.; YE, J.Y.; *et al.* Experimental reproduction of proliferative enteropathy and the role of IFN- γ in protective immunity against *Lawsonia intracellularis* in mice. *J. Vet. Sci.*, v. 6, p.357-359, 2005.
- GUEDES, R.M.C. Diarreias e enterites em leitões de recria e terminação. VII Seminário de Aves e Suínos – AveSui Regiões, Suinocultura, Belo Horizonte – MG, 2007a, p.39 – 43.
- 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.; 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, p135-145, 2003(a).
- 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, 2003(b).
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Progression of *L. intracellularis* infection and mucosal immune response in pigs. In: International Pig Veterinary Society, 2004, Hamburgo. Proceedings of the IPVS Congress, v. 18. p. 65, 2004.

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 hemorrhagic enteropathy. *Can J Vet Res*, v.66, n.4, p.258-63, 2002(a).

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, 2002(b).

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, n.5, p.420-423, 2002 (c).

JONES, G.F., WARD, G.E., MURTAUGH, M.P., *et al.* Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, *Ileal symbiont intracellularis*, in faeces by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. v.31, p.2611-2615. 1993.

KIJLSTRA A; MEERBURG B; CORNELISSEN J; *et al.* The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Vet Parasitol*. v.156, n.3-4, p.183-190, 2008

LAVOIE, J.P.; DROLET, R.; PARSONS, D.; *et al.* Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhea and hypoproteinaemia in foals on the breeding farms in Canada. *Equine Vet J*. v.32, n.5, p.418-25, 2000.

MACINTYRE N, SMITH DG, SHAW DJ, *et al.* Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Vet Pathol*, v.40, n.4, p.421-432, 2003.

MURAKATA, K.; SATO A.; YOSHIYA, M. *et al.* Infection of different strains of mice with *Lawsonia intracellularis* derived from rabbit or porcine proliferative enteropathy. *J Comp Pathol*, v.139, n.1, p.8-15, 2008.

PARADIS MA, GEBHART CJ, TOOLE D, *et al.* Subclinical ileitis: Diagnostic and performance parameters in a multi-dose mucosal homogenate challenge model. *J Swine Health Prod*, v.20, n.3, p.137-141, 2012.

PARADIS, M.-ANNE, GOTTSCHALK, M.; RAJIC A. *et al.* Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. *Can Vet J*, v.48, p.57-62, 2007.

PINHEIRO A.L., BULOS L.H., ONOFRE T.S., *et al.* Verification of natural infection of peridomestic rodents by PCV2 on commercial swine farms. *Res Vet Sci*. v.94, n.3, p.764-168, 2013

Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. 1992. Laboratory methods in histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, Washington, 279p.

PUSTERLA N, SANCHEZ-MIGALLON G.D, VANNUCCI F.A., *et al.* Transmission of *Lawsonia intracellularis* to weanling foals using feces from experimentally infected rabbits. *Vet J*. v.195, n.2, p.241-243, 2013.

PUSTERLA, N.; MAPES, S.; GEBHART, C. Further investigation of exposure to *Lawsonia intracellularis* in wild and feral animals captured on horse properties with equine proliferative enteropathy. *Vet J*, v.194, n.2, p. 253-255, 2012.

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

SAMPIERI F, VANNUCCI FA, ALLEN AL, *et al.* Species-specificity of equine and porcine *Lawsonia intracellularis* isolates in laboratory animals. *Can J Vet Res*. v.77, n.4, p.261-272, 2013.

VANNUCCI FA, BECKLER D, PUSTERLA N, *et al.* Attenuation of virulence of *Lawsonia intracellularis* after in vitro passages and its effects on the experimental reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol*. v.162, n.1, p.265–269, 2013.

VIOTT A. de M., FRANÇA, S.A., VANNUCCI F.A., *et al.* Infection of sparrows (*Passer domesticus*) and different mice strains with *Lawsonia intracellularis* *Pesq. Vet. Bras*. V.33, n.3, p.372-378, 2013.

CAPÍTULO 3

Deteção de anticorpos anti-*Lawsonia intracellularis* em fluidos orais de suínos experimentalmente inoculados

*Detection of anti-*Lawsonia intracellularis* antibodies in oral fluids of experimentally inoculated pigs*

RESUMO

Vários patógenos assim como anticorpos derivados do soro ou produzidos em tecidos associados à cavidade oral estão presentes no fluido oral (FO). Considerando a aplicabilidade dessa amostra alternativa, recentes estudos em medicina veterinária vêm testando FO como substituto do soro em testes de diagnóstico. O objetivo do presente estudo foi padronizar a técnica de imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) para a detecção de IgA e IgG anti-*L. intracellularis* em amostras de FO de suínos experimentalmente infectados. Sessenta e dois leitões foram divididos em dois grupos, controle (T1, n=30) e inoculados (T2, n=32). Sangue, FO e fezes foram coletados nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 42 pós-inoculação (dpi). Para a padronização da técnica de IPMC para amostras de FO foram realizadas algumas modificações da técnica padrão utilizada para soro. A sensibilidade da IPMC para detecção de IgG no soro foi de 100% e 84,62% e 88,46 para IgA e IgG em FO, respectivamente. A especificidade foi de 100% para soro e FO. Houve alta concordância entre os resultados de detecção de IgG no soro e IgA e IgG em FO. Baseado em nossos resultados, amostras de FO podem ser utilizadas para avaliação de infecção pela *L. intracellularis* em suínos.

Palavras chaves: Diagnóstico; Doença entérica; Enteropatia Proliferativa Suína; Sorologia; Suíno

ABSTRACT

Several pathogens as well as antibodies derived from serum or produced in tissues associated with the oral cavity are present in oral fluid (OF). Considering the applicability of this alternative sample, recent studies in veterinary medicine have been testing OF as a replacement of serum in diagnostic assays. The aim of this study was to standardize the immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) to detect IgA and IgG anti-*L. intracellularis* in OF samples of experimentally infected pigs. Sixty-two piglets were divided into two groups, control (T1, n=30) and inoculated with *L. intracellularis* (T2, n=32). Blood, OF and fecal samples were collected at 0, 7, 14, 21, 28 and 42 days post-inoculation (dpi). In order to perform the IPMA to detect IgA and IgG in OF, some modifications of the standard technique for serum were made. The IPMA showed specificity of 100% for serum and 84,62% and 88,46% for IgA and IgG in OF, respectively. There was high agreement between the results of serum IgG and IgA and IgG in OF. Based on our results, oral fluid samples may be used for evaluation and determination of *L. intracellularis* pig infection.

Keywords: Diagnostic; Enteric disease; Porcine proliferative enteropathy; Serology; Swine

3.1. INTRODUÇÃO

A Enteropatia Proliferativa Suína (EPS), causada pela bactéria intracelular obrigatória *Lawsonia intracellularis* (McOrist, *et al.*, 1995), é uma doença infecciosa intestinal de suínos em fase de crescimento e terminação. Três formas clínicas são conhecidas: aguda, caracterizada por diarreia hemorrágica e morte em suínos com idade próxima ao abate; crônica, caracterizada por redução no desempenho, desuniformidade de lote e diarreia transitória que acomete animais de 6 a 20 semanas de idade; e a forma subclínica que se caracteriza principalmente por desempenho reduzido (Guedes, 2007).

Entre as técnicas de diagnóstico ante-mortem a PCR é altamente específica; mas há fatores inibitórios que interferem na sensibilidade da técnica em amostras de fezes. Ainda, os resultados do teste são influenciados pelo curso da doença e variação da eliminação do agente nas fezes (Guedes *et al.*, 2002a; Vannucci *et al.*, 2012). Testes sorológicos como ELISA, imunofluorescência indireta em placa e imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) são também métodos utilizados (Kroll *et al.*, 2005). Uma vez que a soroconversão ocorre em torno dos 14 dias após a exposição ao agente e dura por um longo período, a sorologia pode ser utilizada para avaliar a cinética de infecção nos rebanhos, e estabelecer estratégias de controle da doença (Walter *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, o soro é utilizado em testes de diagnóstico, mas vem ocorrendo um aumento do número de estudos em medicina veterinária utilizando amostras de FO para detecção de vírus, bactérias e anticorpos específicos para esses agentes (Prickett *et al.*, 2008). em situação de vigilâncias sanitárias para doenças infecciosas, as amostras de FO são mais fáceis de serem coletadas, têm custo baixo de processamento, e maior número de animais pode ser amostrados comparado com o soro, além de induzir menos estresse dos animais na hora da coleta. Todas essas práticas fazem com que os testes baseados em FO tenham valor como método de diagnóstico (Prickett e Zimmerman, 2010). Em adição, vários estudos tem demonstrado alta correlação entre a detecção de agentes infecciosos e anticorpos específicos em soro e FO (Kittawornrat *et al.*, 2013; Panyasing *et al.*, 2013, 2014). Testes baseados em amostras de fluido oral têm demonstrado boa sensibilidade, especificidade e repetibilidade (Kittawornrat *et al.*, 2012, 2013; Ouyang *et al.*, 2013). Até o momento, não há estudos utilizando amostras de FO para a detecção de anticorpo anti-*L. intracellularis* em suínos. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi padronizar a técnica de IPMC para a detecção de IgA e IgG anti- *L. intracellularis* em amostras de FO e verificar a persistência de detecção de cada isotipo em amostras de FO de animais experimentalmente infectados.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais e delineamento experimental

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, (#77/2011 – 08 Junho de 2011). Foram utilizados 62 leitões, de cinco semanas de idade (10.0 ± 0.64 kg/ peso vivo), provindos de uma granja comercial de suínos livres de EPS e outras doenças entéricas consideradas no diagnóstico diferencial. Todos os animais foram pesados, brincados e divididos aleatoriamente de acordo com o peso em grupo controle (T1), com 30 animais, e infectado (T2), com 32 animais. Cada

grupo foi alojado em salas separadas, nas quais havia quatro baias suspensas com piso de plástico, com divisórias de tela, comedouro tipo silo e bebedouro tipo nipel. Quatro animais foram alojados por baia, entretanto, em duas baias no grupo controle, havia apenas três animais.

Manejo de temperatura, ambiente e alimentação foi o mesmo para todas as baias. Todas as atividades de manejo eram inicialmente realizadas nas salas controle, utilizando instrumentos exclusivos. Não foram administrados antibióticos durante todo o período de experimento.

Aos 42 dias pós-inoculação (dpi) todos os animais foram pesados individualmente e animais em condições clínicas ruins foram eutanasiados e necropsiados. Os demais animais foram eutanasiados e avaliados macroscopicamente aos 49 dpi.

3.2.2 Preparação do inóculo e inoculação

O inóculo foi preparado utilizando intestinos de suínos afetados pela EPS, com modelo descrito previamente (Guedes *et al.*, 2002c). No dia 0, os suínos do grupo T2 receberam uma dose de 60mL do inóculo, por via intragástrica. A dose total foi de aproximadamente 8.8×10^{10} *L. intracellularis*/suíno. Animais do grupo T1 receberam o mesmo volume do diluente do inóculo. Teste de bacteriologia aeróbica do inóculo não detectou nenhum organismo enteropatogênico, além da *L. intracellularis*.

3.2.3 Avaliação clínica e coleta de amostras

Avaliação clínica de diarreia foi realizada pela mesma pessoa duas vezes por semana. O escore das fezes foi baseado no estudo de Guedes *et al.* (2002d). Amostras de FO, sangue e fezes foram coletadas individualmente aos 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dpi. Amostras de fluido oral das baias foram coletadas aos 4, 14, 21, 28, 35 e 42 dpi.

Para a coleta de FO foi fornecida individualmente corda de algodão de 15 cm de comprimento. Para coleta de amostras das baias, cordas foram amarradas no interior das baias por um tempo suficiente para adquirir em média 10 ml de FO por baia, ou antes dos animais perderem o interesse pela corda. O fluido oral foi extraído torcendo parte úmida da corda em um saco plástico, posteriormente transferido para um tubo cônico de 50 ml, centrifugado a 1000g por 10 minutos e armazenado a -20°C até serem testadas.

Amostras de fezes de todos os animais foram coletadas e estocadas a -20 °C para serem testadas por PCR. O DNA foi extraído das amostras fecais utilizando Kit comercial (PSP Stool DNA Spin Kit, Molecular STRATEC), de acordo com o protocolo do fabricante e testadas pela PCR convencional (Jones *et al.*, 1993).

3.2.4 Análise do soro e fluido oral

Amostras de soro foram testadas pelo IPMC para IgG (Guedes *et al.*, 2002b,c). Para a verificação dos títulos de anticorpos, amostras de soro positivas, no ponto de corte 1:30, foram serialmente diluídas para 1: 120; 1: 480 e 1: 1920.

A técnica de IPMC utilizada para a detecção de IgA e IgG específica anti-*L. intracellularis* em amostras de FO foi uma versão modificada da técnica utilizada para soro, descrita por Guedes *et al.* (2002b). A padronização da IPMC para ambos os isotipos em FO foi inicialmente realizada

em amostras providas de granja com casos de EPS e em animais com alto título de anticorpo no soro.

FO e anticorpo secundário foram inicialmente diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS - phosphate-buffered saline), solução de leite em pó 0,25% em PBS 1x; PBS Tween 0.05% (PBS com 0.05% Tween 20, pH 7.2). Anticorpos secundários (anti-pig IgA e IgG) foram também diluídos em IPMC buffer (PBS com 2.5% soro fetal bovino, 1% soro de coelho, e 0.08% Tween 80) (Guedes *et al.* 2002b). FO foram testados não diluídos e diluídos 1:2 e 1:3, e anticorpo secundário foi testado utilizando diluições de 1:45, 1:50, 1:100 e 1:2000. Amostras de FO foram gradualmente descongeladas a 4°C por 12 h, para evitar interferência da temperatura na integridade dos anticorpos e para sedimentar material grosseiro.

3.2.5 Avaliação macroscópica

Nove e 45 animais foram eutanasiados aos 42 e 49 dpi, respectivamente. As lesões macroscópicas de EPS foram avaliadas por um patologista sem conhecimento dos tratamentos, e individualmente graduadas (Guedes *et al.*, 2002a). Amostras de intestinos de todos os animais foram fixadas em formol tamponado e processadas rotineiramente para histologia. Um corte foi corado com hematoxilina e eosina (Prophet *et al.*, 1992) e a outra pela IHQ usando a técnica de Streptavidina marcada e anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003a). Achados histológicos e marcação pela IHQ foram graduados de acordo com Guedes *et al.* (2002a).

3.2.6 Análise estatística

As comparações da detecção de IgG no soro, IgA e IgG em FO entre os grupos foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier, no programa estatístico STATA. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). A sensibilidade e especificidade foram calculadas no Microsoft Excel, considerando os grupos controle e inoculado para determinar amostras negativas e positivas, respectivamente. Teste de correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação entre detecção de IgG no soro e a detecção de IgA e IgG em FO. O método Kappa foi utilizado para verificar a concordância entre os testes e concordância entre a detecção de IgA e IgG em amostras individuais e coletivas. O programa utilizado foi BioEstata 5.0. As baias foram consideradas positivas se pelo menos um animal testado foi positivo para algum isótipo testado em amostras individuais.

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Animais e inoculação

Todos os animais foram soro negativos e PCR negativos para *L. intracellularis* nas amostras fecais no dia 0. No final do experimento (42 dpi), a média de peso vivo (pv) foi significativamente diferente ($P < 0.0001$) entre grupos (33.08 ± 5.48 kg/pv e 22.85 ± 9.04 kg/pv para T1 e T2, respectivamente). Animais eutanasiados aos 42 dpi pertenciam ao tratamento T2 (infectado) e tiveram média de peso de 11.39 ± 2.22 kg. Escore fecal dos animais, tratamento T1 e T2, dos 2 aos 42 dpi, estão na Figura 7.

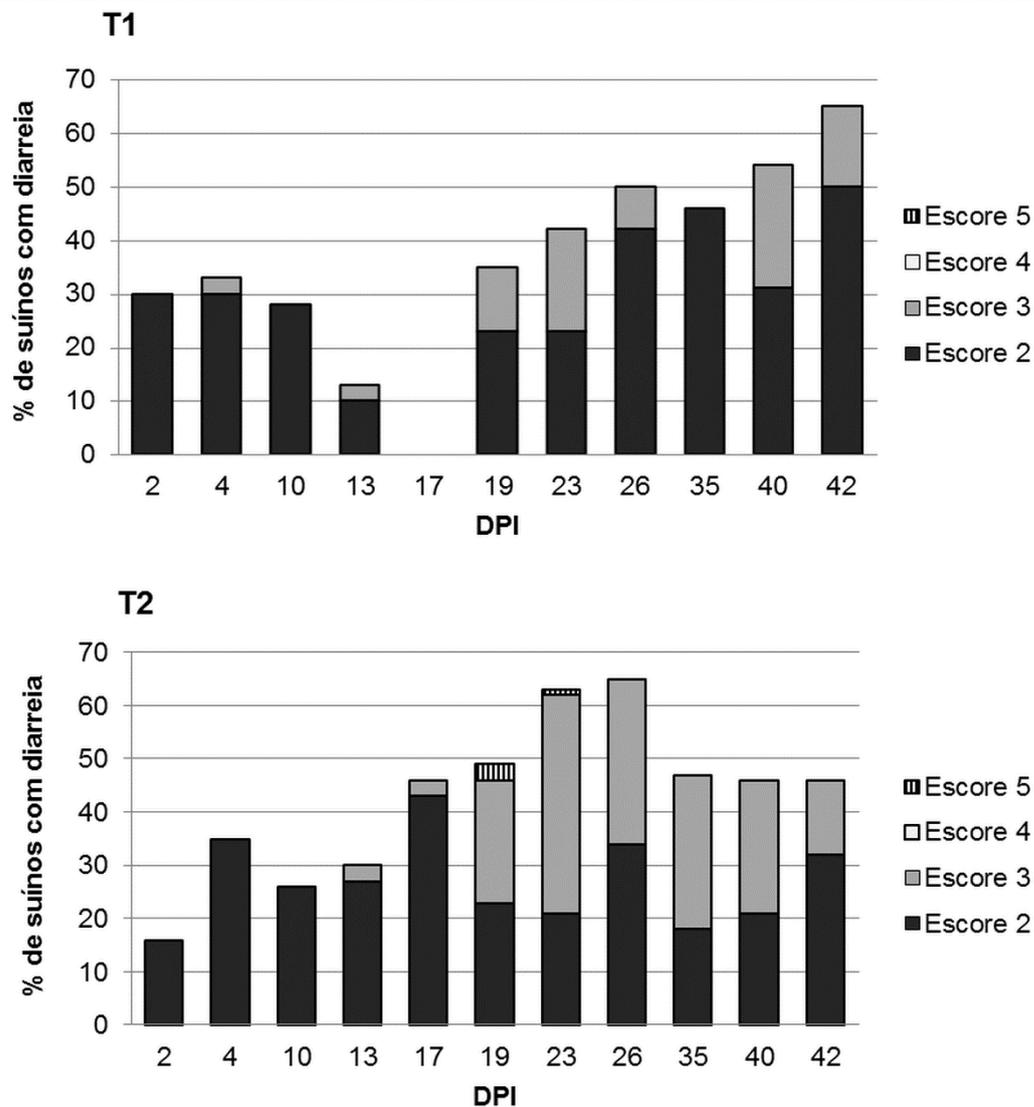


Figura 7: Escore fecal de suínos controle (T1) e experimentalmente inoculados (T2) aos 2 a 42 pós-inoculação com *L. intracellularis*. Escore 2 - fezes semi-sólidas sem sangue; 3 - diarreia aquosa, sem fezes escuras ou sangue; 4 - fezes tingidas de sangue, e 5 - diarreia profusa com sangue ou fezes escuras.

Na segunda semana pós-inoculação, um animal no grupo T2 apresentou diarreia com sangue dos 19 aos 23 dpi, e diarreia aquosa até os 24 dpi, quando foi eutanasiado devido a condições clínicas ruins. Na necropsia, havia lesões características de EPS confirmadas pela IHQ. Eliminação da *L. intracellularis* nas fezes foi primeiro detectada em suínos no T2 aos 7 dpi, com pico aos 14 dpi. Os animais do grupo T1 apresentaram positividade na PCR aos 35 dpi (Figura 7). Quatro animais do grupo controle e quatro do grupo inoculado morreram ou foram eutanasiados na primeira semana de experimento devido a condições não relacionadas à inoculação.

3.3.2 *Imunoperoxidase em monocamada de célula em soro e fluido oral*

A principal modificação da IPMC para amostras de FO foram a hidratação da placa com PBS Tween 0.05%, não diluição das amostras, e o tempo de incubação das amostras de FO que foi estendido para 45 min. Todas as concentrações testadas do anticorpo secundário anti-IgA e anti-IgG suínas foram adequadas, mas a diluição 1:100 em PBS Tween 0.05% obteve menos marcação inespecífica de fundo; portanto, a imunomarcação específica foi mais fácil de ser visualizada.

Animais no grupo T2 soro-converteram aos 14 dpi (3%), e 100% dos animais foram soropositivos aos 42 dpi. Suínos do grupo T1 soro-converteram aos 35 dpi (31%), e um aumento do número de animais soropositivos foi detectado aos 42 dpi (69%), mas foram estatisticamente diferentes do grupo T2 ($P < 0.05$) dos 14 aos 42 dpi (Figura 8)

As primeiras detecções de IgA e IgG específicas para *L. intracellularis* em FO ocorreram, respectivamente, aos 14 dpi e aos 21 dpi em T2, com alta porcentagem de animais positivos aos 35 dpi para ambos os isotipos. Em T1, ambos os isotipos foram detectados em FO aos 42 dpi. A detecção para ambos os isotipos permaneceu diferente do grupo T2 dos 14 e 21 dpi até 42 dpi ($P < 0.05$) para IgA e (Figura 9) respectivamente. Figura 10 demonstra a curva de títulos de IgG no soro e o número de animais positivos para IgA e IgG no FO. Em anexo encontram-se imagens de resultados positivos e negativos para IgA e IgG em amostras de fluido oral (Anexo 5).

A sensibilidade e a especificidade da IPMC para a detecção de IgG no soro e IgA e IgG foram determinadas utilizando 52 amostras (26 animais de cada grupo) aos 28 dpi. A sensibilidade da IPMC para detecção de IgG no soro foi de 100%, e 84,62% e 88,46 para IgA e IgG em FO, respectivamente. A especificidade foi de 100% para soro e FO.

Houve um aumento do número de animais IgA e IgG positivos em FO concomitante com o aumento dos títulos de IgG no soro. Houve também alta correlação entre a detecção de IgG no soro e detecção de IgA e IgG em FO ($r_s = 0.82$ e $r_s = 0.89$, respectivamente).

Houve alta concordância entre os resultados da IPMC para IgG específico no soro e IgA e IgG em amostras individuais de FO aos 28 dpi (Tabela 5). Nas amostras de FO coletadas em baias, a IPMC detectou um suíno soropositivo alojado juntamente com três animais negativos (Anexo 6), e houve alta concordância entre os resultados da IPMC entre as amostras coletadas individuais e coletivas.

3.3.3. *Avaliação anatomopatológica*

Todos os achados estão sumarizados na tabela 6. As lesões macro e microscópicas foram típicas de infecção pela *L. intracellularis*, confirmadas pela IHQ.

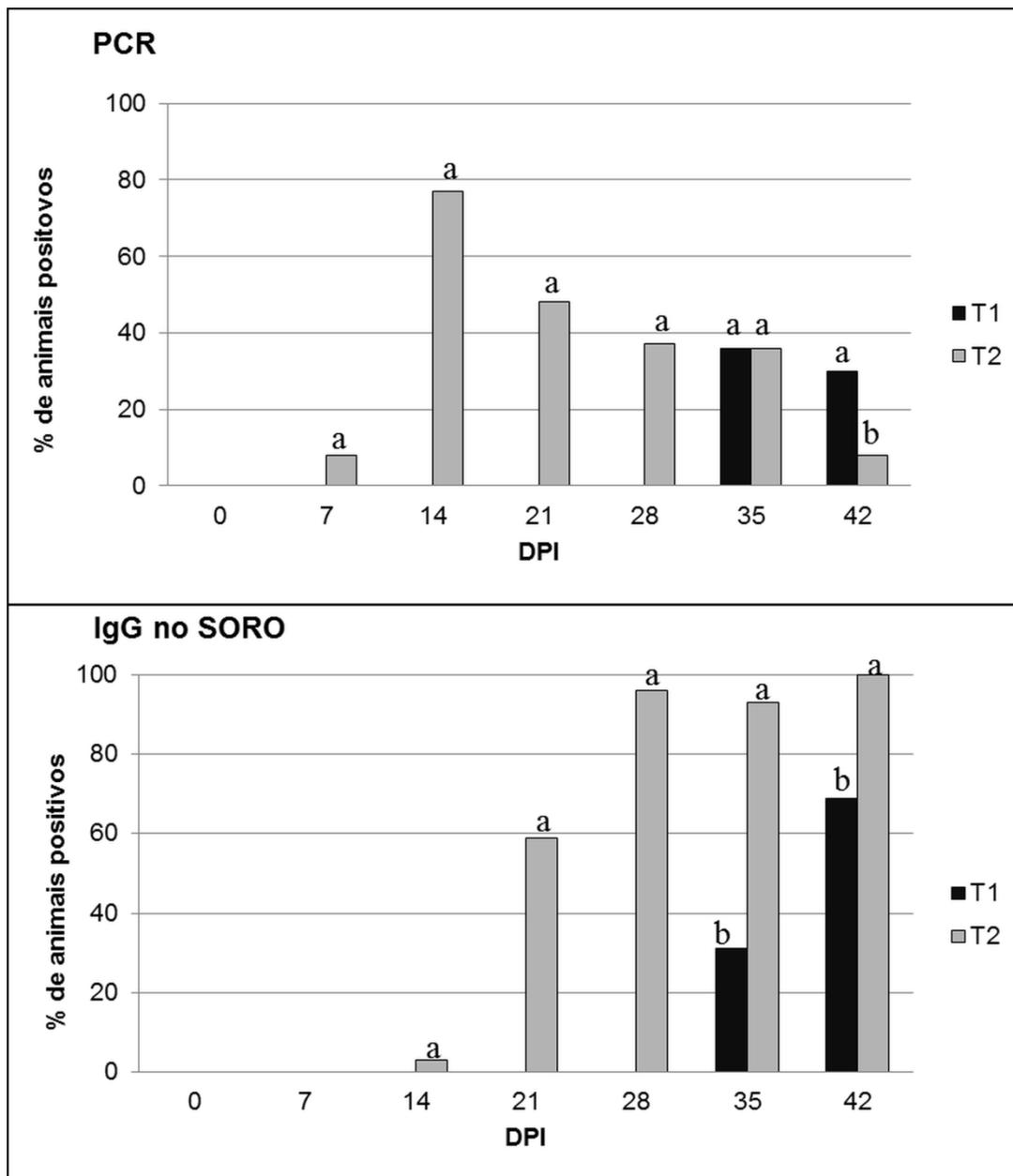


Figura 8: Porcentagem de suínos positivos para *L. intracellularis* na PCR em amostras fecais e porcentagem de animais soropositivos na imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) para detecção de anticorpo IgG anti-*L. intracellularis* no soro. Todos os animais foram considerados nessas análises. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos no mesmo período ($P < 0.05$).

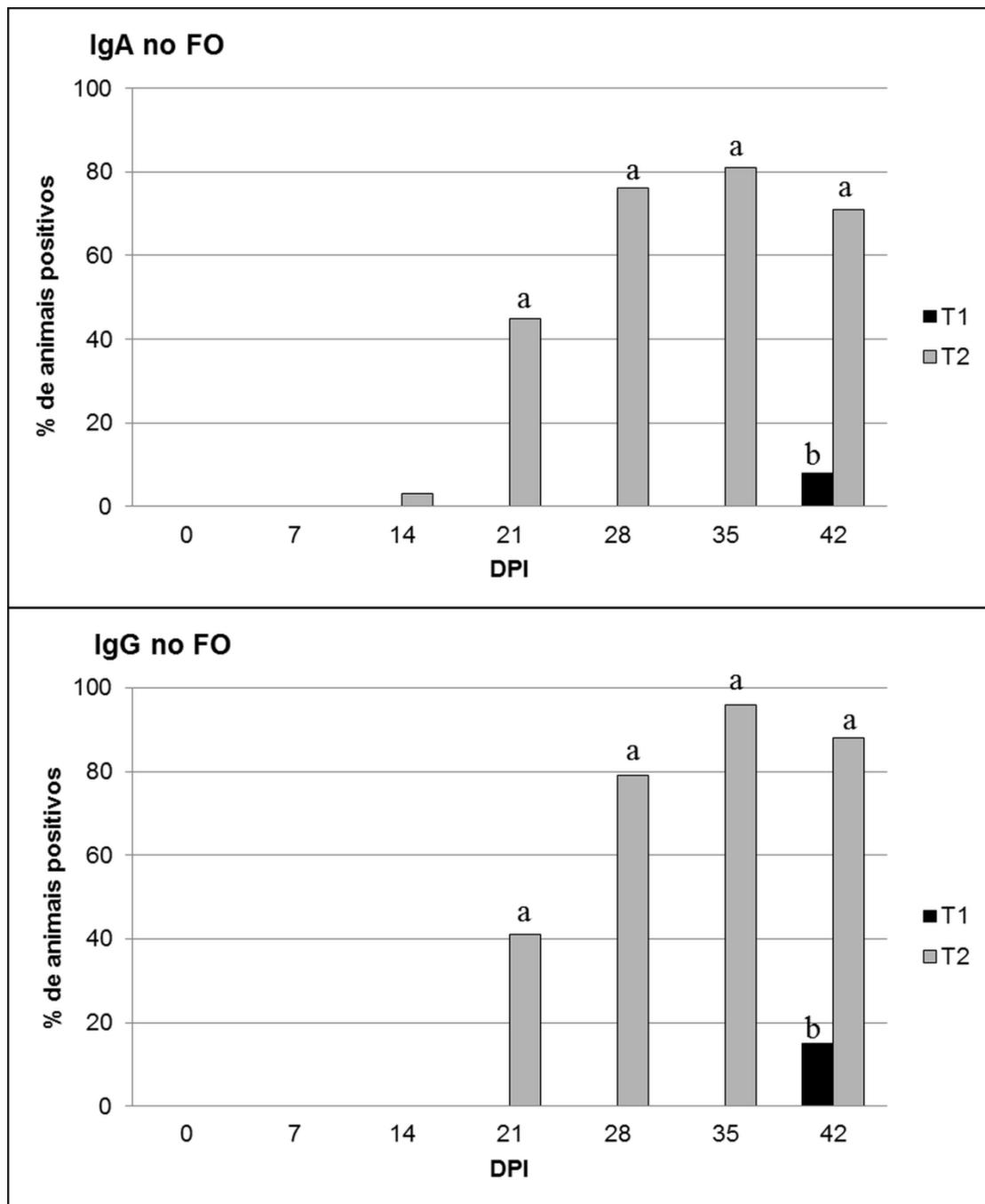


Figura 9: Porcentagem de animais positivos para IgA e IgG anti-*L. intracellularis* em fluido oral (FO), de suínos experimentalmente inoculados, detectados pelo teste de imunoperoxidase em monocamada de célula (IMPC). Todos os animais foram considerados nessas análises. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos no mesmo período.

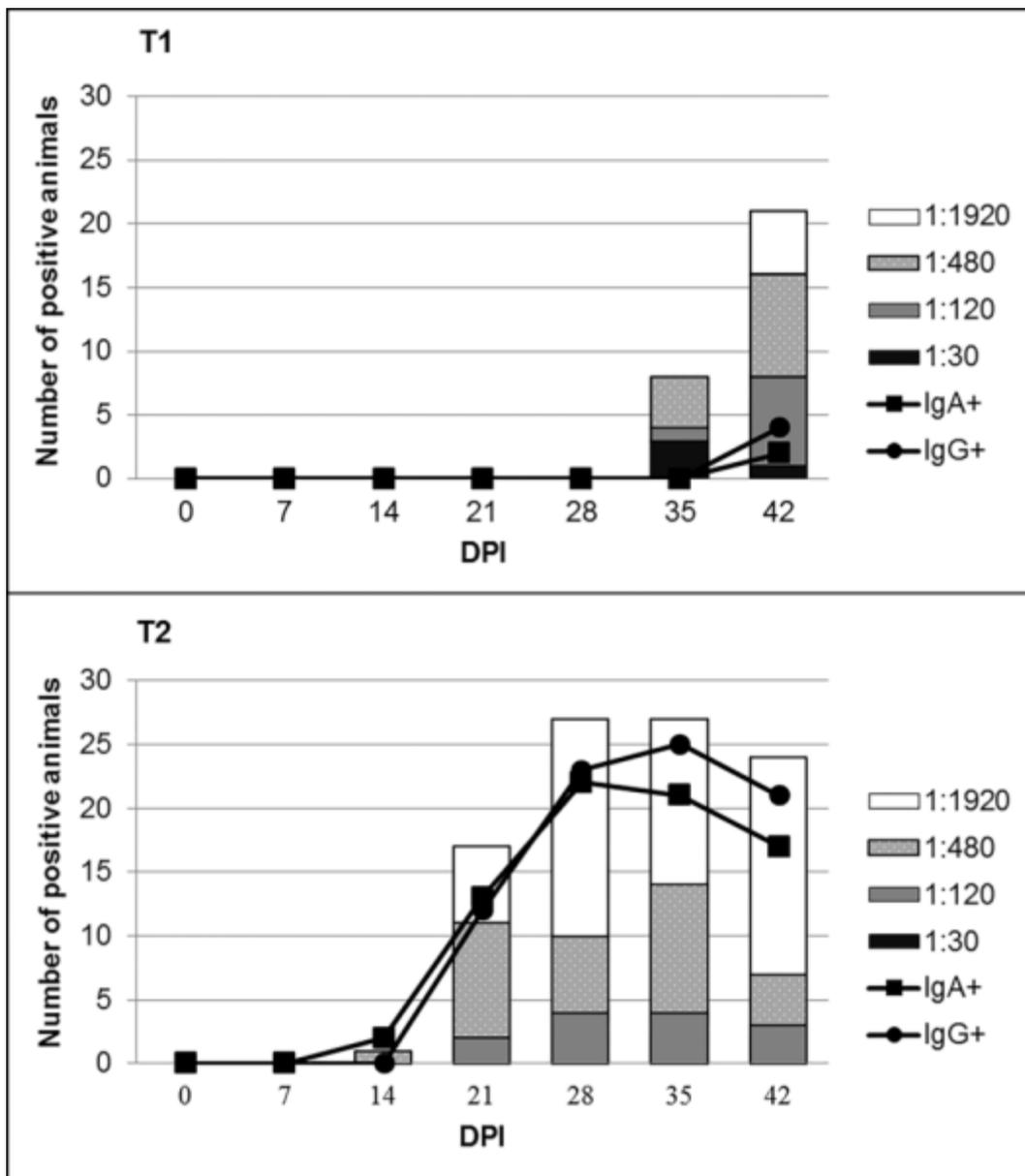


Figura 10: Positividade de suínos para IgG detectados em soro e IgA e IgG anti-*L. intracellularis* em fluido oral (FO). Número de animais positivos e títulos de IgG anti-*L. intracellularis* em amostras de soro(barra) e número de animais positivos para IgA e IgG específico anti-*L. intracellularis* (linha) em amostras de FO. T1 = grupo controle e T2 = grupo inoculado.

Tabela 5: Porcentagem de concordância entre resultados do teste de imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) para *L. intracellularis* IgG específica em soro e IgA e IgG em fluído oral aos 21 e 28 dpi.

	21 dpi	28 dpi
Soro IgG/ FO IgA	79.00 ^a (0.46) ^b	90.38 (0.81)
Soro IgG/OF IgG	80.77 (0.50)	94.23 (0.88)
FO IgA/FO IgG	86.54 (0.58)	92.31 (0.84)
IgA Individual/ IgA baias	93.75 (0.86)	100.00
IgG Individual/ IgG baias	100.00	100.00

Vinte e seis animais foram utilizados em cada grupo. ^aPorcentagem de concordância. ^bÍndice Kappa.

Tabela 6: Número de animais de acordo com os escores de lesão macroscópica, microscópica e de imuno-histoquímica observadas nos intestinos de suínos aos 49 dias pós-inoculação com *L. intracellularis*.

Grau	Macroscopia		Histopatologia		Imuno-histoquímica	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
0[#]	9	18	9	18	1	13
1	9	5	2	4	9*	8*
2	8	3	6	2	4*	3*
3	0	2	9	4	5	0
4	-	-	-	-	7	4

T1 = grupo controle (n=26); T2 = grupo inoculado (n=29). [#] Grau 1 = foco isolado de marcação antigênica; 2 = cerca de 25% das criptas marcadas; 3 = cerca de 26 a 75% das criptas marcadas; 4 = > de 80% das criptas. * Cinco animais de cada grupo tiveram somente marcação em macrófagos em lamina própria (grau 1 e 2).

3.4. DISCUSSÃO

A negatividade dos animais utilizados no presente estudo foi confirmada pela sorologia e PCR em amostras coletadas no dia da inoculação. O sucesso da inoculação foi confirmado pelo alto numero de animais que eliminaram *L. intracellularis* nas fezes e pela taxa de soroconversão. Apesar dos animais do grupo T1 serem alojados em salas separadas com manejo restrito, devido ao longo período de experimento, houve a contaminação entre grupos, confirmada pela eliminação da *L. intracellularis* nas fezes e soroconversão aos 35 dpi em animais do grupo controle.

Os sinais clínicos e a detecção da *L. intracellularis* nas fezes no grupo T2 foram consistentes com outros experimentos de inoculação em suínos, utilizando homogeneizado de mucosa como inóculo (Guedes *et al.*, 2002bd). Uma possível explicação para a observação de diarreia nas duas primeiras semanas de tratamento foi a completa remoção de antibiótico da ração, transporte e mudança de dieta. Amostras de fezes e soro dos animais de ambos os grupos foram negativas na PCR e sorologia durante as quatro primeiras semanas e permaneceram PCR negativo antes dos 35 dpi em T1, o que reforça que a *L. intracellularis* não foi a causa de diarreia no início do experimento.

A contaminação dos animais do grupo controle que ocorreu ao final do experimento, e o longo período entre a inoculação e a eutanásia pode explicar a maior evidência de lesão macro e microscópica e imunomarcagem nos animais do grupo T1. Estudos anteriores demonstraram regressão de lesão antes dos 29 dpi (Guedes and Gebhart, 2004), o que justifica a regressão das lesões nos animais do grupo T2, ao final do experimento.

Amostras de FO contêm patógenos e anticorpos derivados do soro ou produzidos em tecidos associados à cavidade oral. Alguns estudos demonstraram a utilização do FO de animais comparando com o soro (Pacheco *et al.*, 2010; Prickett *et al.*, 2011; Giménez-Lirola *et al.*, 2013; Vosloo *et al.*, 2013). Esses estudos utilizaram teste de ELISA para a detecção de anticorpos no soro e FO. A técnica de IPMC foi escolhida no presente trabalho por ser uma técnica já estabelecida em nosso laboratório e que tem demonstrado alta sensibilidade e especificidade em estudos prévios (Guedes *et al.*, 2002b,c).

Similar ao soro, o presente estudo também demonstrou alta especificidade da IPMC em FO, sem a detecção de animais falsos positivos. Apesar da baixa concentração de anticorpos em fluido oral (Escribano *et al.*, 2012), a IPMC demonstrou moderada sensibilidade para detectar IgA (84.62%) e IgG (88.46%) em FO. Kittawornrat *et al.* (2012) também obtiveram boa sensibilidade e especificidade para a detecção de IgG anti-vPRRS em amostras de campo após a padronização do ELISA em FO. Animais do grupo controle foram positivos em FO após a infecção indireta. Esse resultado demonstrou que mesmo animais naturalmente infectados secretam anticorpos anti-*L. intracellularis* em FO. Apesar de não planejado, esses resultados demonstram que esse tipo de amostra também pode ser utilizado em condições de campo.

No grupo T2, a porcentagem de animais positivos para IgG em FO tendeu ser maior que IgA, aos 21 e 42 dpi. Essa diferença pode ser explicada pela influência do material da corda utilizado (algodão). Em dois estudos utilizando material sintético (ex: poliamina) e fibra natural (ex: algodão) para a corda, concentração mais alta de IgA foi observada no material sintético. Entretanto, não houve diferença entre os diferentes materiais na detecção de IgG (Olsen *et al.*, 2013a; Decorte *et al.*, 2014). Outra explicação pode ser que animais doentes possuem uma concentração mais alta de imunoglobulinas totais em FO comparado a animais saudáveis; isso especialmente para IgG, a qual aumenta significativamente dentre as outras imunoglobulinas (Escribano *et al.*, 2012) e permanece em concentração padrão de referência de diagnóstico por um período mais prolongado, tanto em amostras experimentais quanto de campo (Kittawornrat *et al.*, 2012a). Portanto, pode-se inferir que cordas de algodão para a detecção de IgG anti-*L. intracellularis* em FO podem ser utilizadas no monitoramento da doença.

A primeira detecção e pico de anticorpos ocorreram no mesmo período para FO e soro no grupo T2. Nossos achados são sustentados por Nogueira *et al.* (2013), que demonstraram que o pico de detecção de IgG anti-*L. intracellularis* no soro e mucosa foram correlacionados. Correlação

similar de IgG entre soro e FO foi observado em outros estudos (Prickett *et al.*, 2011; Kittawornrat *et al.*, 2013; Mur *et al.*, 2013). Em geral, a cinética de anticorpos em FO é dependente da cinética de anticorpo no soro e mucosa (Prickett e Zimmerman, 2010). No presente estudo, houve correlação significativa entre IgG no soro e ambos os isotipos no FO. A porcentagem de concordância entre os resultados da IPMC no soro e FO foi maior aos 28 dpi, com 90% para IgA e 94% para IgG. Concordando com nossos resultados, Kittawornrat *et al.* (2013) observaram alta correlação entre soro e FO e alta concordância nos resultados positivos utilizando ELISA para a detecção de anticorpos específicos para o vírus da PRRS.

No presente estudo, a maioria dos animais com baixos títulos de IgG (< 1:480) no soro foram negativos para IgA e IgG no FO. Resultados similares foram também observados em outro estudo (Mur *et al.* 2013). O baixo título inicial de anticorpo nos animais do grupo controle pode explicar o baixo número de animais positivos no FO uma semana após soroconverção, comparado aos animais inoculados. A diferença na dose infectante inicial de *L. intracellularis* (que foram baixas nos animais do grupo controle, semelhante a exposição natural) pode explicar a diferença na resposta imune inicial nos animais controle, pois a resposta humoral e de mucosa são dose dependentes (Nogueira *et al.*, 2013).

A aplicação de testes baseados em FO facilitam o monitoramento, vigilância e detecção de infecção em populações animais. As amostras podem ser coletadas de vários animais por baia e ao mesmo tempo, facilitando assim a coleta e possibilitando o aumento do número amostral (Prickett e Zimmerman, 2010). Em estudo para a detecção de anticorpos específicos para o vírus da PRRS em FO coletadas em baias, foi observado que IgM, IgA e IgG foram prontamente detectados em populações nas quais a infecção foi sincronizada. Entretanto, isso não foi observado em amostras de campo (Kittawornrat *et al.*, 2012). A baixa sincronização na propagação do agente infeccioso nas populações de campo pode resultar em animais em diferentes estágios de resposta humoral. Assim, no presente estudo, nós comparamos amostras individuais com amostras de baias para verificar se amostras coletivas podem ser representativas do grupo. Nossos resultados demonstraram alta concordância entre amostras individuais e de baias, sendo que a IPMC pôde detectar um animal positivo alojado em conjunto com três animais negativos.

3.5. CONCLUSÃO

A técnica de IPMC demonstrou moderada sensibilidade e alta especificidade para detecção de anticorpo IgA e IgG anti-*L. intracellularis* em FO em suínos experimentalmente inoculados e sensibilidade para detectar animais positivos em amostras de FO coletadas em baias. A simultânea detecção de anticorpo em ambas as amostras, FO e soro, e a alta concordância entre IPMC em soro e FO demonstra que FO pode ser utilizado para avaliar resposta imune frente à infecção por *L. intracellularis*.

3.6. REFERÊNCIAS

- Decorte, I., Breedam, W.V., Stede, Y.V., Nauwync, H.J., Regge, N.D., Cay, A.B., 2014. Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs. *BMC Veterinary Research* 10, 134.
- Escribano, D., Gutiérrez, A.M., Martínez Subiela, S., Tecles, F., Cerón, J.J., 2012. Validation of three commercially available immunoassays for quantification of IgA, IgG, and IgM in porcine saliva samples. *Research in Veterinary Science* 93, 682-687.
- Giménez-Lirola, L.G., Xiao, C.T., Zavala, M., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2013. Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. *Journal of Microbiological Methods* 92, 113-121.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Winkelman, N.L., Mackie-Nuss, R.A.C., Marsteller, T.A., Deen, J., 2002a. Comparison of different methods for diagnosis of Porcine Proliferative Enteropathy. *Canadian Journal of Veterinary Research* 66, 99-107.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Deen, J., Winkelman, N.L., 2002b. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 528-530.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Winkelman, N.L., Mackie-Nuss, R.A., 2002c. A comparative study of an indirect fluorescent antibody test and an immunoperoxidase monolayer assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, 420-423.
- Guedes, R.M.C. (2007) Diarreias e enterites em leitões de recria e terminação. VII Seminário de Aves e Suínos – In: Proceedings of the AveSui Regiões, Suinocultura, Belo Horizonte – MG, p.39 – 43.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., 2004. Progression of *L. intracellularis* infection and mucosal immune response in pigs. 18th International Pig Veterinary Society Congress – In: Proceedings of the International Pig Veterinary Society, Hamburg, Germany, p. 250.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., 2003a. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15, 438-446.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Armbruster, G.A., Roggow, B.D., 2002d. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. *Canadian Journal of Veterinary Research* 66, 258-263.
- Jones, G.F., Ward, G.E., Murtaugh, M.P., Lin, G., Gebhart, C.J., 1993. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, *Ileal symbiont intracellularis*, in faeces by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2611-2615.
- Kittawornrat, A., Engle, M., Panyasing, Y., Olsen, C., Schwartz, K., Rice, A., Lizano, S., Wang, C., Zimmerman J.J., 2013. Kinetics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) humoral immune response in swine serum and oral fluids collected from individual boars. *BMC Veterinary Research* 28, 61.
- Kittawornrat, A., Panyasing, Y., Goodell, C., Wang, C., Gauger, P., Harmon, K., Rauh, R., Desfresne, L., Levis, I., Zimmerman, J., 2014. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) surveillance using pre-weaning oral fluid samples detects circulation of wild-type PRRSV. *Veterinary Microbiology* 168, 331-339.

- Kittawornrat, A., Prickett, J., Wang, C., Olsen, C., Irwin, C., Panyasing, Y., Ballagi, A., Rice, A. Main, R., Johnson J., *et al.*, 2012. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 262-269.
- Kroll, J.J., Roof, M.B., Hoffman, L.J., Dickson, J.S., Harris, D.L., 2005. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Research Reviews* 6, 173-197.
- McOrist, S., Gebhart, C.J., Boid, R., Barns, S.M., 1995. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 820-825.
- Mur, L., Gallardo, C., Soler, A., Zimmermann, J., Pelayo, V., Nieto, R., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Arias, M., 2013. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Veterinary Microbiology* 165, 135-139.
- Nogueira, M.G., Collins, A.M., Donahoo, M., Emery, D., 2013. Immunological responses to vaccination following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. *Veterinary Microbiology* 164, 131-138.
- Olsen, C., Karriker, L., Wang, C., Binjawadagi, B., Renukaradhya, G., Kittawornrat, A., Lizano, S., Coetzee, J., Main, R., Meiszberg, A. *et al.*, 2013. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *The Veterinary Journal* 198, 158-163.
- Ouyang, K., Binjawadagi, B., Kittawornrat, A., Olsen, C., Hiremath, J., Elkalifa, N., Schleappi, R., Wu, J., Zimmerman, J., Renukaradhya, G.J., 2013. Development and validation of na assay to detect porcine reproductive and respiratory syndrome virus-specific neutralizing antibody titers in pig oral fluid samples. *Clinical and Vaccine Immunology* 20, 1305-1313.
- Pacheco, J.M., Butler, J.E., Jew, J., Ferman, G.S., Zhu, J., Golde, W.T., 2010. Iga antibody response of swine to Foot-and-Mouth Disease virus infection and vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 550-558.
- Panyasing, Y., Goodell, C.K., Giménez-Lirola, L., Kittawornrat, A., Wang, C., Schwartz, K.J., Zimmerman, J.J., 2013. Kinetics of influenza A virus nucleoprotein antibody (IgM, IgA, and IgG) in serum and oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions. *Vaccine* 31, 6210-6215.
- Panyasing, Y., Goodell, C.K., Wang, C., Kittawornrat, A., Prickett, J.R., Schwartz, K.J., Ballagi, A., Lizano, S., Zimmerman J., 2014. Detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies in oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions using a blocking ELISA. *Transboundary and Emerging Diseases* 61, 177-184.
- Prickett, J., Simer, R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.J., Evans, R.B., Zimmerman, J.J., 2008. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 156-163.
- Prickett, J.R., Johnson, J., Murtaugh, M.P., Puvanendiran, S., Wang, C., Zimmerman, J.J., Opriessnig, T., 2011. Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. *Transboundary and Emerging Diseases* 58, 121-127.

Prickett, J.R., Zimmerman, J.J., 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews* 11, 207-216.

Vannucci, F.A., Pusterla, N., Mapes, S.M., Gebhart, C., 2012. Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* infections. *Veterinary Research* 43, 53.

Vosloo, W., Morris, J., Davis, A., Giles, M., Wang, J., Nguyen, H.T., Kim, P.V., Quach, N.V., Le, P.T., Nguyen, P.H. *et al.*, 2013. Collection of oral fluids using cotton ropes as a sampling method to detect Foot-and-Mouth Disease virus infection in pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-5.

Walter, D., Gebhart, C., Kroll, J., Holck, J.T., Chittick, W., 2004. Serologic profiling and vaccination timing for *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Swine Health and Production* 12, 310–313.

CONCLUSÕES GERAIS

Com coletas de roedores em granjas com casos de enterite proliferativa e através de experimentos foi demonstrado que camundongos são capazes de se infectar e eliminar o agente nas fezes em quantidade suficiente para infectar suínos susceptíveis e serem, portanto, hospedeiros e fontes de infecção de *L. intracellularis* para suínos.

Demostrou-se também que amostras de fluido oral possuem grande potencial para serem utilizadas como amostras biológicas alternativas ao soro sanguíneo na detecção de anticorpo IgG anti-*L. intracellularis*.

ANEXO 1

Detecção de *Lawsonia intracellularis* em fezes de cães em Minas Gerais, Brasil

[*Detection of Lawsonia intracellularis fecal shedding in dogs in Minas Gerais, Brazil*]

Rodrigo Otávio Silveira Silva^{1*}; Michelle de Paula Gabardo¹; Juliana Saes Vilaça de Oliveira¹, Francisco Carlos Faria Lobato¹, Roberto Maurício Carvalho Guedes^{1*}

(Artigo aceito para publicação na revista *Ciência Rural*)

RESUMO

Lawsonia intracellularis é uma bactéria intracelular obrigatória responsável pela enteropatia proliferativa, uma doença entérica endêmica em suínos e comum em potros. No entanto, são escassos os estudos que investigam a doença em cães, e, até o momento, não há relatos de cães infectados com *L. intracellularis* na América Latina. O objetivo deste estudo foi avaliar a eliminação fecal da *L. intracellularis* em amostras de fezes de cães diarreicos e não-diarreico em Minas Gerais, Brasil. Foram incluídos no estudo 58 cães, sendo 18 aparentemente saudáveis e 40 diarreicos. O DNA extraído das fezes foi analisado pela reação de PCR *nested* para *L. intracellularis*. Três das 40 (7,5%) amostras de cães diarreicos, de 3 meses de idade, foram positivas para *L. intracellularis*. Esses resultados destacam a necessidade de estudos adicionais para avaliar o papel deste patógeno como uma possível causa de doença entérica em cães.

Palavras-chave: *Lawsonia intracellularis*, canídeos, enteropatia proliferativa, diarreia

ABSTRACT

Lawsonia intracellularis is an obligate intracellular bacterium that is responsible for proliferative enteropathy, an enteric disease endemic in swine and common in foals. However, few studies have investigated this disease in dogs, and there are no reports of dogs infected with *L. intracellularis* in Latin America. The aim of this study was to evaluate the fecal shedding of *L. intracellularis* in diarrheic and non-diarrheic dogs in Minas Gerais, Brazil. A total of 58 dogs, 18 apparently healthy and 40 diarrheic, were examined in this study. DNA extracted from feces was analyzed using a *nested* PCR reaction to detect *L. intracellularis*. Three out of 40 (7.5%) diarrheic samples, all from 3-month-old puppies, were positive for *L. intracellularis*. These results highlight the need for additional studies to examine the role of this pathogen as a possible cause of enteric disease in dogs.

Key-words: *Lawsonia intracellularis*, canine, proliferative enteropathy, diarrhea

¹ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: rodrigo.otaviosilva@gmail.com; guedesufmg@gmail.com. *Autores de correspondência. ROSS e MPG contribuíram igualmente para o presente trabalho.

1. NOTA

Enterite proliferativa (EP) é uma doença entérica causada pela bactéria intracelular obrigatória *Lawsonia intracellularis*. A EP é bem descrita em várias espécies animais como cordeiros, hamsters, porquinhos da índia, raposas, furões e potros, caracterizada por espessamento do epitélio intestinal devido à proliferação de enterócitos (McOrist & Gebhart, 2012; Vannucci & Gebhart, 2014). Em suínos, a *L. intracellularis* é reconhecida como enteropatógeno desde 1931, e hoje a EP é considerada endêmica em vários países que possuem significativa produção de suínos (Lawson e Gebhart, 2000). Apesar de um pequeno número de estudos que avaliaram a infecções pela *L. intracellularis* em cães (Collins *et al*, 1983; Leblanc *et al*, 1993; Herbst *et al.*, 2003; Klimes *et al.*, 2007), o papel desse microrganismo como enteropatógeno não é claro e não há relatos de infecção de cães infectados com *L. intracellularis* na América Latina. Com isso, devido ao pouco conhecimento sobre a *L. intracellularis* em cães, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença da *L. intracellularis* em amostras de fezes de cães diarreicos e não-diarreicos no Brasil através da *nested* PCR.

Amostras de fezes foram coletadas de 58 cães, dos quais 18 eram aparentemente saudáveis (10 filhotes com menos de 1 ano de vida e 8 adultos, variando de 2 meses a 10 anos de idade), e 40 apresentavam diarreia (19 filhotes e 21 adultos, variando de 1 mês a 8 anos de idade). Os cães investigados no estudo foram trazidos ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais para consultas. As amostras fecais foram obtidas diretamente do reto dos animais diarreicos utilizando sonda estéril durante a consulta. As amostras foram somente coletadas de cães dos quais a principal motivação para a consulta veterinária fosse à ocorrência de diarreia. Amostras de fezes de animais aparentemente saudáveis foram coletadas em três praças públicas de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, com a prévia autorização dos proprietários, quando os animais defecavam. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA, protocolo número 090/10).

As amostras fecais foram estocadas a -20°C até a extração do DNA. O DNA foi extraído utilizando kit comercial Qiagen QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado utilizando reação de *nested* PCR, previamente descrito (Jones *et al.* 1993). Brevemente, dois pares de primer foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA de 217pb. O par de primer externo, LIA (5'-TAT GGC TGT CAA ACA CTC CG- 3') e LIB (5'- TGA AGG TAT TGG TAT TCT CC - 3') foram utilizados para a amplificação de fragmento de 319pb. *Primers* internos, LIC (5' - TTA CAG GTG AAG TTA TTG GG - 3') e LID (5' - CTT TCT CAT GTC CCA TAA GC - 3') foram utilizados posteriormente para a amplificação de 217pb. Os produtos foram revelados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio. Amostras de DNA controle positivo e negativo foram adicionados em cada reação.

Os produtos da PCR das amostras positivas foram purificadas utilizando colunas contendo Sephacryl 1S-400 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), de acordo com as recomendações do fabricante e cada produto foi sequenciado em ambas as direções utilizando os *primers* LIC e LID e o kit Big Dye V3.1 Terminator Kit (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições de PCR: 44 ciclos a 96°C por 30s, 50 °C por 15s e 68 °C por 4 mim. Os resultados dos produtos foram sequenciados utilizando ABI 3130 DNA analyzer (Applied Biosystems, California, USA).

Alíquotas das amostras positivas foram descongeladas e utilizadas para explorar o diagnóstico diferencial da infecção por *L. intracellularis*. As amostras foram analisadas para a presença de

rotavirus através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) seguida pela impregnação pela prata (Herring, 1982); e as amostras foram avaliadas para a detecção de estágio vegetativo e cistos de *Giardia sp.* através de imunoenensaio enzimático (EIA – Ridascreen Giardia, R-Biopharm, Germany); e o diagnóstico de *Clostridium perfringens* foi realizado através de isolamento e genotipagem segundo Silva *et al.* (2013) e a detecção da enterotoxina do *C. perfringens* foi realizada com o kit comercial de imunoenensaio enzimático (Ridascreen Clostridium perfringens Enterotoxin - R-Biopharm, Germany). O isolamento do *C. difficile* foi feito segundo Silva *et al.* (2013), e a detecção da toxina A/B através de imunoenensaio enzimático (Clostridium difficile Tox A/B II, Techlab Inc, Virginia, USA). A presença de coronavírus e parvovirus foi detectada utilizando o teste de imunocromatografia (Corona and Parvovirus Ag Test-Eco Diagnostica, Brazil) e finalmente, para detecção de genes de fatores de patogenicidade de *Escherichia coli*, foi utilizado o isolamento, seguido de PCR multiplex segundo Macêdo *et al.* (2007).

Das 58 amostras testadas pela técnica de *nested* PCR, três (5.2%) foram positivas para *L. intracellularis*. Todas essas amostras foram provenientes de filhotes com cerca de três meses de idade, pertencentes ao grupo com diarreia. É importante notar que a técnica de *nested* PCR é considerada a técnica mais apropriada de diagnóstico para a *L. intracellularis in vivo*, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Especificamente, o protocolo utilizado no presente estudo é capaz de detectar aproximadamente 10^2 *L. intracellularis* por grama de fezes (Jones *et al.*, 1993). Além disso, a pesquisa pelo BLAST das sequências obtidas a partir dos cães demonstrou identidade de 99-98% (com 100 de cobertura) com o gene lise aspartato de amônia da *L. intracellularis*, confirmando o diagnóstico. Em adição, todos os animais positivos foram negativos para os outros enteropatógenos testados.

A taxa de positividade encontrada no grupo diarreico (7,5%) foi similar a reportada por Herbst *et al.*, (2003) (5,4%) em um estudo na Inglaterra. Em adição, a detecção da *L. intracellularis* em filhotes corroboram com descrições prévias da doença em cães jovens (Húsniĳ *et al.*, 2003; Tomanová *et al.*, 2003; Klimes *et al.*, 2007).

Dois hipóteses podem explicar essa positividade nesses animais. Em primeiro lugar, a eliminação esporádica da *L. intracellularis* pelos cães, e a segunda hipótese é que a *L. intracellularis* poderia ser responsável pelo quadro de diarreia nesses casos. Três fatores adicionais na detecção do microrganismo aumentam a possibilidade da *L. intracellularis* ser patogênica para cães: (1) no presente estudo, todos os cães positivos não tiveram contato prévio com suínos e equinos, duas importantes fontes do agente; (2) todos os animais positivos e diarreicos tinham em torno de três meses de idade, enquanto todos os animais do grupo controle foram negativos apesar de seis animais dos 18 testados desse grupo apresentarem em torno de 6 meses de idade; (3) todos os animais positivos foram negativos para os outros enteropatógenos testados.

Em relatos anteriores de *L. intracellularis* em cães (Leblanc *et al.*, 1993; Húsniĳ *et al.*, 2003; Tomanová *et al.*, 2003), as lesões foram observadas e o agente detectado na mucosa do estomago e duodeno, áreas nas quais não são tipicamente observadas em suínos, espécie mais estudada. Com isso, a doença pode estar sendo subdiagnosticada, devido à coleta de segmentos intestinais não tipicamente afetados. Somente Collins *et al.* (1983) observaram lesões características de enteropatia proliferativa no segmento aboral do intestino delgado.

A hipótese de *L. intracellularis* atuar como enteropatógeno em cães foi levantada pela primeira vez em 1983 após a detecção por PCR em dois filhotes de cães Dálmata. Estes animais tinham

também lesões intestinais semelhantes às descritas na PE em suínos (Collins *et al.*, 1983). A *L. intracellularis* também foi detectada em um cão com doença inflamatória intestinal na República Checa, utilizando protocolos de *nested* PCR (Husník, *et al.*, 2003). Em outro estudo, Klimes *et al.* (2007) observaram que a diarreia foi o sinal clínico mais comum de cães sorologicamente positivos para anticorpos anti-*L. intracellularis*. No mesmo estudo, 40 dos 54 cães (74,1%) tinham anticorpos IgG específicos, e quase todos esses animais sofriam de diarreia crônica, e três cães foram confirmados com EP (Klimes *et al.*, 2007).

Outras infecções que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de EP em cães para os quais os cães do presente trabalho não foram testados inclui infecção pelo vírus da cinomose, *Campylobacter* spp, *Cryptosporidium* e helmintos. Em adição, o teste de PCR para os fatores de virulência da *E. coli* no presente estudo não foi capaz de detectar o gene *eae*, o qual é comumente associado a diarreia causada por essa bactéria em cães. Apesar dessas limitações, os resultados levantam a possibilidade da *L. intracellularis* ser o agente causador da diarreia nos cães. Médicos veterinários clínicos no Brasil devem ser alertados da possibilidade desse agente ser uma causa de enterite e morte nessa espécie. Para o nosso conhecimento, essa é a primeira confirmação de eliminação de *L. intracellularis* por cães na América Latina.

2. REFERÊNCIAS

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

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

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; *et al.* Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. J Clin Microbiol, v.6, n.3, p.473-477, 1982.

HÚSNIK, R.; KLIMES, J.; TOMANOVÁ, K.; *et al.* *Lawsonia intracellularis* in a dog with inflammatory bowel disease. Veterinarni Medicina, v.48, n.5 p.141-145, 2008.

JONES, G.F.; WARD, G.E.; MURTAUGH, M.P.; *et al.* Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont *intracellularis*, in faeces by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., v.31, n.10 p.2611-2615, 1993.

KLIMES, J. *et al.* Prevalence of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in dogs with and without gastrointestinal disease. Veterinari Medicina, v. 52, p.502-506, 2007.

LAWSON, G.H.e GEBHART, C.J. Proliferative enteropathy. J Comp Pathol, v.122, n.2-3, p.77-100, 2000.

LEBLANC, B.; FOX, J.G.; LE NET, J.L.; *et al.* Hyperplastic gastritis with intraepithelial *Campylobacter*-like organisms in a Beagle dog. Vet Pathol, v.30, p.391-394, 1993.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE A.P.; *et al.* Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq Bras Med Vet e Zoo*, v.59, n.5, p.1117—1123, 2007.

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.* n.45, n.4, p.820-825, 1995(d).

SILVA, R.O.; RIBEIRO, M.G.; PALHARES, M.S.; *et al.* Detection of A/B toxin and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from foals. *Equine Vet, J.*, v.45, n.6, p.671-675, 2013.

TOMANOVÁ, K.; KLIMES, J.; SMOLA, J.; *et al.* Detection of *Lawsonia intracellularis* in a dog with inflammatory bowel disease using nested PCR and serology. *Vet Med*, v.48, p.108-112, 2003(a).

VANNUCCI, F.A.; GEBHART, C.J. Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Veterinary Pathology*, v.51, p.465-77, 2014

ANEXO 2

Enteropatia proliferativa equina em um haras brasileiro

Equine proliferative enteropathy on a Brazilian farm

Michelle P. Gabardo², José P.H. Sato², Talita P. Resende² and Roberto M.C. Guedes^{2*}

(Artigo aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

RESUMO

Relata-se um caso de infecção pela *Lawsonia intracellularis* em uma propriedade na região Centro Oeste do Brasil. Trinta e nove potros com poucos dias de vida à 21 meses, de um rebanho com 300 equinos, apresentaram hiperemia de mucosa, diarreia de características e intensidade variáveis, perda de peso e desidratação. Em potros com três a seis meses de idade, hipoproteinemia associada a edema submandibular também foram frequentemente observadas. Fragmentos intestinais de um potro de 7 meses foram enviados ao laboratório de patologia animal para diagnóstico. Na macroscopia foram observados hiperemia de serosa e moderado espessamento de parede intestinal, mucosa corrugada com evidenciação das pregas da mucosa e diminuição do lume intestinal. Na análise histológica do intestino delgado e grosso foram observadas hiperplasia de enterócitos de criptas difusa associada a redução marcante de células caliciformes e marcação positiva na imuno-histoquímica para *L. intracellularis*. Três de 11 animais da mesma propriedade foram soropositivos para *L. intracellularis*, demonstrando a circulação do agente na propriedade, mas não foram encontradas amostras de fezes positivas na PCR. Baseado nos sinais clínicos e nos achados patológicos, foi confirmado o diagnóstico de enteropatia proliferativa equina.

Palavras chaves: diagnóstico; *Lawsonia intracellularis*; potro; IPMC

ABSTRACT

A case of *Lawsonia intracellularis* infection in a horse farm in the Midwest region of Brazil is described. Thirty-nine foals from a few days to months old from a herd with 300 horses, experienced diarrhea with variable characteristics and intensities, weight loss, hyperemic mucous membranes and dehydration. In foals 3 to 6 months of age, hypoproteinemia associated with submandibular edema were also common. Intestinal fragments of a 7-month-old foal were sent to an animal disease laboratory for diagnosis. The observed macroscopic lesions were hyperemic serosa, thickening of the intestinal wall with a corrugation, thickening of the mucosa folds and reduction of intestinal lumen. Histological analysis of the small and large intestine revealed enterocyte hyperplasia of the crypts associated with diffuse marked decrease in the number of goblet cells and positive *L. intracellularis* antigen labeling by immunohistochemistry. Three out of 11 animals of the same property were seropositive for *L. intracellularis*, demonstrating the circulation of the agent throughout the farm, but none were PCR positive in fecal samples. Based on clinical signs and pathological findings, the diagnosis of equine proliferative enteropathy was confirmed.

Key words: diagnosis; *Lawsonia intracellularis*; foal; IPMC

1. INTRODUÇÃO

A *Lawsonia intracellularis*, patógeno intracelular obrigatório, é o agente etiológico da enterite proliferativa (EP) (Pusterla & Gebhart 2013). O primeiro relato em equino foi realizado por Duhamel & Wheeldon em 1982, e apenas em 1996, Williams *et al.* (1996) caracterizaram a doença e associaram lesões com a infecção por *L. intracellularis*, utilizando a técnica de imunohistoquímica e microscopia eletrônica (Williams *et al.*, 1996).

A enteropatia proliferativa equina (EPE) é uma doença emergente em potros, e possui alta incidência em animais de 2 a 9 meses de idade. Animais infectados tornam-se rapidamente letárgicos e apresentam severa perda de peso, cólicas, diarréia, ascite e edema na região submandibular e porções distais dos membros. Lesões compatíveis com EP são mais frequentemente observadas no intestino delgado. Na necropsia observa-se lesão mais característica de espessamento da parede intestinal assim como espessamento de mucosa. Microscopicamente, hiperplasia de enterócitos imaturos e ausência de células caliciformes são observadas.

O número de casos de EPE descritos na literatura é crescente, com relatos na América do Norte, Canadá, Europa, África do Sul e Japão (Pusterla e Gebhart, 2013). Há apenas dois relatos da presença da *L. intracellularis* em equinos no Brasil: o primeiro trata-se de um estudo sorológico e de PCR que determinou a prevalência da doença em haras no estado de Minas Gerais (Guimarães-Ladeira *et al.*, 2009). Apesar dos resultados positivos da sorologia e PCR, não foram observados quadros clínicos da doença entre os animais estudados. O segundo relato foi no estado do Rio de Janeiro, no qual foi confirmada a presença de EPE através dos sinais clínicos e PCR positiva em amostras de fezes; tratamento terapêutico e seguimento de cura do animal (Guttmann *et al.*, 2014).

Portanto, mesmo que a circulação da *L. intracellularis* e os casos clínicos de EPE tenham sido observados, quadros de mortalidade não foram ainda detectados em equinos no Brasil. Descrevemos nesse artigo o primeiro caso de EPE no Brasil com sinais clínicos, resultados sorológicos, lesões macroscópicas e microscópicas e confirmação da infecção da *L. intracellularis* pela imuno-histoquímica.

2. MATERIAL E MÉTODO

A propriedade tinha uma tropa de aproximadamente 300 equinos de diferentes idades e sexos, na qual casos de diarreia com característica e severidade variadas foram relatados todos os anos e envolviam potros de diferentes idades.

Esse artigo discute um caso de EPE que foi detectado em um equino, em uma propriedade na região Centro Oeste do Brasil. Nessa propriedade os potros eram geralmente desmamados entre quarto a sete meses de idade, e em seguida agrupados em lotes com aproximadamente 35 animais, pela ordem de nascimento. Os potros eram manejados rotineiramente nas mesmas instalações de outros animais de diferentes idades. Éguas prenhas, não prenhas ou com potros ao pé e potros recém-desmamados eram frequentemente adquiridos sem exame prévio para identificação da *L. intracellularis*. Porém, nenhum dos animais introduzidos na propriedade durante os últimos anos apresentou diarreia. Todos os animais eram vermifugados cinco a seis vezes por ano, com rotatividade entre doramectina e uma associação de ivermectina e pamoato de pirantel ou praziquantel. Casos de diarreia com severidade e características variáveis eram relatados todos os anos e envolviam potros de diferentes idades, porém, não havia o diagnóstico de EPE anterior a esse caso.

Em maio de 2013, fragmentos de intestino delgado e grosso de um equino de sete meses de idade, que morreu, foram fixados em formalina a 10% e submetidos à histopatologia, no laboratório de patologia Veterinária, na Escola de veterinária de Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram processadas de acordo com métodos rotineiros de histologia e coradas pela hematoxilina e eosina. A imuno-histoquímica foi realizada utilizando o método de marcação pela estreptavidina (DAKO, LSAB 675), e anticorpo policlonal anti-*L. intracellularis* na concentração de 1:30000 (Guedes *et al.* 2009).

Onze amostras de soro e fezes de animais do mesmo rebanho foram recebidos previamente para análises sorológicas e teste de PCR, respectivamente, para a detecção da *L. intracellularis* (Jones *et al.*, 1993). Amostras de soro foram testadas através de imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) (Guedes *et al.*, 2002a) com diluição do soro de 1:60. Amostras de fezes dos mesmos animais foram também submetidos a outros laboratórios para análise de PCR para pesquisa de *Clostridium sp.*, *Clostridium perfringens*, and *Salmonella sp.*, microscopia eletrônica de varredura para detecção de coronavírus, exame coproparasitológico e PCR para *Cryptosporidium spp.*

3. RESULTADOS

Em torno de trinta e nove potros, com idade entre poucos dias de vida até 21 meses, nove animais da geração 2011 e 30 da geração 2012, apresentaram sinais clínicos de diarreia pastosa evoluindo a aquosa, temperatura entre 39,5 a 41,0°C nas primeiras 48 horas, inapetência e desidratação. Em potros com três a seis meses de idade, hipoproteinemia associada a edema submandibular também foram frequentes. A duração do quadro clínico era de poucos dias a algumas semanas.

Nos animais com sinais clínicos de diarreia, tratamentos com antibiótico (gentamicina), antiespasmódico com antipirético (Buscopan composto®), associado a tratamento suporte com soroterapia (ringer com lactato, glicose 5% e cloreto de potássio) e omeprazol® eram realizados. Os animais apresentavam melhora no quadro clínico, com diminuição da febre e da hiperemia das mucosas, mas sem alterações significativas do quadro diarreico. Nos potros com hipoproteinemia foi administrada eritromicina em doses de 25mg/Kg de peso vivo, a cada seis horas, por 28 dias e, em casos mais graves, novas aplicações eram feitas com intervalo de sete dias. Cerca de 30% de animais apresentava melhora clínica após o respectivo tratamento.

Sete dos 39 potros que apresentaram os sinais clínicos de diarreia, e três desses morreram. O animal necropsiado tinha 7 meses de idade e morreu quatro dias após o aparecimento da sintomatologia. Ao exame macroscópico foi observada grande quantidade de líquido sero-sanguinolento na cavidade peritoneal, serosa do intestino delgado hiperêmica (Figura 11A) e parede destes mesmos segmentos espessa com diminuição do lúmen intestinal (Figura 11B). A mucosa estava intensamente corrugada, caracterizando espessamento das pregas intestinais (Figura 11C).

A análise histológica do duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso demonstraram hiperplasia de enterócitos de criptas difusa intensa associada à diminuição marcante do número de células caliciformes (Figura 12A). Raras criptas estavam dilatadas e com lúmen preenchido por restos celulares e neutrófilos (abscesso de cripta), além da presença de criptas na submucosa (Figura 12B). À imuno-histoquímica foram observadas marcações positivas para *L. intracellularis* no ápice de enterócitos e em macrófagos na lâmina própria do duodeno, íleo e intestino grosso (Figura 12C).

Das amostras de sangue e fezes processados em nosso laboratório, três animais foram positivos na sorologia e todos negativos na PCR para *L. intracellularis*. Os resultados dos demais agentes encontram-se na tabela 7.

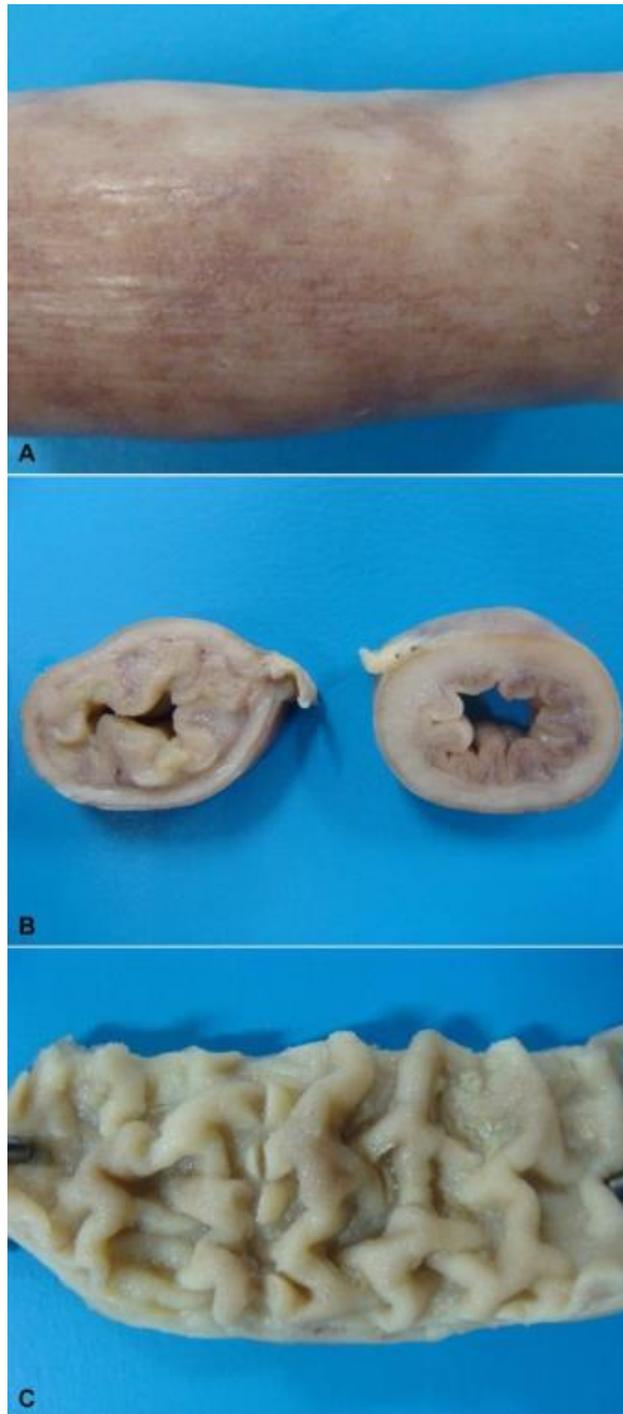


Figura 11: Fragmentos de intestino delgado, fixados em formol 10%, de um equino de 7 meses de idade, com diagnóstico de EPE. A - Serosa com hiperemia multifocal a coalescente. B - Corte transversal de segmento de intestino delgado com parede espessa e diminuição do lúmen intestinal devido ao espessamento da mucosa. C - Corte longitudinal de segmento de intestino delgado demonstrando o espessamento das pregas intestinais.

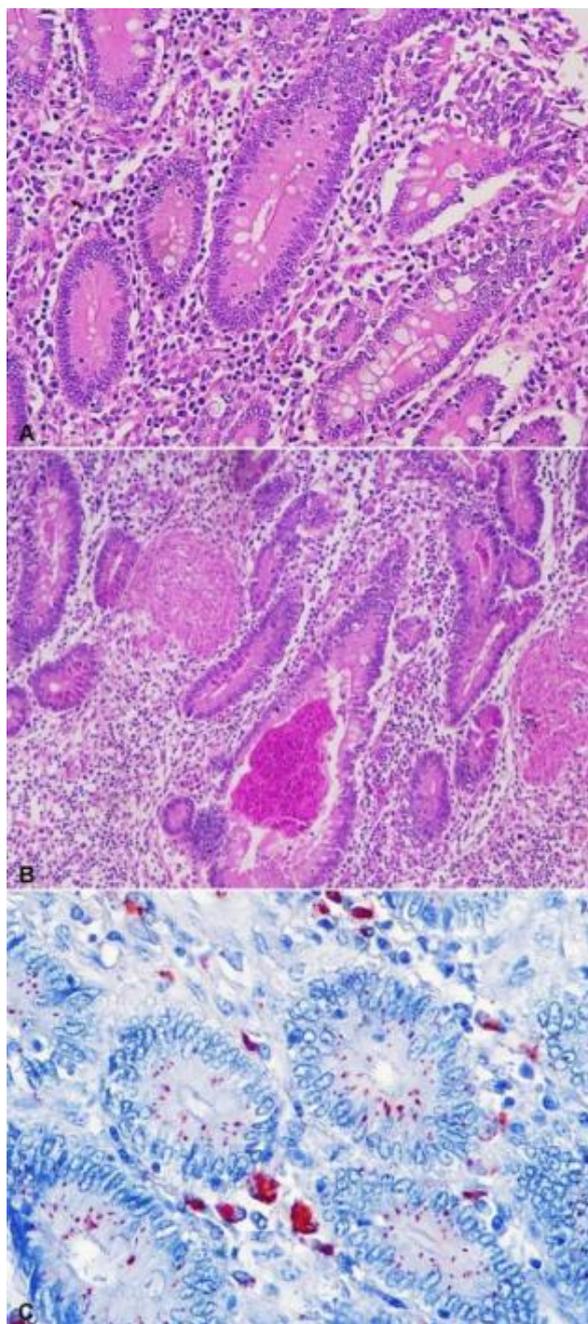


Figura 12: Lesões microscópica de intestino de equino de sete meses de idade com EPE. A - Corte histológico de intestino delgado de equino, com sete meses de idade, com hiperplasia de enterócitos de criptas intensa associada à diminuição marcante de células caliciformes ao lado de criptas normais com monocamada de enterócitos e grande quantidade de células (HE, 100X). B - Corte histológico de intestino delgado com hiperplasia de criptas associada à diminuição de células caliciformes e cripta dilatada preenchida com restos celulares e neutrófilos (abscesso de cripta), e presença de criptas na submucosa (HE, 100X). C - Corte histológico de intestino delgado de equino com marcação positiva em vermelho para *L. intracellularis* no citoplasma de enterócitos de criptas e de superfície de vilosidades e em macrófagos na lâmina própria (AEC, 100X).

Tabela 7: Exames realizados em amostras de fezes e soro para agentes causadores de diarreia em potros, amostras de 11 potros.

Anim.	Idade (Meses)	Corona Virus\$	<i>C. perfringens</i> *	<i>Salmonella</i> sp.*	Crypt.**	<i>L. intracellularis</i>		Diarreia
						Sorologia	PCR	
1	19	+	-	-	-	+	-	Não
2	21	+	-	-	-	+	-	Não
3	19			-	-	-	-	Não
4	19		-	-	-	-	-	Não
5	16		-	-	-	-	-	Não
6	17			-	-	+	-	Não
8	3			-	-	-	-	Sim
9	3		-	-	-	-	-	Sim
21	3					-	-	Sim
22	4					-	-	Sim
23	3					-	-	Sim

#*Cryptosporidium* spp;

\$ Detecção através de microscopia eletrônica de varredura;

* Detecção através de PCR.

Animais 9, 21, 22 e 23 estavam sendo medicado no período da coleta de fezes.

4. DISCUSSÃO

Os sinais clínicos relatados e os achados macro e microscópicos, todos condizentes com a literatura (Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2010; Vannucci *et al.*, 2013b), associados à marcação positiva para *L. intracellularis* na imuno-histoquímica nos permitiu chegar ao diagnóstico de EPE. Diferentemente de suínos, nos quais as lesões e a imunomarcação são mais concentradas no terço final do intestino delgado, em equinos podem também ser encontradas no duodeno como relatado no presente caso. As lesões de intestino grosso são menos frequentes, porém em nosso caso, lesões histológicas compatíveis com EPE foram encontradas no intestino grosso.

Os animais acometidos tinham idade variando entre poucos dias a 21 meses de idade, porém, o quadro de diarreia associada à hipoproteinemia e edema submandibular foi observado com mais frequência nos potros de três a seis meses de idade, faixa etária em que esses animais são mais susceptíveis e acometidos por *L. intracellularis* (Williams *et al.*, 1996; Lavoie *et al.*, 2000; Frazer, 2008; Pusterla *et al.*, 2010). Essa predisposição está provavelmente associada com o declínio dos anticorpos maternos (Pusterla *et al.*, 2008a), bem como à fatores estressantes de desmame como o movimento para novos piquetes ou celeiros, vermifugação, programas de

vacinação, ou início de programas de condicionamento (Frazer, 2008), os quais foram relatados nessa propriedade.

Os potros entre três e quatro meses de idade (animais 8, 9, 21, 22 e 23) apresentavam diarreia no momento da coleta de fezes, porém tiveram diagnóstico negativo na PCR e sorologia. PCR pode não detectar baixa eliminação bacterianas na nas fezes de animais subclínicos ou recentemente infectados, ou com curso prolongado da doença ou em potros em tratamento antimicrobiano (Dauvillier *et al.*, 2006; Pusterla *et al.*, 2012b). De acordo com relatos, a excreção fecal de *L. intracellularis* cessa ou para de ser detectada entre 4 e 6 dias após o início da administração de doxiciclina (Pusterla *et al.*, 2012b) e eritromicina (Dauvillier *et al.*, 2006). Em animais inoculados, a eliminação da *L. intracellularis* foi primeiramente detectada pela PCR de 12 a 18 dias pós-inoculação e perdurou por 7 a 21 dias (Pusterla, 2010; 2012b). Resultados positivos na sorologia ocorrem em 14 a 21 dias após a exposição ao agente (Pusterla & Gebhart 2013; Pusterla *et al.*, 2010). Esperam-se resultados negativos na fase inicial da doença, quando a resposta imune humoral ainda não é forte para ser detectável por sorologia (Pusterla e Gebhart, 2013). Sendo assim, o período de coleta das amostras de sangue também pode ter influenciado nos resultados. Soropositividade para *L. intracellularis* em animais negativos na PCR de amostras fecais, pode ser explicado pela sensibilidade da última técnica e/ou pelo curso da infecção. Há vários inibidores nas fezes que reduzem a sensibilidade e, assim como a quantidade de bactéria eliminada nas fezes podem ser inferior aos níveis de detecção da PCR. Em adição, a presença dos anticorpos contra *L. intracellularis* perduraram por mais tempo comparado à eliminação da bacteriana nas fezes (Pusterla *et al.* 2008a).

Apesar da ausência de diagnóstico definitivo de EPE, a morte de alguns potros com sinais de diarreia pode ser explicada pela utilização da gentamicina como antibiótico de eleição. Tratamentos com este antimicrobiano não são eficazes na remissão da sintomatologia clínica de EPE (Schumacher *et al.*, 2000; Wuersch *et al.*, 2006), uma vez que este princípio ativo possui valores de concentração inibitória mínima (MIC) altos para *L. intracellularis* (McOrist, S. *et al.* 1995). Nos animais que apresentaram hipoproteïnemia foram administradas doses de eritromicina, com melhora clínica em alguns desses animais. Tratamentos com eritromicina foram eficazes para EPE em outros relatos (Lavoie *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2000; Bihl, 2003), sendo considerado um dos tratamentos de eleição para casos com suspeita da doença. A progressão da doença varia de dias a semanas, e o prognóstico é bom, desde que o diagnóstico oportuno e tratamento adequado sejam realizados, pois casos tardios ou não tratados evoluem para a morte (Pusterla e Gebhart, 2013).

A soropositividade no nosso estudo foi de 27%, taxa mais baixa do que as encontradas em outros estudos (Pusterla *et al.* 2008a) (29,7% e 33,8%), em propriedades com casos de EPE. Porém, a primeira diluição de anticorpo utilizada por esse autor foi 1:30, e nos testes sorológicos em nosso laboratório utilizamos 1:60 para detectar anticorpos anti-*L. intracellularis*, pois esta diluição foi a que apresentou menos marcações inespecíficas. Investigações epidemiológicas em haras com casos clínicos indicam que 10-65% dos potros clinicamente saudáveis e cavalos adultos são soropositivos para *L. intracellularis* (Frazer, 2008; Pusterla *et al.*, 2009). Em rebanhos de Minas Gerais, a porcentagem de animais positivos variou de 3,57 a 16,67%, sendo que as propriedades não apresentavam casos da doença clínica, o que justifica baixos índices de soropositivos (Guimarães-Ladeira *et al.*, 2009).

A contaminação dos potros do presente relato pode ter ocorrido através do contato direto com as fezes de outros equinos infectados com *L. intracellularis* uma vez que há a utilização diária das mesmas instalações para todas as idades e/ou decorrente da introdução de novos animais sem exame prévio para identificação do agente. Nenhum dos animais introduzidos na propriedade

durante o último ano apresentou sinais clínicos de EPE, porém ausência de sinais clínicos não descarta a possibilidade de eliminação do agente nas fezes e equinos serem fontes de contaminação para outros animais na propriedade (Pusterla, *et al.*, 2010; Guimarães-Ladeira *et al.* 2009; Page *et al.*, 2011). EPE não é contemplada entre os diagnósticos prévios e diferenciais para doenças entéricas em equinos, podendo haver animais positivos negligenciados.

Animais silvestres e domésticos como cães, gatos, gambás (*Didelphis sp*) e cachorros do mato (*Canis thous*) avistados na propriedade podem também ser fontes de contaminação. O DNA bacteriano já foi detectado em fezes de animais domésticos e silvestres capturados em haras com ocorrência de EPE (Pusterla *et al.*, 2008b; 2012a). Lavoie *et al.* (2000) relatam a entrada do agente em um haras sem a introdução de novos cavalos nem o contato dos animais com suínos, o que sugeriu a contaminação através de animais silvestres. Todavia, o papel desses animais na epidemiologia da doença não é bem esclarecido. Apesar dos equinos não terem contato com suínos, o papel desta espécie na introdução do agente em propriedades e a contaminação de equinos é controverso. Al-Ghamdi e colaboradores (2012) conseguiram reproduzir a EP em potros de dois meses de idade usando cultura pura de *L. intracellularis* e homogeneizado de mucosa intestinal obtido de suínos experimentalmente infectados. Vannucci *et al.* (2012b) não observaram os mesmos resultados, com suínos infectados com isolado equino e potros infectados com isolado de *L. intracellularis* de suínos não apresentaram sinais clínicos, queda no desempenho zootécnico, alterações patológicas ou hipoproteïnemia, nos casos dos potros, sugerindo uma adaptação ao hospedeiro.

5. CONCLUSÃO

A EPE está presente em rebanhos na região centro-oeste do Brasil e, apesar do relato de um caso clínico da doença e a detecção da *L. intracellularis* em fezes e sorologia positiva em potros em outros estados brasileiros, a EPE continua negligenciada no diagnóstico diferencial de doenças entéricas em potros. O presente relato descreve caso de morte associada à doença e contribui para o entendimento do comportamento da doença no campo, com a apresentação de sinais clínicos, lesões, tratamento e epidemiologia, além de apresentar diferentes técnicas de diagnóstico que podem ser empregadas na detecção do agente.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq, PRPq-UFMG, CAPES e Fapemig pelo apoio financeiro. RMCG é um beneficiário de uma bolsa do CNPq.

6. REFERÊNCIAS

- Al-Ghamdi G.M., Guedes R.M.C., Sage A.M., Hayden D.W., Neubauer A. & Ames T.R. 2012. Reproduction of proliferative enteropathy in foals using porcine intestinal mucosal homogenate. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 15(4):273–282.
- Bihr T.P. 2003. Protein-losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weanling foal. *Can. Vet. J.* 44(1):65–66.
- Dauvillier J., Picandet V., Harel J., Gottschalk M., Desrosiers R., Jean D. & Lavoie J-P. 2006. Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in 2 foals. *Can. Vet. J.* 47(7):689–691.
- Davis E., Rush B.R., Cox J., DeBey B. & Kapil S. 2000. Neonatal enterocolitis associated with coronavirus infection in a foal: a case report. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(2):153–156.
- Frazer M.L. 2008. *Lawsonia intracellularis* infection in horses: 2005–2007. *J. Vet. Intern. Med.* 22(5):1243–1248.
- Guedes R.M.C., Franca S.A., Machado G.S., Blumer M.A. & da Costa Cruz E.C. Jr. 2009. Use of tylosin-medicated feed to control porcine proliferative enteropathy. *Vet. Rec.* 165(12):342-345.
- Guimarães-Ladeira C.V., Palhares M.S., Oliveira J.S., Ramirez M.A & Guedes R.M.C. 2009. Shedding and serological cross-sectional study of *Lawsonia intracellularis* in horses in the state of Minas Gerais, Brazil. *Equine Vet. J.* 41(6):593-596.
- Guttmann P.M., Viscardi V., Lessa D.A.B. & Guedes R.M.C. 2014. Equine Proliferative Enteropathy Caused by *Lawsonia intracellularis* in a Foal in Brazil. *J Equine. Vet. Sci.* 34(5):701–703.
- Guy J.S., Breslin J.J., Breuhaus B., Vivrette S. & Smith L.G. 2000. Characterization of a Coronavirus Isolated from a Diarrheic Foal. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):4523-4526.
- Jones G.F., Ward G.E., Murtaugh M.P., Lin G. & Gebhart C.J. 1993. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in faeces by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31(10):2611-2615.
- Lavoie J.P., Drolet R., Parsons D., Leguillette R., Sauvageau R., Shapiro J., Houle L., Hallé G. & Gebhart C.J. 2000. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhea and hypoproteinaemia in foals on the breeding farms in Canada. *Equine Vet. J.* 32(5):418-425.
- Lester G.D. 2001, Infectious Diarrhea in Foals. In: *IVIS Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2001*, 47:468-471.
- Macêdo N.R., Al-Ghamdi G., Gebhart C.J. & Guedes R.M.C. 2008. Enteropatia proliferativa em equinos. *Ciência Rural.* 38(3):889-897.
- McOrist S., Mackie, R.A. & Lawson G.H. 1995. Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. *J. Clin. Microbiol.* 33(5):1314–1317.
- Page A.E., Slovis N.M., Gebhart C.J., Wolfsdorf K., Mapes S.M. & Pusterla N. 2011. Serial use of serologic assays and fecal PCR assays to aid in identification of subclinical *Lawsonia intracellularis* infection for targeted treatment of Thoroughbred foals and weanlings. *J. Am. Vet. Med.* 238(11):1482-1489.

- Pusterla N. & Gebhart C: 2013, *Lawsonia intracellularis* infection and proliferative enteropathy in foals. *Vet. Microbiol.* 167:34-41.
- Pusterla N., Higgins J.C., Smith P., Mapes S. & Gebhart C. 2008a. Epidemiological survey on farms with documented occurrence of equine proliferative enteropathy due to *Lawsonia intracellularis*. *Vet Rec* 163(5):156-8.
- Pusterla N., Jackson R., Wilson R., Collier J., Mapes S. & Gebhart C. 2009. Temporal detection of *Lawsonia intracellularis* using serology and real-time PCR in Thoroughbred horses residing on a farm endemic for equine proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* 136(1-2):173-176.
- Pusterla N., Mapes S. & Gebhart C. 2012. Further investigation of exposure to *Lawsonia intracellularis* in wild and feral animals captured on horse properties with equine proliferative enteropathy. *Vet. J.* 194(2):253-255.
- Pusterla N., Mapes S., Rejmanek D. & Gebhart C. 2008b. Detection of *Lawsonia intracellularis* by Real-time PCR in the Feces of Free-living Animals from Equine Farms with Documented Occurrence of Equine Proliferative Enteropathy. *J. Wildl. Dis.* 44(4):992-998.
- Pusterla N., Mapes S., Wademan C., White A., Ball R., Sapp K., Burns P., Ormond C., Butterworth K., Bartol J. & Magdesian K.G. 2013. Emerging outbreaks associated with equine coronavirus in adult horses. *Vet. Microbiol.* 162(1):228-231.
- Pusterla N., Wattanaphansak S., Mapes S., Collier J., Hill J., Difrancesco M. & Gebhart C. 2010. Oral Infection of Weanling Foals with an Equine Isolate of *Lawsonia intracellularis*, agent of Equine Proliferative Enteropathy. *J. Vet. Intern. Med.* 24:622-627.
- Schumacher J., Schumacher J., Rolsma M., Brock K.V. & Gebhart C.J. 2000. Surgical and medical treatment of an Arabian filly with proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Intern. Med.* 14(6):630-632.
- Vannucci F.A., Pusterla N., Mapes S.M. & Gebhart C. 2012. Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet Res.* 43:53.
- Williams N.M., Harrison L.R. & Gebhart C.J. 1996. Proliferative enteropathy in a foal caused by *Lawsonia intracellularis*-like bacterium. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8(2):254-256
- Wuersch K., Huessy D., Koch C. & Oevermann A. 2006, *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a filly. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53(1):17-21.

ANEXO – 3

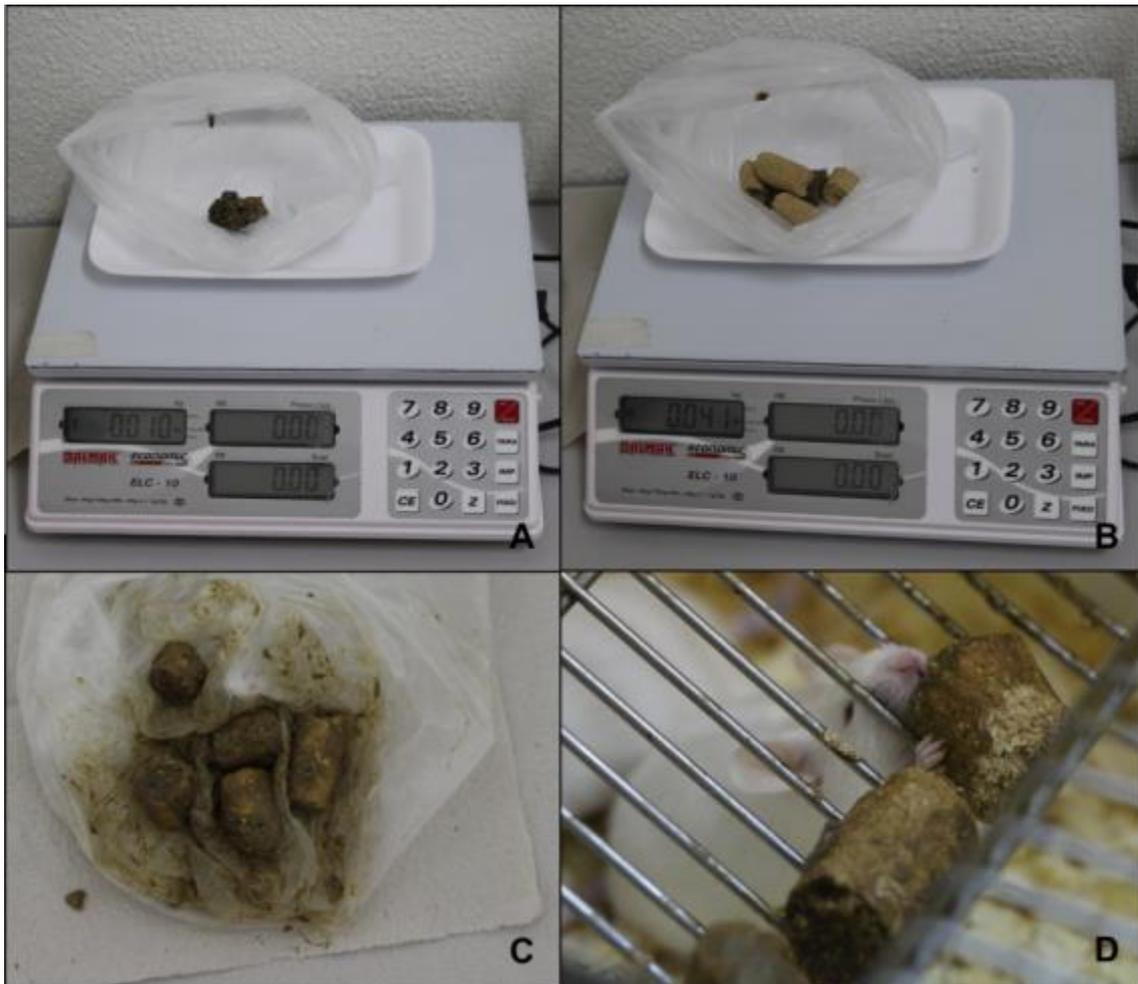


Figura 13: Etapa 1 – fase experimental. Fornecimento de fezes suínas aos camundongos. A; B e C: Em seqüência a pesagem das fezes dos suínos, pesagem da ração dos camundongos e mistura da ração as fezes. **D:** Fornecimento aos camundongos de ração com fezes de suínos experimentalmente infectados com *L. intrecellularis*.

ANEXO 4

Tabela 8: Quantidade de fezes de camundongos experimentalmente inoculados com *L. intracellularis* expostas aos suínos por dia de exposição.

Suíno	Dias de exposição				Total*
	1°	2°	3°	4°	
1 ^{&}	4,62	4,12	4,05	3,16	15.95 g
2 ^{&}	5,20	5,50	3,16	3,04	16.9 g
3	6,78 g	5,10 g	3,41 g	2,73 g	18.02 g
4	4,67 g	5,00 g	4,98 g	4,27 g	18.92 g
5	8,04 g	5,30 g	4,05 g	3,10 g	20.49 g
6	5,47 g	5,66 g	4,80 g	3,46 g	19.39 g
7	4,11 g	4,4 g	3,47 g	3,14 g	15.12 g
8	5,75 g	4,72 g	4,50 g	3,46 g	18.43 g
9	5,26 g	5,24 g	2,48 g	3,24 g	16.22 g
10	4,40 g	9,40 g	3,27 g	3,35 g	20.42 g
11	7,04 g	7,28 g	3,56 g	4,25 g	22.13 g
12	4,26 g	4,34 g	6,82 g	3,56 g	18.98 g
13	3,91 g	7,47 g	4,08 g	3,84 g	19.30 g
14	6,71 g	6,96 g	5,32 g	5,83 g	24.82 g

*Média 18,93±2,53 g/suíno & Animais do controle negativo.

ANEXO -5

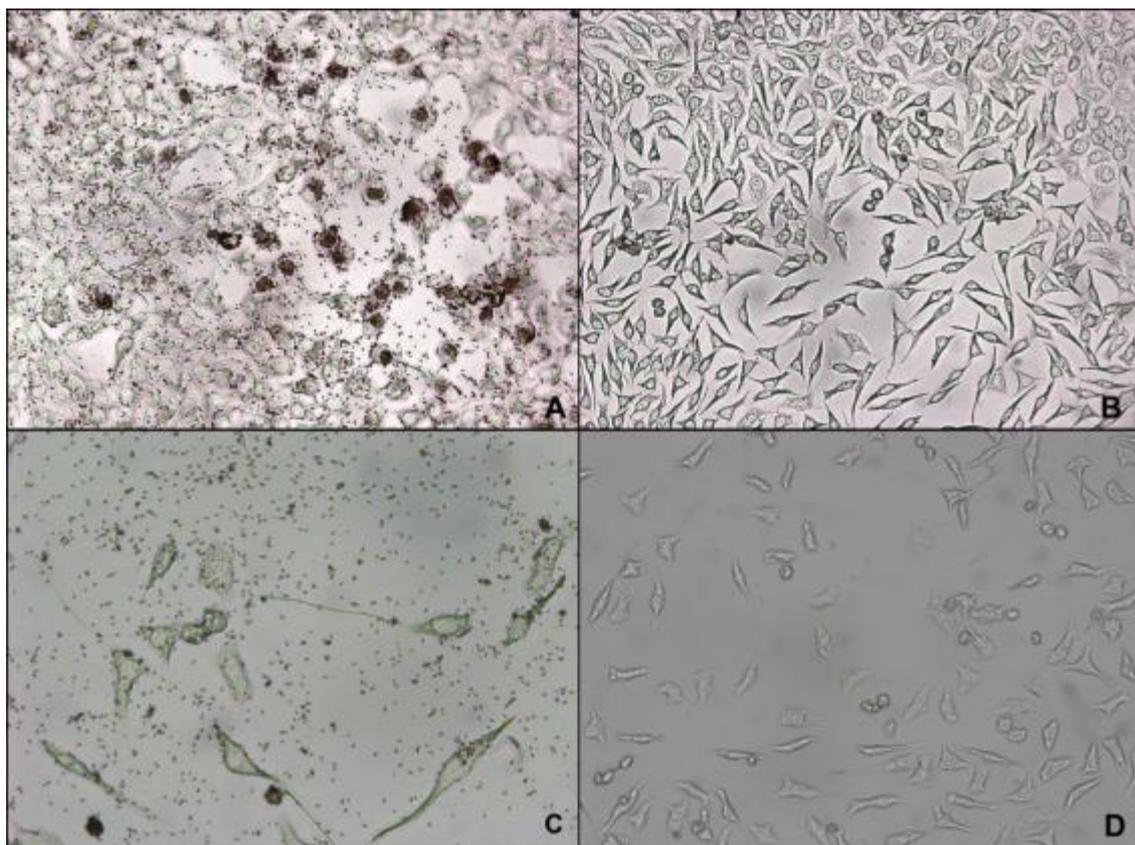


Figura 14: Imunoperoxidase em monocamada de célula (IPMC) em amostras de fluido oral. A e B: Amostras positiva e negativa para IgA anti-*L. intracellularis*, respectivamente. **C e D:** Amostras positivas e negativa para IgG anti-*L. intracellularis*, respectivamente. Nas amostras positivas observa-se marcação em marrom com morfologia de bacilo extracelular.

ANEXO 6

Tabela 9: Número de animais positivos por baia e baias positivas para IgA em amostras individual e coletiva, respectivamente, de fluido oral de suínos nos diferentes dias após a inoculação experimental com *L. intracellularis*.

	Baia	0 dpi*	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi
Grupo controle	1A	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	1B	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4*
	1C	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	1D	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	2A	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	2B	0/3	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2*
	2C	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	2D	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/3
Grupo inoculado	3A	0/4	0/4	1/3	3/3	2/3	2/2	2/3
	3B	0/4	0/4	¼	2/4	3/4	4/4	4/4
	3C	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	1/4	1/4
	3D	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	2/4
	4A	0/4	0/3	0/3	0/3	1/3	0/2	0/2
	4B	0/4	0/4	0/4	3/3	3/3	3/3	3/3
	4C	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	3/3	3/3
	4D	0/4	0/4	0/4	1/4	3/4	3/4	2/4

Marcação em cinza significa positividade nas amostras de fluido oral por baia. Células contornadas significam baias negativas nas amostras coletivas, porém positivas em amostras individuais. * Baias positivas na amostra coletiva, porém negativa nas amostras individuais. Baias 1 e 2 = grupo controle; Baias 3 e 4 = grupo infectado. *dpi = dia pós-infecção.

ANEXO 7

Tabela 10: Número de animais positivos por baia e baias positivas para IgG em amostras individual e coletiva, respectivamente, de fluido oral de suínos nos diferentes dias após a inoculação experimental com *L. intracellularis*.

	Baia	0 dpi *	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi
Grupo controle	1A	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	1B	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	1C	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	1D	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	2A	0/4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	2B	0/3	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	2C	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	2D	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2
Grupo inoculado	3A	0/4	0/4	0/3	2/3	2/2	2/2	2/2
	3B	0/4	0/4	0/4	1/4	2/3	4/4	4/4
	3C	0/4	0/4	0/4	1/4	4/4	4/4	3/4
	3D	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	2/2
	4A	0/4	0/3	0/3	3/3	1/3	1/2	2/2
	4B	0/4	0/4	0/4	3/3	3/3	3/3	3/3
	4C	0/4	0/4	0/4	1/4	4/4	3/3	3/3
	4D	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	3/4

Marcação em cinza significa positividade nas amostras de fluido oral por baia. Células contornadas significam baias negativas nas amostras coletivas, porém positivas em amostras individuais. Baias 1 e 2 = grupo controle; Baias 3 e 4 = grupo infectado. *dpi = dia pós-infecção.