

Luisa Vianna Arantes Otoni

Eficácia da Tilosina injetável (Eurofarma Laboratórios S.A.) no tratamento da enteropatia proliferativa em leitões experimentalmente inoculados

Dissertação apresentada ao Programa da Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, área de concentração Patologia Animal. Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2018

O88e

Otoni, Luisa Vianna Arantes, 1990-
Eficácia da Tilosina injetável (Eurofarma Laboratórios S.A.) no tratamento da enteropatia proliferativa em leitões experimentalmente inoculados / Luisa Vianna Arantes Otoni. – 2018.
35 p. : il.

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

1. Leitão (Suíno) – Doenças – Teses. 2. Antimicrobianos – Teses. 3. Tilosina – Teses.
4. Intestinos – Doenças – Teses. I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 6

FOLHA DE APROVAÇÃO

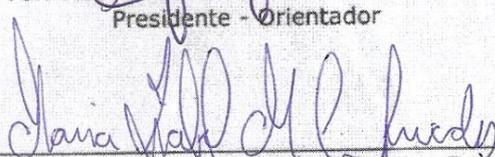
LUISA VIANNA ARANTES OTONI

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

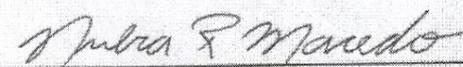
Aprovada em 15 de Janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes
Presidente - Orientador



Profª. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes
Escola de Veterinária - UFMG



Dra. Núbia Resende Macêdo
Pós - Doutorado - UFMG

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu.

Assim devemos ser todo dia, mutantes,

porém leais com o que pensamos e sonhamos.” (Paulo Beleki)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida e oportunidade de aprendizado.

Sou imensamente grata a meus pais, Luiz e Joelma, por apoiarem a minha escolha, pela paciência, carinho e palavras de incentivo. Agradeço a meu irmão Davi que sempre me diverte e torce por mim. À melzinha pela fidelidade.

Ao Victor pelo carinho, incentivo e por tornar tudo mais leve.

Agradeço aos familiares que sempre torceram por mim nesta difícil jornada e por entenderem minha ausência em diversos momentos com a família.

Agradeço ao meu orientador Prof. Roberto Guedes pela oportunidade, ensinamentos, confiança e paciência. Um grande exemplo de profissional.

Agradeço imensamente aos colegas Guedes et al. (doutorandos, mestrados e IC's) pelo trabalho em equipe, companhia, momentos de diversão e de consolo. Obrigada por toda a ajuda, sem vocês nada disso seria possível!

Aos colegas da Patologia Veterinária pelos cafezinhos, conversas, risadas e choros. Aos professores da Patologia, pelo conhecimento compartilhado.

À Leimar e Natalia pelas boas risadas, companhia e ajudas.

Agradeço aos amigos de toda a vida por entenderem os momentos de ausência e por torcerem por mim.

À UFMG e à Escola de Veterinária que se tornaram minha segunda casa nestes anos. Ao suporte da Fapemig, Capes, Cnpq e colegiado de pós-graduação em ciência animal da Escola de Veterinária. Ao apoio financeiro da Eurofarma.

Muito Obrigada!

Índice

RESUMO	10
1. Introdução	12
2. Objetivo	12
3. Revisão de literatura	13
3.1. Etiologia e epidemiologia	13
3.1.1. Prevalência	13
3.2. Impactos econômicos	14
3.3. Patogênese	14
3.4. Caracterização da doença	15
3.5. Diagnóstico	16
3.6. Tratamento e controle	18
3.6.1. Antimicrobianos	18
3.6.2. Antimicrobianos eficientes para EPS	19
4. Materiais e métodos	19
4.1. Animais e instalações	19
4.2. Delineamento experimental	20
4.3. Produção de inóculo	20
4.4. Inoculação	21
4.5. Avaliação clínica e de desempenho	21
4.6. Medicação injetável	21
4.7. Avaliação post-mortem	21
4.8. Imuno-histoquímica	22
4.9. Análise estatística	22
5. Resultados	22
5.1. Avaliação clínica	22
5.2. Desempenho	25
5.3. Lesões macroscópicas	25
5.4. Imuno-histoquímica	26
6. Discussão	27
7. Conclusão	29
8. Referências	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Total de dias com e sem diarreia dentre os animais do grupo controle e medicado no período pós-tratamento	24
Tabela 2:	Peso médio e ganho de peso diário (GPD) dos grupos não medicado e medicado em diferentes períodos, até o dia da eutanásia (D21)	25
Tabela 3:	Comparação de consumo médio diário (CMD) por animal entre os grupos controle e medicado nos períodos total (dias 0-20), pré-tratamento (dias 0-13) e pós-tratamento (dias 14-20)	25
Tabela 4:	Intensidade de lesões macroscópicas e média de extensão de lesões, em cm, por animais afetados dos grupos não medicado e medicado	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Intestino delgado, enteropatia proliferativa hemorrágica. Mucosa apresenta-se difusamente espessada com sangue e coágulos no lúmen intestinal. Fonte: Silvia de Araújo França.....15
- Figura 2: Intestino delgado, enteropatia proliferativa crônica. Mucosa apresenta-se difusamente espessada, com pregueamento e hiperemia difusa.....16
- Figura 3: Amostra de soro de suíno positiva para anticorpos anti-*L. intracellularis*. Bactérias marcadas em vermelho no citoplasma e entre as células McCoy infectadas *in vitro* após a realização de IPMC. (Microscópio óptico, 40X). Fonte: Roberto Guedes.....17
- Figura 4: Corte histológico de íleo corado pela imuno-histoquímica utilizando anticorpo para *Lawsonia intracellularis* (PAb 1999 - Guedes & Gebhart 2003a).....17
- Figura 5: Instalações da unidade experimental de suínos da Escola de Veterinária da UFMG. Quatro baias em cada sala, com cocho tipo depósito, bebedouro tipo chupeta e bandejas de inox para coleta de desperdício.....20
- Figura 6: Linha do tempo mostrando a fase experimental. **Dia -2:** animais foram pesados e coletadas fezes individuais. **Dia 0:** inoculação dos 60 animais, com 43mL de inóculo contendo $1,6 \times 10^7$ bactérias. **Dia 13:** pesagem dos animais para cálculo da dose de medicamento e início da medicação às 19h (1ª dose). **Dia 14:** 2ª dose de medicação às 7h e 3ª dose de medicação às 19h. **Dia 21:** eutanásia dos 60 animais, por eletrocussão seguida de sangria.....21
- Figura 7: Percentual de animais acometidos com diarreia nos grupos medicado e não medicado, nos períodos anterior (dia 1 a 13) e posterior ao tratamento (dia 14 a 21).....23
- Figura 8: Número de animais em cada grupo com diarreias grau 1 e 2, nos dias 01 ao 21. **G1E1:** grupo 1 com diarreia escore 1 (azul claro). **G1E2:** grupo 1 com diarreia escore 2 (azul escuro). **G2E1:** grupo medicado com diarreia escore 1 (verde claro). **G2E2:** grupo medicado com diarreia escore 2 (verde escuro).....24
- Figura 9: Lesão macroscópica observada à necropsia, grau 1, espessamento de mucosa intestinal.....26
- Figura 10: Corte histológico de íleo corado pela imuno-histoquímica utilizando anticorpo contra *Lawsonia intracellularis* (PAb 1999 - Guedes & Gebhart, 2003a). Grau 1 de imunomarcção, em até 25% das criptas (20x).....27
-

RESUMO

Enteropatia proliferativa suína (EPS) é uma das doenças entéricas mais comuns em suínos de recria e terminação. A EPS caracteriza-se por redução no desempenho dos animais, acompanhada ou não por diarreia. É uma doença altamente prevalente em diversos países da América, Europa e Ásia, provocando elevados prejuízos econômicos nos rebanhos suínos. A forma de controle da EPS mais adotada em rebanhos suínos é a antibioticoterapia. O objetivo deste estudo foi avaliar um novo produto à base de tilosina (Eurofarma Laboratórios S.A.) na forma injetável para controlar a EPS em animais experimentalmente inoculados. Foram utilizados 60 animais, de cinco semanas de idade, com peso médio de 9,5Kg, divididos em dois grupos experimentais de 30 suínos, medicados e não medicados. Todos os animais foram desafiados com *L. intracellularis* no dia zero. Avaliações clínicas de escore fecal, escore corporal e comportamento foram realizadas diariamente além da pesagem dos animais realizada nos dias -2, 13 e 21 após a inoculação. Os animais do grupo medicado receberam tilosina injetável 13 dias após a inoculação em três doses com intervalo de 12 horas cada e os animais do grupo não medicado receberam solução salina injetável com o mesmo protocolo. O grupo não medicado apresentou 23 animais com diarreia antes do dia 13 e 17 após este período. No grupo medicado, 26 animais apresentaram diarreia no período inicial e apenas 11 após a medicação a partir do dia 13. Os animais medicados apresentaram extensão de lesão macroscópica de espessamento de mucosa intestinal estatisticamente menor em comparação com o outro grupo ($p=0,031$). Houve também diferença estatística na imunomarcação para *L. intracellularis* no grupo medicado ($p<0,032$), mostrando maior grau de infecção por *L. intracellularis* nos animais não medicados. Estes resultados demonstram que a Tilosina injetável (Eurofarma Laboratórios S.A.) (1mL/20Kg) em três doses, a cada 12 horas, foi eficaz no tratamento da enteropatia proliferativa suína em animais experimentalmente inoculados através da diminuição da extensão de lesão e do nível de infecção por *L. intracellularis*.

Palavras-chave: macrolídeos, antimicrobianos, *Lawsonia intracellularis*, metafilático, diarreia.

ABSTRACT

Porcine proliferative enteropathy (PPE) is one of the most common enteric diseases in growing and finishing pigs. PPE is characterized by reduced performance, accompanied or not by diarrhea. PPE is highly prevalent in several countries of America, Europe and Asia, causing high economic losses in pig herds. The most common form of PPE control in pig herds is antibiotic therapy. The most used antimicrobials for PPE control are tylosin, chlortetracycline and tiamulin. The objective of this study was to evaluate a new product based on tylosin (Eurofarma Laboratorio S.A.) in injectable form to control PPE in experimentally inoculated animals. Sixty 5-week-old pigs with a mean weight of 9.5 kg were divided into two experimental groups of 30 animals, medicated and non-medicated. All animals were challenged with *L. intracellularis*, the etiologic agent of PPE, on day zero. Fecal score, body condition score and behavior were daily evaluated. Pigs were weighted on days -2, 13 and 21 after inoculation. Pigs of the medicated group received injectable tylosin 13 days after inoculation, in three doses with a 12-hour interval from each other. Pigs in non-medicated group received injectable saline solution using the same protocol. The non-medicated group had 23 animals with diarrhea before day 13. After day 13 the number of diarrheic animals reduced to 17 animals. In the medicated group, 26 animals had diarrhea in the initial period and after medication on day 13, only 11 animals were observed with diarrhea. The score of macroscopic intestinal PPE lesions in the medicated group was lower than in the non-medicated group ($p = 0.031$). The medicated group also had higher score for *L. intracellularis* antigen by immunohistochemistry compared to the non-medicated group ($p = 0.032$) demonstrating higher level of infection. These results demonstrate that injectable tylosin (Eurofarma Laboratories S.A.) (1mL / 20Kg) administrated in three doses, every 12 hours, was effective for the control of porcine proliferative enteropathy in experimentally inoculated pigs.

Key words: macrolides, antimicrobial, *Lawsonia intracellularis*, metaphylactic, diarrhea.

1. Introdução

A enteropatia proliferativa suína (EPS), também conhecida como ileíte, é uma das causas mais frequentes de quadros entéricos em suínos de recria e terminação (Guedes, 2008). É uma doença entérica infecto-contagiosa que acomete principalmente suínos, mas também equinos (Gabardo et al, 2015), cães (Silva et al, 2015), e outras espécies.

É caracterizada na forma aguda por diarreia hemorrágica e espessamento da mucosa intestinal com coágulos no lúmen intestinal, e acomete principalmente animais de recria e terminação e adultos jovens de reposição (Lawson e Gebhart, 2000). A forma crônica é caracterizada por espessamento irregular da mucosa intestinal, edema de mesentério, diarreia transitória, redução no desempenho dos animais, desuniformidade de lote e acomete animais de crescimento e terminação (Guedes, 2012).

A soroprevalência de EPS em rebanhos Australianos foi de 100% e 84,2% nos animais avaliados (Holyoake et al., 2010). No Japão aproximadamente 94% dos rebanhos foram positivos de acordo com McOrist (2005). No Brasil existem poucos estudos avaliando a prevalência da *L. intracellularis* nos rebanhos (Guedes, 2008). Resende et al (2015) mostraram que a prevalência de *L. intracellularis* nos rebanhos do estado de Minas Gerais era de 100%, acometendo 34,66% dos suínos avaliados.

De grande importância na indústria suinícola, a EPS causa muitos prejuízos econômicos devido a diarreia, aumento da mortalidade, diminuição no desempenho dos animais e gastos com medicamentos chegando a um custo anual de 20 milhões de dólares nos EUA em decorrência da EPS (McOrist, 2005). A medida de controle da EPS mais frequentemente adotada é a utilização de antimicrobianos na forma injetável, na ração ou na água, de maneira preventiva ou terapêutica. Os antimicrobianos mais eficientes para tratar EPS são os macrolídeos, tetraciclínas, lincosamidas e pleuromutilinas (França & Guedes, 2008). Dentre estes, os mais utilizados são a tilosina, clortetraciclina e tiamulina (Burch, 2000). Tilosina é um macrolídeo, que inibe a síntese protéica bacteriana (Kim et al, 2008) e atua como bacteriostático e podendo também atuar como bactericida quando em altas concentrações (Barcellos et al, 2012).

McOrist e colaboradores (1997) mostraram que o fosfato de tilosina na ração é eficaz na prevenção e tratamento da EPS. Em outro estudo com inoculação experimental de *L. intracellularis* em 114 suínos foi mostrada a eficácia da Tilosina aplicada de forma injetável, duas vezes ao dia, por três dias consecutivos, pois os animais apresentaram melhora nos sinais clínicos, eliminação da bactéria nas fezes, melhora no desempenho e redução de lesões macro e microscópicas (Marsteller et al, 2001).

2. Objetivo

Avaliar a eficácia do princípio ativo tilosina na forma injetável em novo produto (Eurofarma Laboratórios S.A) em animais experimentalmente inoculados com *Lawsonia intracellularis*.

3. Revisão de literatura

3.1. Etiologia e epidemiologia

O agente causador da enteropatia proliferativa (EP) é a *Lawsonia intracellularis*, bacilo Gram negativo, microaerófilo, móvel, com formato curvo que se multiplica no interior de enterócitos. É uma bactéria intracelular obrigatória, por isto necessita de cultivos celulares para seu crescimento *in vitro* (Lawson et al, 1993).

Animais susceptíveis se infectam por via oral-fecal (Lawson e Gebhart, 2000). A dose mínima infectante ainda não é muito bem determinada (Guedes, 2008) mas sabe-se que animais inoculados com a dose de 10^3 organismos de *L. intracellularis* foram capazes de eliminar bactérias nas fezes (Collins et al, 2001). Além disso, animais infectados podem eliminar até 10^8 organismos de *L. intracellularis* por grama de fezes (Smith e McOrist, 1997). A bactéria pode sobreviver por até 14 dias em temperatura ambiente (Collins et al, 2000). *L. intracellularis* foi detectada nas fezes já na primeira semana após a inoculação e, posteriormente, foi detectada de forma intermitente por até 12 semanas (Guedes e Gebhart, 2003b). O pico de excreção da bactéria ocorre entre 14 e 28 dias pós inoculação (Smith e McOrist, 1997). Baseado nestes dados, conclui-se que a *L. intracellularis* é um agente que pode ser eliminado nas fezes em grandes quantidades, por um longo período, sobreviver no meio ambiente por um bom tempo e ser infectante em doses não muito elevadas.

A EP já foi relatada em cães (Collins et al, 1983; Silva et al, 2015), equinos (Williams et al, 1996; Gabardo et al, 2015), macaco (Klein et al, 1999), camundongos e ratazanas (Friedman et al, 2008), gambás, coiotes, lebres (Pusterla et al, 2008) e frangos (Otha et al, 2016).

Vannucci et al. (2012a) realizaram estudo inoculando suínos com cepa de *L. intracellularis* isolada de equino e inoculando equinos com cepa isolada de suíno. O estudo mostrou que tanto equinos como suínos não apresentaram sinais clínicos nem comprometimento no desempenho, o que sugere uma certa espécie-especificidade de cepas de *L. intracellularis*. Gabardo (2015) mostrou que camundongos podem se infectar com *L. intracellularis* e eliminar o agente nas fezes em quantidade suficiente para infectar suínos, ou seja, são hospedeiros e fonte de infecção.

3.1.1. Prevalência

No Brasil existem poucos estudos sobre a prevalência de *L. intracellularis* (Guedes, 2008). Em 1999, Moreno et al observaram 40,5% dos rebanhos positivos em um total de 148 granjas avaliadas por PCR. Amostras de 109 rebanhos suínos de Minas Gerais analisadas por imunofluorescência indireta mostraram 96,33% de positividade para *L. intracellularis* (Ristow et al, 2001). Em outro estudo mais recente em Minas Gerais (Resende et al, 2015) foi observada prevalência de 100% em 30 rebanhos de suínos comerciais, de 160 a 1950 matrizes, avaliados por imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC).

França e colaboradores (2008) relataram um surto de EP hemorrágica em suínos provenientes de três cidades do estado do Rio de Janeiro. Há outros estudos que mostraram prevalência baixa de EP em rebanhos de Rio Grande do Sul (3%) (Faccini et al, 2005) e Mato Grosso (16,87%) (Alberton et al, 2011). A baixa prevalência observada nesses dois últimos estudos pode ser explicada devido à técnica utilizada ter sido a PCR, que detecta DNA bacteriano apenas quando o animal está eliminando o agente nas fezes e a baixa sensibilidade da técnica.

Vários outros estudos fora do Brasil demonstram elevada prevalência da doença. No Canadá, em Alberta, a EP foi a segunda doença entérica mais diagnosticada (Wilson et al, 2000). Na mesma região foi encontrada prevalência de 91,7% em rebanhos de ciclo completo (Paradis et al, 2007). Nos EUA foram encontradas prevalências de 66,9% e 48,9% nos rebanhos de recria/terminação e reprodução, respectivamente (Bronvoort et al, 2001). Outro estudo realizado nos EUA observou 75% e 78% de prevalência em rebanhos de terminação e reprodução, respectivamente (Marsteller et al, 2003).

Em 2000, na Dinamarca, 93,7% dos rebanhos foram positivos para *L. intracellularis* em amostras de fezes de suínos (Stege et al, 2000). Na Alemanha foram encontrados 33,7% dos rebanhos avaliados soropositivos (Wendt et al, 2004). Kukushkin e Okovytya (2012) encontraram 86,5% de positividade nas propriedades da Rússia. A prevalência na Irlanda e Reino Unido também foi alta, 94,9%, em trabalho realizado por Mortimer e colaboradores (2000).

A Austrália apresentou prevalência de 100% nas propriedades (Holyoake et al, 2010). A Ásia apresenta grande parte dos países positivos para *L. intracellularis*. No Japão 94% dos rebanhos são positivos (McOrist, 2005) enquanto na China a prevalência foi de 57% (Wu et al, 2014).

3.2. Impactos econômicos

Os custos associados a EP variam de acordo com o quadro clínico, antimicrobianos usados no tratamento e a incidência da infecção (Holyoake, 1996). Estima-se que a EP leve diretamente a perda de 3 a 11 dólares por suíno nos EUA, valor atribuído a gastos com alimentação e tempo a mais para o peso de abate (Bronsvooort et al, 2001).

Holyoake e colaboradores (1996) avaliaram os custos da EP na Austrália e chegaram a valor de 141 dólares e 15 dólares australianos por porca por ano em casos hemorrágicos e não-hemorrágicos, respectivamente, sendo os custos associados a morbidade, mortalidade e antibióticos utilizados. McOrist et al (1997) avaliaram as perdas econômicas baseado em peso ao abate, conversão alimentar, utilização de espaço, morbidade e mortalidade, chegando a um custo de 0,50 a 1 dólar por animal afetado pela EP. Na Ásia foi estimada uma perda de até 1 dólar americano para cada animal de crescimento ou terminação afetado por EP (McOrist, 2005).

Nos anos 80 e 90 estudos calcularam uma perda de 25 dólares por porca na Austrália (Cutler & Gardner, 1989), 3 a 6,5 milhões de dólares no Reino Unido (McOrist et al, 1997) e 20 milhões de dólares nos EUA (Mapother et al, 1987; Kroll et al, 2005).

3.3. Patogênese

Para o crescimento *in vitro* da bactéria são usadas linhagens celulares intestinais de rato e semelhante a fibroblasto de camundongo, IEC-18 e McCoy, respectivamente (Guedes, 2002). Outro elemento importante para o crescimento de *L. intracellularis* é o uso de níveis de gases semelhantes aos encontrados no intestino e estufas com oxigênio reduzido e nitrogênio elevado (Lawson et al, 1993; McOrist et al, 1995a).

Em um estudo *in vitro* foi demonstrado que 10 minutos após a infecção a bactéria já se encontrava em íntimo contato com a membrana celular. Uma hora após infecção a bactéria foi encontrada em vacúolos no citoplasma e três horas após a bactéria era encontrada livremente no citoplasma das células infectadas (McOrist, 1995).

A principal lesão causada pela *L. intracellularis* é o espessamento da mucosa intestinal devido a hiperplasia de enterócitos imaturos (Smith e McOrist, 1997), diretamente relacionada à presença da bactéria, ou seja, enterócitos hiperplásicos apresentam a bactéria no citoplasma. Mas tal mecanismo indutor de hiperplasia não é muito bem conhecido (Lawson e Gebhart, 2000).

Boutrup e colaboradores (2010), em estudo com leitões, demonstraram que 12 horas após a inoculação a bactéria foi encontrada aderida em enterócitos do jejuno, íleo, duodeno e cólon. A

bactéria tem tropismo pelo íleo, mas tal preferência não tem uma explicação muito clara. Uma possível causa seria o trânsito intestinal mais lento, favorecendo maior tempo de exposição do epitélio intestinal com a bactéria. Esses resultados foram ratificados por Guedes e colaboradores (2017) que encontraram lesões microscópicas e macroscópicas típicas de enterite proliferativa aos 11 e 15 dias após a inoculação, respectivamente. Como Boutrup et al (2010), as lesões ocorreram principalmente no íleo, mas também acometeram ceco, cólon e até o duodeno. Foi observada diarreia do dia 9 ao dia 28 após a inoculação.

Riber et al (2011) mostraram que animais previamente infectados não se infectam novamente e nem eliminam a bactéria.

3.4. Caracterização da doença

A EP acomete suínos de 6 a 16 semanas de idade e se apresenta de duas formas clínicas diferentes, aguda (hemorrágica) ou crônica. A forma aguda acomete principalmente animais de engorda e reposição, com alta mortalidade e morbidade (Resende, 2015). É caracterizada clinicamente por diarreia hemorrágica. Macroscopicamente há edema e hiperemia de mesentério, espessamento da mucosa intestinal com conteúdo hemorrágico e fibrinoso no lúmen (Figura 1) (França & Guedes, 2008).



Figura 1: Intestino delgado, enteropatia proliferativa hemorrágica. Mucosa apresenta-se difusamente espessada com sangue e coágulos no lúmen intestinal. Fonte: Sílvia de Araújo França, Tese mestrado, 2007.

A forma crônica, mais prevalente, é caracterizada por diarreia transitória, redução no desempenho dos animais, desuniformidade de lote e acomete animais de crescimento e terminação. Alguns animais apresentam apenas desempenho reduzido, sem diarreia evidente. Macroscopicamente, pode ser observado o espessamento irregular da mucosa intestinal e edema de mesentério (Figura 2) (Guedes, 2012). Na histopatologia as duas formas se assemelham: há aumento de volume das criptas intestinais, com proliferação de células epiteliais imaturas (enterócitos) e diminuição de células caliciformes (Lawson & Gebhart, 2000). O íleo é a porção

intestinal mais frequentemente acometida, porém a EP pode ser encontrada do duodeno ao reto (Lawson e McOrist, 1993; Guedes et al, 2017).



Figura 2: Intestino delgado, enteropatia proliferativa crônica. Mucosa apresenta-se difusamente espessada, com pregueamento e hiperemia difusa. Fonte: arquivo pessoal.

3.5. Diagnóstico

O diagnóstico da EP pode ser feito *ante-mortem* através de sorologia, PCR e detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis* em fluido oral. A sorologia, utilizada para detectar imunoglobulinas específicas produzidas pelo hospedeiro quando há uma infecção, pode ser realizada por três testes: imunofluorescência indireta de anticorpos (IFA), imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMC) e teste de ELISA (Kit ELISA de bloqueio, Enterisol Ileitis, BioScreen, Germany) (Resende et al, 2015) (Figura 3). Anticorpos IgG anti *L. intracellularis* são detectáveis entre 14 dias e 3 meses após a infecção (Guedes et al, 2002). Utilizada principalmente para entender a dinâmica de infecção do rebanho, a sorologia facilita a tomada de medidas preventivas como vacinação e antibioticoterapia (Marsteller et al, 2003; Resende et al, 2015). Já a técnica de imunoperoxidase em monocamada de células usando o fluido oral de suínos como amostra clínica, otimizada por Gabardo (2015), apresentou moderada sensibilidade e alta especificidade para detecção de IgA e IgG anti-*L. intracellularis*.

A técnica de PCR é bastante específica (97%) (Jensen et al, 1997), possui a limitação de apenas detectar o DNA bacteriano quando o animal está eliminando o agente. Apesar de ter limitações quanto a sensibilidade devido a inibidores da ação da enzima polimerase existentes nas fezes (Guedes, 2002; França, 2007) existem métodos de extração de DNA de fezes que diminuem esta interferência.

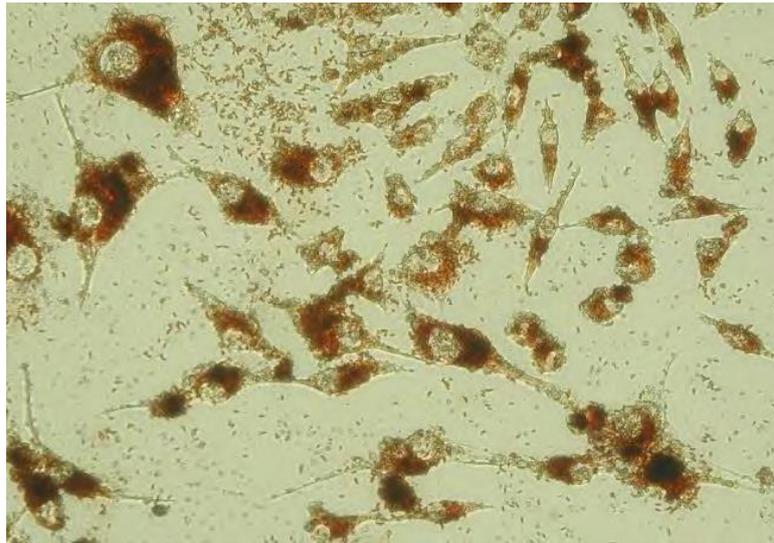


Figura 3: Amostra de soro de suíno positiva para anticorpos anti-*L. intracellularis*. Bactérias marcadas em vermelho no citoplasma e entre as células McCoy infectadas *in vitro* após a realização de imunoperoxidase em monocamada de células. (Microscópio óptico, objetiva de 40X). Fonte: Prof. Roberto Guedes via Talita P. Resende, Tese mestrado, 2015.

Para o diagnóstico *post-mortem* existem vários métodos como: histopatologia em lâminas coradas por hematoxilina e eosina, coloração especial pela prata (Warthin Starry), imuno-histoquímica (Figura 4), hibridização *in situ* fluorescente e PCR de raspado de mucosa. A coloração pela prata mostra as bactérias curvas no interior das células epiteliais intestinais. Jensen et al (1997) compararam três técnicas diagnósticas, imuno-histoquímica, Warthin Starry e PCR de mucosa intestinal, e encontraram especificidades de 98%, 97% e 95%, respectivamente. A técnica de imuno-histoquímica foi a mais específica entre as técnicas histológicas (Guedes et al, 2002). Ladining e colaboradores (2009) mostraram especificidade de 99% e sensibilidade de 66% na imuno-histoquímica para *L. intracellularis*.

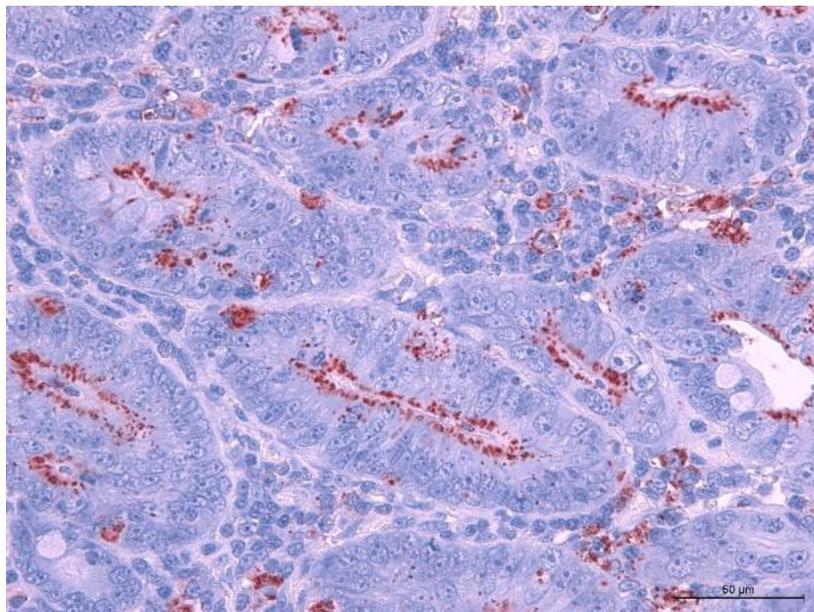


Figura 4: Corte histológico de íleo corado pela imuno-histoquímica utilizando anticorpo contra *Lawsonia intracellularis* (PAb 1999 - Guedes & Gebhart, 2003a). Imunomarcacão em vermelho no citoplasma de enterócitos das criptas intestinais e de macrófagos na lâmina própria. Microscópio óptico, objetiva de 40x.

O diagnóstico da *L. intracellularis* através do isolamento não é factível pois a bactéria é intracelular obrigatória e microaerófila, necessitando de cultivo celular e ambiente específico para seu crescimento (Lawson et al, 1993; Vannucci et al, 2012b) o que dura por volta de 3-4 meses.

3.6. Tratamento e controle

Além das medidas de manejo, muito importantes no controle e prevenção da EPS, existe uma vacina comercial viva modificada, Enterisol Ileitis, que mostrou bons resultados no desenvolvimento de imunidade contra *L. intracellularis* (Guedes & Gebhart, 2003b), melhora na taxa de mortalidade, conversão alimentar e ganho de peso (McOrist & Smits, 2006), porém a vacina tem um custo muito alto e possui a desvantagem de ter uma janela sem medicação para aplicação, difícil em granjas com outras doenças endêmicas (Holoyake et al, 2009). O uso de antimicrobianos que também tem sido muito eficiente contra infecções pela *L. intracellularis* (França & Guedes, 2008).

O uso de antimicrobianos para tratar a EPS deve ser considerado principalmente em duas situações: em animais com a forma crônica, onde há impacto no desempenho dos animais; e em casos agudos para diminuir a mortalidade do rebanho e evitar que a doença ocorra em outros lotes (Lawson & Gebhart, 2000; França, 2007).

3.6.1. Antimicrobianos

A classificação de antimicrobianos se baseia na interação *in vitro* do produto com as bactérias, subdividindo-se em bactericidas e bacteriostáticos. Medicamentos bactericidas são aqueles capazes de reduzir a população bacteriana em até 3 logs em um período de 24 horas, por isto são preferidos no tratamento de infecções graves (Karriker et. al., 2012). Antimicrobianos bacteriostáticos induzem reduções inferiores a esse valor, no mesmo período.

O uso de antimicrobianos é classificado em quatro formas: terapêutica, metafilática, profilática e aditiva (Barcellos et al., 2012). Em doses baixas na ração, os antimicrobianos atuam como promotores de crescimento (aditivos), melhorando a eficiência alimentar. Em doses médias ou altas são utilizados antes do aparecimento de quadros clínicos principalmente na prevenção de doenças (profilática) e nas doses mais altas são usados de forma terapêutica para tratamento de animais enfermos (Cromwell, 2002). O uso metafilático é a utilização de medicação em doses terapêuticas em todo um lote de animais, quando as doenças começam a se manifestar em um percentual pequeno de animais (Barcellos et al., 2012).

Os antimicrobianos são utilizados na suinocultura principalmente via ração, via água ou injetável (IM), sendo as duas primeiras mais comuns. A medicação via ração e via água são menos trabalhosas e exigem menos mão-de-obra, porém, a maioria dos animais doentes apresentam apatia e anorexia, interferindo na ingestão de alimentos e, em alguns casos também na ingestão de água, comprometendo assim a assimilação dos medicamentos (Barcellos et al., 2009).

Medicações injetáveis intramusculares, aplicadas geralmente na região lateral do pescoço, para evitar que possíveis lesões musculares atinjam músculos de cortes nobres, por exemplo, o pernil, possuem a vantagem de permitir a absorção completa do medicamento, garantindo que o animal receba toda a dose necessária (Karriker et. al., 2012).

3.6.2. Antimicrobianos eficientes para EPS

Para saber se o antimicrobiano é eficaz, avalia-se a diminuição de extensão e severidade das lesões intestinais, melhora no desempenho e diminuição na eliminação do agente nas fezes (Walter et al, 2001; França, 2007). Um antimicrobiano eficiente contra *L. intracellularis* necessita chegar ao local de ação, interior de enterócitos, de forma ativa e em concentração adequada (McOrist et al, 1995b).

Os antimicrobianos mais eficazes no tratamento da EP são macrolídeos, tetraciclina, lincosamidas e pleuromutilinas (França & Guedes, 2008). Dentre estas bases medicamentosas os mais utilizados no controle da EPS são a tilosina, clortetraciclina e tiamulina (Burch, 2000). A tilosina é um macrolídeo, que atua inibindo a síntese protéica bacteriana (Kim et al, 2008), funcionando como bacteriostático e podendo atuar como bactericida quando em altas concentrações. Tem período de carência curto (2 dias) quando administrada de forma terapêutica (Barcellos et al, 2012), característica desejada uma vez que a doença também atinge animais de terminação que logo chegarão ao abate. Outra característica positiva dos macrolídeos é a lipossolubilidade que permite atravessar barreiras celulares e, conseqüentemente, chegar ao agente alvo mais facilmente auxiliando a eficácia do tratamento (Spinosa et al, 2002).

Em um estudo com inoculação experimental de *L. intracellularis* em 110 suínos foi demonstrada a eficácia da Tilosina injetável aplicada duas vezes ao dia, por três dias consecutivos, para o tratamento da EPS, pois os animais apresentaram melhora nos sinais clínicos, eliminação da bactéria nas fezes, melhora no desempenho e redução de lesões macro e microscópicas (Marsteller et al, 2001). McOrist e colaboradores (1997) utilizaram o fosfato de tilosina na ração de suínos experimentalmente inoculados com *L. intracellularis* e mostraram eficácia na prevenção e tratamento da EPS. Outro estudo avaliou o uso da Tilosina na ração (100ppm) por 14 dias consecutivos em duas granjas com ocorrência de EPS, onde foi demonstrada a redução da infecção por *L. intracellularis* (Lee et al, 2001).

4. Materiais e métodos

4.1. Animais e instalações

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo nº 250/2015. Foram utilizados 60 leitões machos, de cinco semanas de idade e peso médio de 9,5Kg. Os animais eram provenientes de uma granja livre de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis, *Pasteurella multocida* toxigênica e Herpesvirus suíno tipo I (vírus da doença de Aujeszky).

Os animais foram identificados com brincos na orelha e alojados em dez baias de creche, com piso suspenso de plástico vazado (1,4x1,4m – densidade 0,33m²/animal), com aquecimento artificial, bebedouro tipo chupeta, comedouro tipo depósito e uma bandeja de aço inox abaixo do comedouro para coleta de desperdício de ração (Figura 5). Os animais receberam ração inicial 1 sem medicação, de fabricação própria, e água à vontade durante todo o experimento.



Figura 5: Instalações da unidade experimental de suínos da Escola de Veterinária da UFMG. Quatro baias em cada sala, com cocho tipo depósito, bebedouro tipo chupeta e bandejas de inox para coleta de desperdício.

4.2. *Delineamento experimental*

Os 60 leitões foram divididos em dois grupos experimentais, com 30 leitões por grupo, distribuídos em 5 baias com 6 leitões por baia. Os grupos foram balanceados por peso: muito leve, moderadamente leve, médio, moderadamente pesado e muito pesado. Dois dias antes da inoculação (dia -2), os leitões foram pesados e as fezes foram coletadas para realização do teste de PCR para *L. intracellularis* (Jones et al, 1993) para confirmação da negatividade de todos os animais antes da inoculação.

4.3. *Produção de inóculo*

Fragmentos de intestino delgado de suínos naturalmente infectados com lesões típicas de enteropatia proliferativa foram submetidos a avaliação bacteriológica para descartar a presença de outros patógenos. A presença de infecção moderada a acentuada foi confirmada através de hematoxilina & eosina e imuno-histoquímica. Os fragmentos de intestinos selecionados foram congelados a -80°C até o dia da inoculação.

No dia da inoculação os intestinos, protegidos por sacos plásticos, foram descongelados em água corrente à temperatura ambiente, seccionados longitudinalmente com tesoura e feita a raspagem da mucosa com lâminas de vidro. O material produzido na raspagem foi homogeneizado e misturado com solução de SPG (sacarose-potássio-glutamato) (1:1) (Guedes & França, 2008; Guedes et al, 2009). O produto final também foi submetido à exame bacteriológico para assegurar ausência de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* enterotoxigênica com teste de genes.

A quantificação do inóculo foi feita por diluições seriadas em PBS (pH 7,2) e coloração por imunoperoxidase usando anticorpo policlonal leporino de acordo com Guedes et al (2009).

4.4. Inoculação

No dia 0, todos os animais foram inoculados individualmente, via intragástrica, com 43 mL de inóculo de homogeneizado de mucosa intestinal de suínos sabidamente infectados por *L. intracellularis*, como descrito por Guedes et al (2002). Cada animal recebeu cerca de $1,6 \times 10^7$ organismos de *L. intracellularis*, valor calculado pela quantificação citada no item 4.2.

4.5. Avaliação clínica e de desempenho

Avaliações clínicas individuais de todos os animais foram realizadas diariamente pela mesma pessoa, desde o dia -2 até o fim do experimento. Os parâmetros observados foram comportamento, escore corporal e grau de diarreia (grau 0 = sem diarreia, grau 1 = fezes pastosas, grau 2 = fezes líquidas, grau 3 = fezes com sangue).

Diariamente também foi coletado, nas bandejas de inox localizadas abaixo dos cochos o desperdício de ração e realizada a avaliação de consumo real de ração por baia. Esses dados foram divididos em dois períodos, antes e após o tratamento. Todos os animais foram pesados individualmente nos dias -2, 13 e 21.

4.6. Medicação injetável

No dia 13 após a inoculação, quando pelo menos 25% dos animais apresentaram diarreia causada por *L. intracellularis*, todos os leitões foram pesados para realizar o cálculo da dose individual do medicamento. No mesmo dia, o grupo medicado foi tratado com tilosina injetável (Tilosina 20%, Eurofarma Laboratórios S.A.), 1mL/20Kg p.v., e o grupo controle recebeu volume proporcional ao peso vivo de salina estéril, via intramuscular, em três doses, em intervalo de 12 horas, por determinação do fabricante (Figura 6).

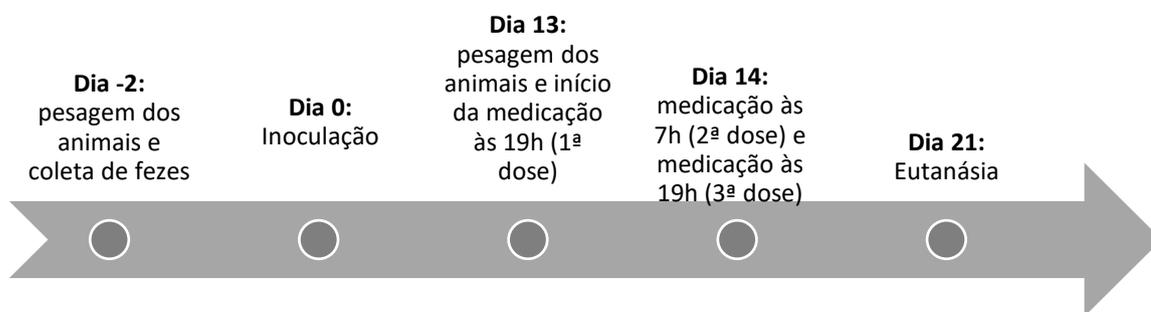


Figura 6: Linha do tempo mostrando a fase experimental. **Dia -2:** animais foram pesados e coletadas fezes individuais. **Dia 0:** inoculação dos 60 animais, com 43mL de inóculo contendo $1,6 \times 10^7$ bactérias. **Dia 13:** pesagem dos animais para cálculo da dose de medicamento e início da medicação às 19h (1ª dose). **Dia 14:** 2ª dose de medicação às 7h e 3ª dose de medicação às 19h. **Dia 21:** eutanásia dos 60 animais, por eletrocussão seguida de sangria.

4.7. Avaliação post-mortem

Por determinação do fabricante (Eurofarma Laboratórios, S.A.) os animais deveriam ser abatidos no mínimo 7 dias após a medicação. E, baseado na presença de lesões intestinais

encontrada entre os dias 15 e 24 após a inoculação (Guedes et al, 2017), foi definido que os animais seriam eutanasiados no dia 21 após a inoculação.

Os animais foram eutanasiados por eletrocussão, seguida de sangria. As lesões intestinais macroscópicas compatíveis com EPS foram graduadas e mensuradas individualmente, de acordo com o escore a seguir: Grau 0 = mucosa normal; grau 1 = hiperemia e espessamento da mucosa; grau 2 = espessamento e necrose da mucosa; grau 3 = espessamento de mucosa e hemorragia com formação de coágulos intraluminais (Guedes et al., 2002). Apenas um patologista, que desconhecia a distribuição de animais por grupo, realizou a avaliação macroscópica de presença e extensão de lesões.

4.8. Imuno-histoquímica

Para avaliação imuno-histoquímica, fragmentos de íleo, ceco, cólon proximal e linfonodo mesentérico foram fixados em formalina 10% (Guedes & Gebhart, 2003a), processadas rotineiramente para histologia, embebidas em parafina e cortadas em 3 μ . Os fragmentos intestinais foram corados pela imuno-histoquímica usando o método de Streptavidina marcada (Dako - Vila Real Carpinteria, EUA, K675) e anticorpo policlonal leporino contra *L. intracellularis* (Guedes & Gebhart, 2003a).

A imunomarcção foi quantificada da seguinte maneira: grau 0 = ausência de imunomarcção para *L. intracellularis*; grau 1 = imunomarcção para *L. intracellularis* em até 25% das criptas intestinais; grau 2 = em até 50% das criptas; grau 3 = em até 75% das criptas e grau 4 = 100% das criptas marcadas. Apenas uma pessoa realizou a quantificação da imunomarcção.

4.9. Análise estatística

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para comparar a frequência de leitões com diarreia entre os grupos controle e medicado no período pós-tratamento e a frequência de leitões com lesões intestinais de acordo com a macroscopia e grau de infecção baseado na marcação por imuno-histoquímica. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar o peso médio dos grupos nos dias -2, 13 e 21 do experimento, e também para comparar o ganho de peso diário entre os grupos nos períodos dos dias -2 a 13 e dias 14 a 21. A regressão de Poisson foi utilizada para comparar o número de dias com diarreia entre os grupos no período pós-tratamento. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar o consumo médio diário entre os grupos nos períodos pré-tratamento (dias 0 a 13) e pós-tratamento (dias 14 a 20). A regressão binomial foi utilizada para comparar os dados de extensão de lesão macroscópica intestinal entre os dois grupos.

5. Resultados

As amostras de fezes coletadas antes da inoculação (dia -2) foram todas negativas para a presença de DNA de *L. intracellularis* pela técnica de PCR. Os resultados bacteriológicos do inóculo confirmaram negatividade para *Salmonella* sp. e *E. coli* enterotoxigênica.

5.1. Avaliação clínica

Um total de 27 animais (45%), independente do grupo, apresentaram diarreia aquosa e amarelada nos primeiros 4 dias após a inoculação. Como o período era muito curto após a inoculação para que a diarreia fosse resultado da infecção por *L. intracellularis*, suspeitou-se de infecção por *Escherichia coli* enterotoxigênica. Amostras de fezes foram coletadas para bacteriologia e foi realizado isolamento de *E. coli* beta-hemolítica, positiva para os genes *Stx* e

Stb. A partir destes resultados, foi adicionado óxido de zinco na ração de todos os animais (3.000ppm) por 3 dias.

A partir do dia 6, o número de animais apresentando diarreia associada à *E. coli* começou a diminuir até o dia 9, quando começou a aparecer diarreia pastosa compatível com *L. intracellularis*. No dia 12 do experimento, 19 dos 60 leitões apresentavam diarreia, sendo 10 (33,3%) leitões diarreicos no grupo não medicado e 9 (30%) no grupo medicado, atingindo o mínimo esperado de 25% de animais com diarreia para que o tratamento fosse iniciado.

Após o tratamento, que ocorreu nos dias 13 e 14, as avaliações clínicas continuaram a ser realizadas da mesma forma. Observou-se redução gradativa de diarreia nos dois grupos, ocorrendo uma redução maior no grupo medicado. O grupo não medicado apresentou 23 animais com diarreia no período anterior ao 13º dia e após este período 17 animais apresentaram diarreia, enquanto que no grupo medicado, 26 animais apresentavam diarreia no período inicial e após a medicação apenas 11. A figura 8 representa o percentual de animais que apresentou diarreia antes e após o tratamento nos grupos medicado e não medicado. Estes resultados foram baseados no período antes da medicação (dia 1 ao dia 13) e após o tratamento (dia 14 ao dia 21) (Figura 7).

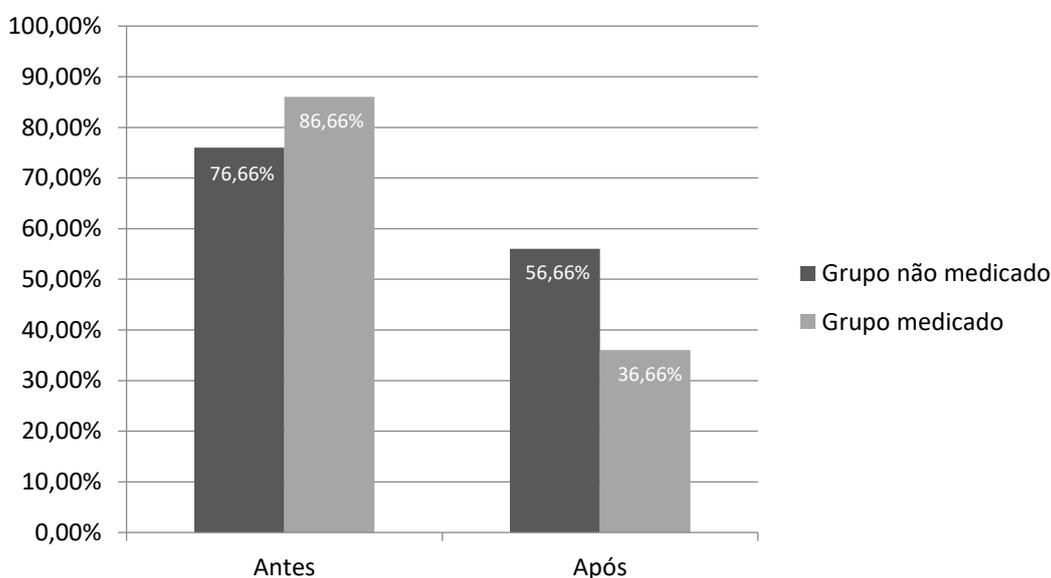


Figura 7: Percentual de animais acometidos com diarreia nos grupos medicado e não medicado, nos períodos anterior (dia 1 a 13) e posterior ao tratamento (dia 14 a 21). Teste Qui-quadrado.

A avaliação clínica diária também permitiu registrar o grau de diarreia de cada animal em todos os dias do experimento. Não houve diferença estatística, mas pode-se observar redução no número de animais com diarreia e no grau de diarreia após o dia 13, quando foi aplicada medicação, indicando redução na gravidade do quadro clínico e melhora dos animais (Figura 8).

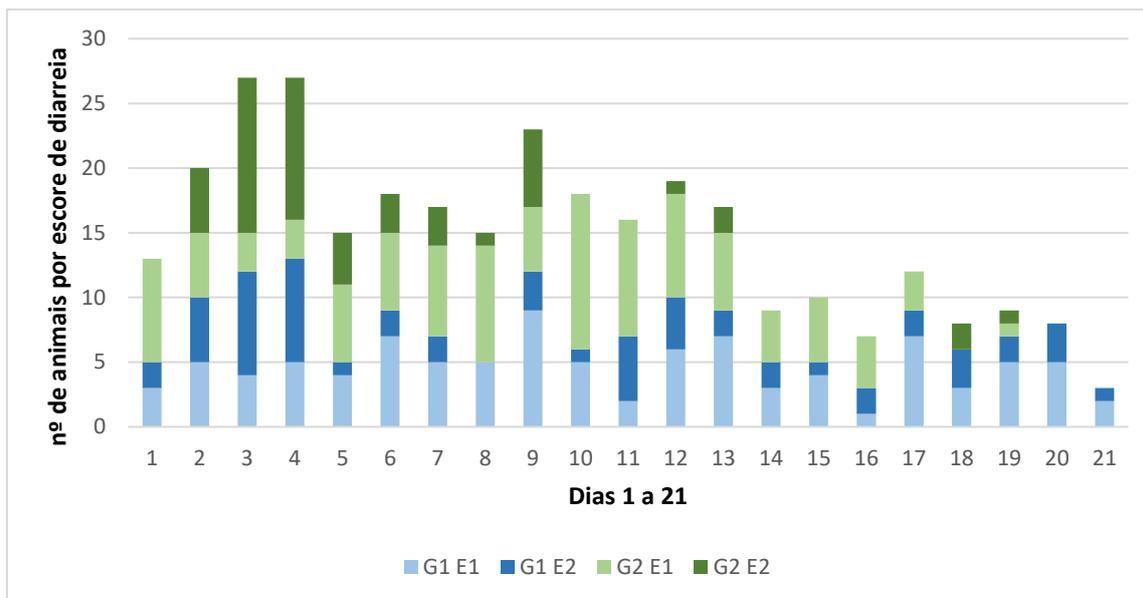


Figura 8: Número de animais em cada grupo com diarreias grau 1 e 2, dos dias 01 ao 21. **G1E1:** grupo 1, não medicado, com diarreia escore 1 (azul claro). **G1E2:** grupo 1, não medicado, com diarreia escore 2 (azul escuro). **G2E1:** grupo 2, medicado, com diarreia escore 1 (verde claro). **G2E2:** grupo 2, medicado, com diarreia escore 2 (verde escuro).

A partir da análise de regressão de Poisson foi possível observar diferença estatística ($p=0,001$) entre os dois grupos em relação a soma do número de animais com diarreia e sem diarreia nos dias do período pós-tratamento (Tabela 1). Animais no grupo medicado apresentaram, em média, 1 dia (0,85 dias) a menos de diarreia que aqueles do grupo não medicado.

Tabela 1: Total de dias com e sem diarreia de todos os animais do grupo controle e medicado no período pós-tratamento. Regressão de Poisson.

Grupos	Dias com diarreia	Dias sem diarreia	Total
Controle	49	191	240
Medicado	20	220	240
P	0,001		

Ao final do experimento, cinco animais não medicados estavam magros, mostrando desuniformidade do grupo.

No dia 18 do experimento, um dos animais do grupo medicado foi encontrado morto. O animal não apresentou nenhum sinal clínico antes do óbito. A causa mortis foi definida à necropsia como tendo sido causada por septicemia provocada por endocardite valvular mitral e o animal não apresentou lesão macroscópica de enteropatia proliferativa. Os dados de ganho de peso desse animal foram considerados até dia 18, e o cálculo final foi ajustado até o final do experimento.

5.2. Desempenho

Apesar dos animais do grupo medicado apresentarem peso médio 730 gramas maior que os animais do grupo controle, 21 dias após a inoculação, não houve diferença significativa entre os grupos em relação às variáveis de peso médio, ganho médio de peso e consumo (Tabela 2).

Tabela 2: Peso médio e ganho de peso diário (GPD) dos grupos não medicado e medicado em diferentes períodos, até o dia da eutanásia (D21).

Grupo	Peso (Kg) Dia-2	Peso (Kg) Dia 13	GPD (Kg) Dias -2 a 13	Peso (Kg) Dia 21	GPD (Kg) Dias -2 a 21	GPD (KG) Dias 14 a 21
Medicado	9,48 ± 1,062	13,53 ± 2,582	0,27 ± 0,14025	16,51 ± 3,244	0,37 ± 0,13072	0,37 ± 0,1302
Controle	9,49 ± 1,100	13,32 ± 2,331	0,26 ± 0,12059	15,78 ± 3,318	0,31 ± 0,17610	0,30 ± 0,1761
P	0,879	0,705	0,723	0,842	0,359	0,108

No período pós medicação foi observado consumo médio diário de ração de 41 gramas superior no grupo medicado em comparação com o grupo controle, porém a diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação de consumo médio diário (CMD) por animal entre os grupos controle e medicado nos períodos total (dias 0-20), pré-tratamento (dias 0-13) e pós-tratamento (dias 14-20). Mann-Whitney.

	Grupos	N	CMD	Desvio Padrão	Valor de P
Dias 0-20	Controle	30	0,60	0,06	0,84
	Medicado	30	0,63	0,13	
Dias 0-13	Controle	30	0,48	0,05	1,0
	Medicado	30	0,48	0,10	
Dias 14-20	Controle	30	0,76	0,09	0,34
	Medicado	29	0,80	0,15	

5.3. Lesões macroscópicas

À necropsia, foram observadas lesões típicas de EPS de grau 1 no íleo (Figura 9) em 16 leitões, sendo a quantidade numericamente maior no grupo controle (10 leitões) quando comparado com o grupo medicado (6 leitões) ($P > 0,05$). As lesões encontradas foram de espessamento discreto de mucosa intestinal no íleo, com hiperemia discreta e a extensão de lesão por cada animal variou de 6cm a 65cm.



Figura 9: Lesão macroscópica observada à necropsia, grau 1, espessamento de mucosa intestinal.

A extensão da área total de lesões observadas nos animais não medicados (366 cm de lesão intestinal) foi maior quando comparado com os animais do grupo medicado (97 cm de lesão intestinal) ($p=0,031$). A média de extensão de lesão por leitão afetado no grupo medicado foi de 16,16 cm e no grupo controle foi de 36,6cm. A média de extensão da lesão pelo total de animais no grupo medicado foi de 3,2cm e no grupo controle foi de 12,2cm (Tabela 4).

Tabela 4: Intensidade de lesões macroscópicas e média de extensão de lesões, em cm, por animais afetados dos grupos não medicado e medicado. Qui-quadrado.

Grupos	Grau 0*	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Número de animais com lesão	Extensão lesão total (cm)	Média de extensão da lesão/leitão afetado (cm)	Média extensão da lesão/total leitões (cm)
Controle	20	10	0	0	10	366	36,3	12,2
Medicado	24	6	0	0	6	97	16,16	3,2
P						0,031	0,093	0,151

*Grau 0 = normal; grau 1 = espessamento da mucosa; grau 2 = espessamento e necrose da mucosa; grau 3 = espessamento de mucosa e hemorragia com formação de coágulos intraluminais.

5.4. Imuno-histoquímica

Houve diferença ($P=0,032$) na imunomarcagem observada entre os grupos, estando presente em 16 animais do grupo controle (53,3%) e em 8 animais do grupo medicado (26,6%). Todas as marcações observadas foram observadas no íleo e classificadas como grau 1 (até 25% das criptas infectadas) (Figura 10).

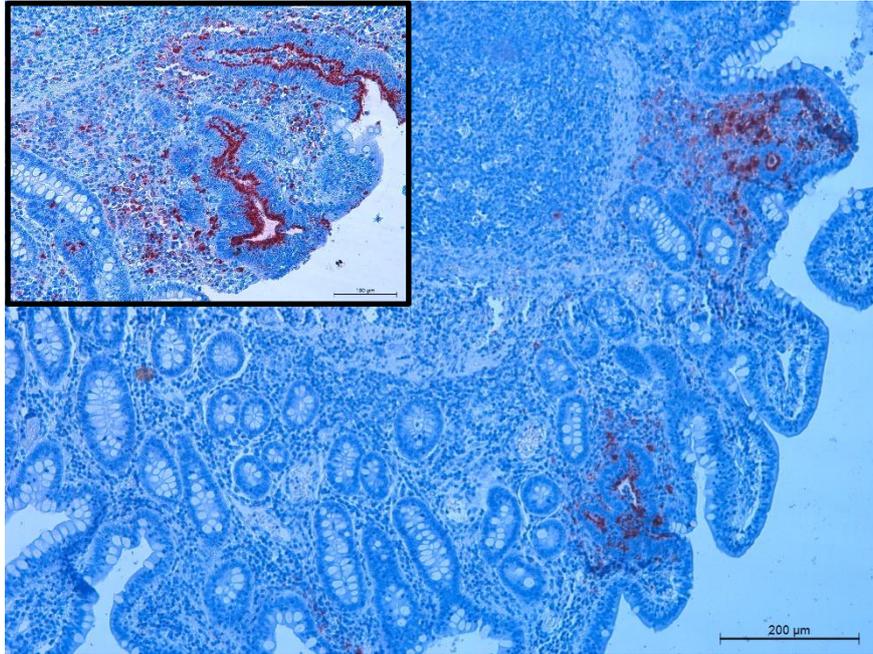


Figura 10: **A:** Corte histológico de íleo corado pela imuno-histoquímica utilizando anticorpo contra *Lawsonia intracellularis* (PAb 1999 - Guedes & Gebhart, 2003a). Grau 1 de imunomarcção, em até 25% das criptas. Animal 37, grupo controle, objetiva de 10x. **B:** Corte histológico de íleo corado pela imuno-histoquímica utilizando anticorpo contra *Lawsonia intracellularis* (PAb 1999 - Guedes & Gebhart, 2003), animal 8, grupo controle, objetiva de 20x.

6. Discussão

De acordo com os sinais clínicos, as lesões macroscópicas e a imuno-marcção para *L. intracellularis* observados nos animais do grupo controle pode-se afirmar que o modelo de inoculação experimental foi eficiente na reprodução da doença. Outro modelo de inoculação experimental é feito com cultura pura de *L. intracellularis*, método que permite maior controle bacteriano do inoculo e acurácia na quantificação da dose, porém, extrair e manter a bactéria *in vitro* é muito difícil pois necessita de cultivo celular, ambiente específico, leva tempo e é mais caro (Guedes e Gebhart, 2003b).

Apesar da presença de diarreia nos primeiros dias após inoculação causada por *E. coli* enterotoxigênica, a maior incidência de diarreia a partir do dia 9 até o dia 12 após a inoculação condiz com outros experimentos que utilizaram modelo de infecção experimental semelhante de *L. intracellularis* (Paradis et al, 2004). Não existem estudos que demonstrem a ação do óxido de zinco, utilizado nos primeiros dias após a inoculação para conter a diarreia causada por *E. coli* enterotoxigênica, que avaliem clinicamente animais infectados com *L. intracellularis*. Sabe-se que o produto utilizado foi testado com a vacina Enterisol Ileitis, viva modificada, e não apresentou influência sobre as bactérias, de acordo com informações do fabricante.

Embora os resultados de desempenho sejam numericamente diferentes entre os grupos, não houve diferença estatística significativa, o que pode ser justificado pelo elevado coeficiente de variação dessas variáveis analisadas (Veenhuizen et al, 1998). Este alto coeficiente de variação sugere que a variável ganho de peso necessite de maior número amostral para ser melhor avaliada, como visto por Paradis e colaboradores (2005), onde usaram 144 animais em inoculação experimental de *L. intracellularis*.

Lesões macroscópicas foram mais frequentemente observadas nos animais do grupo controle, que apresentaram extensão total de lesão superior ao grupo medicado ($p < 0,05$). As lesões encontradas no dia da eutanásia (dia 21 pós inoculação) condizem com outro estudo no qual a maior parte das lesões macroscópicas foi encontrada entre os dias 15 e 24 (Guedes et al, 2017).

Os animais do grupo medicado apresentaram menor imunomarcagem no fígado ($p < 0,032$) em comparação com os animais do grupo não medicado, mostrando que a presença de antígeno da *L. intracellularis* foi mais frequente nos animais não medicados. A imuno-histoquímica é uma técnica de alta sensibilidade para o diagnóstico de *L. intracellularis* (Guedes et al, 2002), um estudo mostrou especificidade de 66% e sensibilidade de 99% (Ladining et al, 2009). Achados semelhantes também foram observados por Marsteller et al (2001) utilizando tilosina injetável, em outra apresentação e formulação, em suínos experimentalmente inoculados.

A tilosina é um macrolídeo, bacteriostático que pode atuar como bactericida quando em altas concentrações (Kim et al, 2008). Os macrolídeos se ligam a subunidade (50s) do ribossomo bacteriano inibindo a síntese proteica bacteriana (Barcellos et al, 2012). Outra característica dos macrolídeos é a lipossolubilidade que permite atravessar barreiras celulares e chegar ao agente alvo mais facilmente e, no caso da *L. intracellularis*, por ser uma bactéria intracelular obrigatória, esta propriedade auxilia na eficácia do tratamento (Spinosa et al, 2002).

Apesar de apresentar valores de concentração mínima inibitória (MIC) elevada *in vitro*, ou seja, ação pouco eficiente contra EP em estudo *in vitro* (McOrist et al, 1995b), a tilosina mostrou-se eficaz quando administrada na ração por 14 dias (100ppm) para tratar a doença em inoculação experimental de cultura pura (McOrist et al, 1997). A tilosina também teve resultado satisfatório em outro estudo onde foi utilizada de forma injetável duas vezes ao dia, por três dias consecutivos, para o tratamento da EPS, onde os animais apresentaram melhora nos sinais clínicos e redução de lesões macroscópicas (Marsteller et al, 2001), como mostrado também no presente estudo. A diferença em resultados *in vivo* e *in vitro* pode ser justificada pelo fato de a *L. intracellularis* ser uma bactéria intracelular obrigatória (McOrist et al, 2000).

Antibioticoterapia metafílática ou terapêutica são as mais indicadas pois o uso de antimicrobianos em posologia e tempo inadequados, como promotor de crescimento, pode aumentar a chance de surtos de doenças entéricas (Bane et al, 2001), além de favorecer o risco de resistência bacteriana (Dosen et al, 2014). Segundo Silbergeld e colaboradores (2008), o uso de antimicrobianos como aditivos em ração na produção animal pode ser um fator no aumento de resistência em patógenos humanos. A administração de medicação via ração foi mais associada ao aumento do risco de resistência bacteriana quando comparado ao tratamento individual (Dunlop et al, 1998; Haese & Silva, 2004). O uso adequado dos antibióticos, como o utilizado neste estudo, pode ajudar a reverter a frequência de alta resistência bacteriana e também evitar o surgimento de novas bactérias resistentes (Levy & Marshall, 2004).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos na ração em doses baixas está associada a resistência bacteriana (Maron et al, 2013). Alguns estudos realizados nos EUA mostram que para preservar a eficiência de antibióticos para tratamentos humanos e animais é necessário restringir o uso de antimicrobianos (Levy & Marshall, 2004; Silbergeld et al, 2008). Em função disto, muitos países restringiram o uso de antibióticos como promotores de crescimento (Maron et al, 2013). A União Europeia proibiu o uso de antimicrobianos promotores de crescimento na alimentação de suínos em 2006 (Gaggia et al, 2010) e nos EUA em 2017 foi aprovado novo regulamento do uso de antibióticos na ração (Beek, 2017).

A apresentação da medicação como forma injetável, utilizada no presente estudo, é mais vantajosa pois permite absorção completa do medicamento, garantindo que o animal receba toda a dose necessária (Karriker et al., 2012). Medicação intramuscular possui outra vantagem quando comparada à medicação na ração pois animais doentes têm menor ingestão de alimento (Apley et al. 2012). É certo que em animais maiores a aplicação intramuscular é mais

trabalhosa, mas vem crescendo cada vez mais as formulações de ação prolongada, que não precisam ser aplicadas mais de uma vez (Burch, 2012).

Animais com infecção por *L. intracellularis*, apresentam atrofia e fusão de vilosidades, com redução de enzimas digestivas e inibição de transportadores de membrana, mecanismos que levam à diarreia por má absorção (Argenzio, 1992; Vannucci & Guedes, 2009), o que sugere poder resultar em baixa absorção do antimicrobiano quando administrado via oral.

A maioria dos antimicrobianos administrados na ração proporciona níveis plasmáticos baixos do medicamento em comparação com os injetáveis, principalmente os macrolídeos e as pleuromutilinas, o que também reduz a biodisponibilidade. Em estudo realizado por Prats et al (2002) foi mostrada alta biodisponibilidade da tilosina, indicando alta absorção. Para a eficácia do tratamento, o medicamento deve estar no local da infecção por tempo e concentração suficientes, caso contrário poderá favorecer o desenvolvimento de resistência bacteriana (Burch, 2012).

A terapia medicamentosa no início do curso de qualquer enfermidade é fundamental para garantir o bem-estar animal e o desempenho do grupo (Marsteller et al, 2001), fatores que melhoram os índices produtivos na granja.

7. Conclusão

A tilosina (Eurofarma Laboratórios S.A) injetável, nas condições do presente estudo, foi eficiente no controle da enteropatia proliferativa suína em leitões experimentalmente infectados pois reduziu significativamente a extensão de lesão e o nível de infecção por *L. intracellularis*.

8. Referências

- 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 (1), p.1-4, 2011.
- APLEY, M. D.; BUSH, E. J.; MORRISON, R. B.; SINGER, R. S.; SNELSON, H. Use estimates of In-feed antimicrobials in swine production in the United States. *Foodborne pathogens and Disease*, v.9 (3), p. 1-8, 2012.
- ARGENZIO, R.A. Pathophysiology of diarrhea. In: ANDERSON, N.V. Veterinary gastroenterology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap.10, p.163-172.
- BANE, D.P.; NEUMANN, E.; GEBHART, C.J. et al. Porcine proliferative enteropathy: a case-control study in swine herds in the United States. *Journal Swine Health Production*. v.9 (4), p.155-158, 2001.
- BARCELLOS, D.; SOBESTIANSKY, J.; LINHARES, D.; SOBESTIANSKY, T. B. Uso de antimicrobianos. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. *Doenças dos suínos*. 2ª ed. Goiânia - GO: Cãnone, 2012. p. 839-845.

- BARCELLOS, D. E. S. N.; MARQUES, B. M. F. P. P.; MORES, T. J.; COELHO, C. F.; BOROSWSKI, S M. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae*. p. 151-155, 2009.
- BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. *Clínica Veterinária* 7ª edição, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.
- BOUTRUP, T. S.; BOESEN, H. T.; BOYE, M.; AGERHOLM, J. S.; JENSEN, T. K. Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Journal Comparative Pathology*. v. 143, p. 101-109, 2010.
- BRONSVOORT, M.; NORBY, B.; BANE, D.P. et al. Management factors associated with seropositivity to *Lawsonia intracellularis* in US swine herds. *Journal Swine Health and Production*, v.9, p.285-290, 2001.
- BURCH, D. G. S. Examination of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships of orally administered antimicrobials and their correlation with the therapy of various bacterial and Mycoplasmal infections in pigs. *Royal College of Veterinary Surgeons*, p. 1-130, 2012.
- BURCH, D. G. S. Controlling ileitis in the “colitis” complex. *Pig Journal*. v. 45, p. 131-149, 2000.
- COLLINS, A. M.; LOVE, R. J.; POZO, J. et al. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. *Swine Health Production*, v. 8, p.211-215, 2000.
- COLLINS, A.M.; DJIK, M.V.; VU, N.Q. et al. Immunity to *Lawsonia intracellularis*. Proceedings Allen D. Lemman Conf, v.28, p.115-120, 2001.
- COLLINS, J.E., LIBAL, M.C. e BROST, D. Proliferative enteritis in two pups. *Journal American Veterinary Medical Association*. v.183, p.886-889, 1983.
- CROMWELL, G. L. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*. v. 13 (1), p. 7-27, 2002.
- CUTLER, R.; GARDNER, I. A Blueprint for Pig Health Research. *Australian Pig Research Council Publication*, 1989.
- DOSEN, R.; PRODANOV-RADULOVIC, J.; PUSIC, I.; RATAJAC, R.; STOJANOV, I.; GRUBAC, S. The uncontrolled use of antibiotics in pig production – a Threat to public health. *XVI International Symposium “Feed Technology”*. p. 20-24, 2014.
- DUNLOP, R. H.; McEWEN, S. A.; MEEK, A. H.; CLARKE, R. C.; BLACK, W. D.; FRIENDSHIP, R. M. Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*. v. 34. p. 283-305. 1998.
- FACCINI, G.S.; GUEDES, R.M.C.; PESCADOR, C.A. et al. Diagnóstico histoquímico e imuno-histoquímico da enteropatia proliferativa (*Lawsonia intracellularis*) em suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.57, p.569-575, 2005.
- FRANÇA, S. A. Aspectos epidemiológicos e terapêuticos da enteropatia proliferativa suína. Tese. p. 60. 2007.

FRANÇA, S. A.; GUEDES, R. M. C. Antimicrobianos para o controle da enteropatia proliferativa suína. *Ciência Rural*, v. 38 (1), p. 288-296, 2008.

FRANÇA, T. N.; RIBEIRO, C. T.; BEZERRA, P. S.; DOBEREINER, J.; CERQUEIRA, V. D.; PEIXOTO, P. V. Surto de enteropatia proliferativa hemorrágica (*Lawsonia intracellularis*) em suínos no Estado do Rio de Janeiro. *Revista pesquisa veterinária brasileira*. v. 28(3). p. 174-182. 2008.

FRIEDMAN, M.; BEDNA, V.; KLIMES, J. et al. *Lawsonia intracellularis* in rodents from pig farms with the occurrence of porcine proliferative enteropathy. *Journal Society Applied Microbiology journal.*, v.47, p.117-121, 2008.

GABARDO, M. P. *Lawsonia intracellularis*: estudo da transmissão interespecies e da utilização do fluido oral na detecção de imunoglobulinas. Tese. p. 92. 2015.

GABARDO, M. P.; SATO, J. P. H.; RESENDE, T. P.; GUEDES, R. M. C. Equine proliferative enteropathy on a Brazilian farm. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35 (5), p. 443-447, 2015.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. v. 141, p. 1-14, 2010.

GUEDES, R. M. C.; MACHUCA, M. A.; QUIROGA, M. A.; PEREIRA, C. E. R.; RESENDE, T. P.; GEBHART, C. J. *Lawsonia intracellularis* in pigs: Progression of Lesions and involvement of Apoptosis. *Veterinary Pathology*, p. 1-9, 2017.

GUEDES, R. M. C. Cap: Bacterioses: Enteropatia proliferativa suína. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. *Doenças dos suínos*. 2ª ed. Goiânia - GO: Cãnone, 2012. p. 159-167.

GUEDES, R. M. C.; FRANÇA, S. A.; GUEDES, R. M. C.; MACHADO, G. S.; BLUMER, M. A.; DA COSTA CRUZ, E. C.. Use of tylvalosin-medicated feed to control porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Record*, v. 165, p. 342-345, 2009.

GUEDES, R.M.C. Infecção por *Lawsonia intracellularis*: um problema recorrente na suinocultura do Brasil. *Acta Scientiae Veterinary*, v.36, p.77-s80, 2008.

GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Veterinary diagnostic Investigation*, 15(5), p. 438-446, 2003a.

GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Veterinary Microbiology*, v. 93, p. 159-166, 2003b.

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J.; ARMBRUSTER, G. A.; ROGGOW, B. D. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. v. 66, p. 258-263, 2002.

GUEDES, R. M. C. Porcine proliferative enteropathy: diagnosis, immune response and pathogenesis. St. Paul: University of Minnesota, 2002. p. 261. (Tese doutorado).

HAESE, D.; SILVA, B. A. N. Antibióticos como promotores de crescimento em monogástricos. *Revista eletrônica Nutritime*, v.1 (1), p. 07-19. 2004.

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

HOLYOAKE, P.K.; MULLAN, B.P.; CUTLER, R.S. Simulation of the economic impact of proliferative enteritis on pig production in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v.73, p.89-92, 1996.

JENSEN, T. K., MOLLER, K., LESER, T. D.; JORSAL, S. E. Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy. *European Journal of Veterinary Pathology* v. 3, p. 115–123, 1997.

JONES, G.F.; WARD, G.E.; MURTAUGH, M.P. et al. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, Ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v31, n10, p.2611-2615, 1993.

KARRIKER, L. A.; COETZEE, J.; FRIENDSHIP, R. M.; PRESCOTT, J. F. Drug pharmacology, therapy and prophylaxis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. *Diseases of Swine*. 10^a ed. Iowa: John Wiley e Sons Ltd, 2012. p. 438-443.

KIM, M.; GEBRU, E.; CHANG, Z.; CHOI, J.; HWANG, M.; KANG, E.; LIM, J.; YUN, H.; PARK, S. Comparative Pharmacokinetics of Tylosin of Florfenicol after a single intramuscular administration at two different doses of tylosin-florfenicol combination pigs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 70(1), p. 99-102, 2008.

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

KROLL, J. J.; ROOF, M. B.; HOFFMAN, L. J.; DICKSON, J. S.; HARRIS, D. I. H. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal health research reviews*. v. 6 (2), p. 173-197, 2005.

KUKUSHKIN, S.; OKOVYTAYA, T. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and PCV2 in commercial pig farms in Russia. *Veterinary Record*. 2012.

LADINING, A.; SOMMERFELD-STUR, I.; WEISSENBOCK, H. Comparative evaluation of diagnostic methods for *Lawsonia intracellularis* infection in pigs, with emphasis on cases lacking characteristic lesions. *Journal of Comparative Pathology*, v. 140, p. 140-148, 2009.

LAWSON, G.H.; GEBHART, C.J. Proliferative enteropathy. *Journal of Comparative Pathology*, v.122, n.2-3, p.77–100, 2000.

LAWSON, GHK; McORIST, S. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. *Journal of Comparative Pathology*, v. 108, p. 41-46, 1993.

LAWSON, G.H.; MCORIST, S.; JASNI, S.; et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. *Journal Clinical Microbiology*, v.31, n.5, p.1136–1142, 1993.

LEE, S. W.; KIM, T. J.; PARK, S. Y.; SONG, C. S.; CHANG, H. K.; YEH, J. K.; PARK, H. I.; LEE, J. B. Prevalence of porcine proliferative enteropathy and its control with Tylosin in Korea. *Journal of Veterinary Science*, v. 2(3), p. 209-212, 2001.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature publishing group*. v. 10 (12), p. 122-129, 2004.

- MAPOTHER, M.E., JOENS, L.A.; GLOCK, R.D. Experimental reproduction of porcine proliferative enteritis. *Veterinary Record*. v. 121, p. 533-536, 1987.
- MARON, D. F.; SMITH, T. JS.; NACHMAN, K. E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and health*. v. 9 (48), p. 1-11, 2013.
- 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. *Journal Swine Health and Production*, v.11, p. 127-130, 2003.
- MARSTELLER, T. et al. Efficacy of intramuscular tylosin for the treatment and control of porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Therapeutics*, v 2, n.1, p. 51-60, 2001.
- McORIST, S; SMITS, R. Field evaluations of the ileitis vaccine in Austrália. 20th International Pig Veterinary Society Congress, p. 13-02. 2006.
- McORIST, S. b Prevalence and impact of proliferative enteropathy (ileitis) in East Asia. Proceedings 2nd Asian Pig Vet. Soc. Cong., p.24-37, 2005.
- McORIST, S.; WAGER, A.M.; KRATZER, D.; SJOSTEN, C. G. Therapeutic efficacy of water-soluble lincomycin-spectinomycin powder against porcine proliferative enteropathy in a European field study. *Veterinary Record*, v.146, p.61-65, 2000.
- McORIST, S.; MORGAN, J.; VEENHUIZEN, M. F.; LAWRENCE, K.; KROGER, H. W. Oral administration of tylosin phosphate for treatment and prevention of porcine proliferative enteropathy. *American Journal Veterinary Research*, v.58, n.2, p.136-139, 1997.
- McORIST, S.; GEBHART, C. J.; BOID, R.; BARNES, S. M. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. Nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *International Journal of Sistematic bacteriology*. v. 45 (4), p. 820-825. 1995a.
- McORIST, S.; MACKIE, R.A.; LAWSON, G.H.K. Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.5, p.1314-1317, 1995b.
- 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.
- MORTIMER, I.; GREEN, L.; HODGE, A. Serological prevalence of *Lawsonia intracellularis* across UK and Irish pig herds. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, p. 110, 2000.
- PARADIS, M. A.; GOTTSCHALK, M.; RAJIC, A. et al. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, v.48, p.57-62, 2007.
- PARADIS, M. A.; MCYA, R.I.; WILSON, J. B.; VESSIE, G. H.; WINKELMAN, N. L.; GEBHART, C. J.; DICK, C. P. Subclinical ileitis produced by sequential dilutions of *Lawsonia intracellularis* in a mucosal homogenate challenge model. *American Association of swine veterinarians*, p. 189-191, 2005.

- PARADIS, M. A.; PAULING, G. E.; BRENNAN, J. WINKELMAN, N. L.; BAGG, R. N.; DICK, C. P.; WILSON, J. Evaluation of tylosin tartrate in drinking water for treatment of porcine proliferative enteropathy (ileitis). *Journal of swine health and production*. v. 12 (4), p. 176-181, 2004.
- PRATS, C.; KORCHI, G.; FRANCESCH, R.; ARBOIX, M.; PÉREZ, B. Disposition kinetics of tylosin administered intravenously and intramuscularly to pigs. *Research in Veterinary Science*. v. 73, p. 141-144, 2002.
- 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. *Journal of Wildlife Diseases*, v.44, p.992-998, 2008.
- RESENDE, T. P.; PEREIRA, C. E. R.; GABARDO, M. P.; HADDAD, J. P. A.; LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, R. M. C. Serological profile, seroprevalence and risk factors related to *Lawsonia intracellularis* infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 11, p. 306, 2015.
- RIBER, U.; CORDES, H.; BOUTRUP, T. S.; JENSEN, T. K.; HEEGAARD, P. M. H. Primary infection protects pigs against re-infection with *Lawsonia intracellularis* in experimental challenge studies. *Veterinary Microbiology*. 2011.
- 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 Congresso Brasileiro Vet. Especial. Suínos, p.43-44, 2001.
- SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial Food Animal Production, antimicrobial resistance and human health. *Annual Review of public Health*. v. 29, p. 151-169, 2008.
- SILVA, R. O. S. S.; GABARDO, M. P.; OLIVEIRA, J. S. V.; LOBATO, F. C. F.; GUEDES, R. M. C. Detection of *Lawsonia intracellularis* fecal shedding in dogs in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, 2015.
- SMITH, S. H.; McORIST, S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Research in Veterinary Science*, v. 62, p. 6-10, 1997.
- SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária. Ed. Guanabara Koogan, 3ª edição, Rio de Janeiro, 2002.
- STEGE, H.; JENSEN, T.K.; MØLLER, K. et al. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v.46, p.279-292, 2000.
- VANNUCCI, F.A.; PUSTERLA, N.; MAPES, S.M. et al. Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* infections. *Veterinary Research*, v.43, p.1-9, 2012a.
- VANNUCCI, F.A.; WATTANAPHANSAK, S.; GEBHART, C.J. An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.50, n.3, p.1070-1072, 2012b.
- VANNUCCI, F. A.; GUEDES, R. M. C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. *Ciência Rural*, v.39, n.7, p.2233-2242, 2009.
- VEENHUIZEN, M. F.; MOWREY, D. H.; MOORE, G. M.; WATKINS, L. E. Evaluation a natural outbreak of porcine proliferative enteropathy and treatment with tylosin in the grow-finish phase. *Swine health and production*. v. 6 (2), p. 67- 72, 1998.

VIOTT, A. M. *Prevalência de enteropatógenos em suínos de recria/terminação em Minas Gerais e desenvolvimento de modelo experimental murino de enteropatia proliferativa*. 2010. 71F. Dissertação (doutorado em ciência animal – Patologia Veterinária) - Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

WALTER, D.; KNITTEL, J.; SCHWARTZ, K. et al. Treatment and control of porcine proliferative enteropathy using different tiamulin delivery methods. *Journal Swine Health Production*, v.9, n.3, p.109-115, 2001.

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.

WILLIAMS, N.M., HARRISON, L. R., GEBHART, C. J. Proliferative enteritis in a foal caused by *Lawsonia intracellularis* like bacteria. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.8, p:254-256, 1996.

WU, Z.; LING, Y.; TIAN, D.; PAN, Q.; HEEGAARD, P. M. H.; HE, C. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* antibodies in intensive pig farms in China. *BMC Veterinary Research*. v. 10 (100), p. 1-5, 2014.