

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA  
*in vitro* DE ISOLADOS BRASILEIROS DE  
*Lawsonia intracellularis***

RICARDO PEREIRA LAUB

BELO HORIZONTE  
2018

RICARDO PEREIRA LAUB

**SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE ISOLADOS  
BRASILEIROS DE *Lawsonia intracellularis***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência animal do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes

BELO HORIZONTE  
2018

L366s Laub, Ricardo Pereira, 1989-  
Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados brasileiros de *Lawsonia intracellularis*  
/ Ricardo Pereira Laub. – 2018.  
36 p. : il.

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

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Antimicrobianos – Teses. 3. Patologia veterinária – Teses.  
I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II. Universidade Federal de  
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.


CDD – 636.408 96

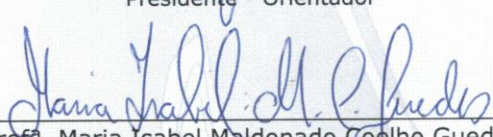
## FOLHA DE APROVAÇÃO

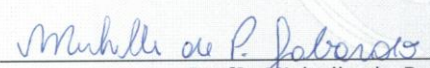
**RICARDO PEREIRA LAUB**

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 19 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes  
Escola de Veterinária - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Michelle de Paula Gabardo  
Instituto Federal de Minas Gerais - IFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse a essa etapa na minha vida.

A meu tio Eduardo Vilela Pereira e ao Sr. Luís Antônio Meirelles Vasconcelos que foram quem me deram as primeiras oportunidades para chegar a esse momento.

Ao professor orientador Roberto Mauricio Carvalho Guedes por ter acreditado na minha capacidade e indicado o melhor caminho a ser percorrido.

Ao Professor Marcos de Almeida Souza que foi a partir das nossas conversas que me despertou o interesse pelo estudo da Sanidade Animal.

A todos os amigos que eu fiz durante esses dois anos em Belo Horizonte, pelo convívio diário, pelas aulas juntos, pelas conversas na cantina, pelas risadas, por pegarem no meu pé, em suma, pela amizade.

As agências de fomento Capes, CNPq e Fapemig pelo suporte financeiro.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 ENTERITE PROLIFERATIVA SUÍNA.....</b>	<b>11</b>
3.1.1 ETIOLOGIA .....	11
3.1.2 ISOLAMENTO E CULTIVO.....	13
3.1.3 EPIDEMIOLOGIA .....	13
3.1.4 SINAIS CLÍNICOS .....	14
3.1.5. PATOLOGIA.....	15
3.1.6 DIAGNÓSTICO .....	17
3.1.7 RESPOSTA IMUNE .....	17
3.1.8 USO DE ANTIMICROBIANOS NO CONTROLE DA EPS .....	18
<b>3.2 ANTIMICROBIANOS.....</b>	<b>19</b>
3.2.2 USO DE ANTIMICROBIANOS NA SUINOCULTURA .....	19
3.2.3 CLASSIFICAÇÃO .....	20
3.2.4 CIPROFLOXACINA.....	20
3.2.5 LINCOMICINA.....	21
3.2.6 TIAMULINA .....	21
<b>3.3. “MIC” PARA <i>Lawsonia intracellularis</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 ISOLADOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 PREPARAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA .....</b>	<b>24</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

µg/mL – Micrograma por mililitro

µL – Microlitro

µm – Micrometro

€ - Símbolo do Euro

DNA – “Deoxyribonucleic acid” (Ácido desoxirribonucleico)

EPS – Enterite proliferativa dos Suínos

GPD – Ganho de peso diário

HIC – “High infected cells” (Células altamente infectadas)

IEC-18 – “Intestinal epithelial cell line” Célula de linhagem intestinal

IFN-γ – Interferon gama

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

*L. intracellularis* – *Lawsonia intracellularis*

mg/kg – Miligrama por quilograma

MIC – “Minimal inhibitory concentration” (Concentração inibitória mínima)

PCR – “Polymerase chain reaction” (Reação em cadeia da polimerase)

PHE – “Proliferative hemorrhagic enteropathy” Enteropatia proliferativa hemorrágica

RNA – “Ribonucleic acid” (Ácido ribonucleico)

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b>	Atividade antimicrobiana de <i>Lawsonia intracellularis</i> obtida a partir de estudos de sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i> anteriores .....	23
<b>Tabela 2.</b>	Concentração inibitória mínima, intra e extra celulares de ciprofloxacina para os dois isolados brasileiros de <i>L. intracellularis</i> .....	26
<b>Tabela 3.</b>	Concentração inibitória mínima, intra e extracelulares de lincomicina para os dois isolados brasileiros de <i>L. intracellularis</i> .....	27
<b>Tabela 4.</b>	Concentração inibitória mínima, intra e extracelulares de tiamulina para os dois isolados brasileiros de <i>L. intracellularis</i> .....	28



---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b>	Micrografia eletrônica de <i>Lawsonia intracellularis</i> em cultura pura. As setas indicam o flagelo unipolar único .....	12
<b>Figura 2.</b>	Leitões de creche experimentalmente inoculados com <i>L. intracellularis</i> . A) Quadro clínico de diarreia causada por <i>Lawsonia intracellularis</i> ; B) Quadro crônico de EPS, mostrando variação de peso entre os animais e baixo desempenho .....	14
<b>Figura 3.</b>	Enteropatia proliferativa suína. Forma crônica. A) Porção de intestino delgado apresentando edema de mesentério próximo à inserção com as alças intestinais lesadas e serosa intestinal com aspecto cerebroide devido à proliferação da mucosa. B) Corte longitudinal de porção de intestino delgado apresentando hiperemia e edema no mesentério próximo à inserção com as alças intestinais, com parede intestinal e mucosa espessadas com restos celulares e necrose multifocal, hiperemia e hemorragia discreta .....	15
<b>Figura 4.</b>	Marrã com PHE. Corrugação e hiperemia de serosa de intestino delgado, espessamento de parede intestinal de jejuno, coágulos e fibrina no lúmen e evidência de pregas da mucosa. Conteúdo vermelho-escuro no intestino grosso .....	16
<b>Figura 5.</b>	Secção de intestino delgado corada em H&E apresentando discreto infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário multifocal na lâmina própria, evidente hiperplasia do epitélio das criptas intestinais associado à atrofia marcante de células caliciformes e abscessos de cripta multifocais .....	16
<b>Figura 6.</b>	Linha do tempo indicando a ordem cronológica para as técnicas de MIC intracelular e extracelular .....	25
<b>Figura 7.</b>	Resultado de MIC intracelular para ciprofloxacina isolado BRPHE01-E5, passagem 23. a) Controle positivo. Observa-se crescimento no interior e fora das células com marcação em vermelho. b) MIC $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ ausência de bactérias no interior das células e fora, não há marcação .....	26
<b>Figura 8.</b>	Resultado de MIC intracelular para lincomicina isolado BRPHE01-E5, passagem 23. a) Controle positivo. Observa-se crescimento no interior e fora das células com marcação em vermelho. b) MIC $\geq 128$ $\mu\text{g/mL}$ presença de bactérias no interior das células e fora, demonstrando crescimento bacteriano .....	27
<b>Figura 9.</b>	Resultado de MIC intracelular para tiamulina isolado BRPHE01-E5, passagem 23. a) Controle positivo. Observa-se crescimento no interior e fora das células com marcação em vermelho. b) MIC $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ ausência de bactérias no interior e fora das células, não houve crescimento bacteriano .....	28

## RESUMO

A Enterite Proliferativa Suína, causada pela bactéria *Lawsonia intracellularis*, é uma doença entérica de distribuição mundial, e de alta prevalência. Os sinais clínicos observados são diarreia, redução na conversão alimentar e no ganho de peso diário. A forma mais efetiva de tratamento é a terapia com antimicrobianos. Portanto, objetivo deste estudo foi determinar a concentração mínima inibitória (MIC) *in vitro* de ciprofloxacina, lincomicina e tiamulina em dois isolados brasileiros de *L. intracellularis*. Como *L. intracellularis* é um microrganismo intracelular obrigatório foi realizada avaliação de concentração inibitória mínima para as atividades extracelular e intracelular. A ciprofloxacina e a tiamulina apresentaram os melhores resultados de atividades extracelulares e intracelulares inibindo o crescimento de ambos os isolados brasileiros de *L. intracellularis*, apesar da ciprofloxacina ter apresentado concentração moderada nas duas duplicatas testadas para o isolado BRPHE02-E8 (variando de  $\geq 8$  e  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ). O mesmo não ocorreu para lincomicina, que apresentou concentrações elevadas ( $\geq 128$   $\mu\text{g/mL}$ ) em todos os testes realizados e para todos os isolados testados. Portanto, os dois isolados brasileiros de *L. intracellularis* testados nesse estudo têm maior sensibilidade *in vitro* a ciprofloxacina e tiamulina que a lincomicina.

Palavras-Chave: MIC, ileíte, suíno, antimicrobianos.

## ABSTRACT

Porcine Proliferative Enteritis, caused by the bacterium *Lawsonia intracellularis*, is an enteric disease with worldwide distribution. Several studies showed high prevalence of the disease worldwide. The clinical signs observed are diarrhea, weight loss, emaciation accompanied by reduction in feed conversion and in daily weight gain. The most effective form of treatment is antimicrobial therapy. Therefore, the objective of this study was to determine the minimum inhibitory concentration *in vitro* of ciprofloxacin, lincomycin and tiamulin against *L. intracellularis* Brazilian isolates. As *L. intracellularis* is an obligate intracellular microorganism, a minimum inhibitory concentration evaluation was performed for extracellular and intracellular activities of the antimicrobials. The extracellular and intracellular activities for ciprofloxacin and tiamulin showed the best results. It was shown that the lower concentrations of the active principles were able to inhibit the growth of the bacterium for both isolates, although the ciprofloxacin presented moderate concentration in the two duplicates tested for the isolate BRPHE02-E8 (varying of  $\geq 8$  and  $\geq 4$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). The same did not occur with lincomycin, which had high concentrations ( $\geq 128$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) in all the tests performed and for all tested isolates. Therefore, the two Brazilian isolates of *L. intracellularis* tested in this study had greater sensitivity to ciprofloxacin and tiamulin when compared to lincomycin.

Keywords: MIC, ileitis, swine, antimicrobial

## 1. INTRODUÇÃO

O panorama da suinocultura nas duas últimas décadas tem mudado muito. Tem-se observado cada vez mais a intensificação dos sistemas de produção e, com isso, o desafio sanitário é cada vez maior devido ao aumento da pressão de infecção e maior estresse. Dessa forma, doenças que até então não se manifestavam no plantel passam a aparecer (Barcellos et al., 2007). Entre os problemas mais comuns nos suínos estão as infecções entéricas (Stegé et al., 2001). Em um estudo sobre frequência de enteropatógenos em suínos de recria e terminação, realizado no estado de Minas Gerais (Viott et al., 2013), demonstrou-se que o agente mais prevalente foi *Lawsonia intracellularis*.

Essa enfermidade afeta animais nas fases de crescimento e terminação (Guedes et al., 2009) e caracteriza-se por causar diarreia, variação de peso entre os animais (McOrist et al., 2000), emaciação acompanhada de redução na conversão alimentar e no ganho de peso diário (Larsen et al., 2016); e em animais de terminação e reprodução podem ocorrer quadro diarreicos hemorrágicos agudos e mortalidade (Collins, 2013). O método de controle da doença mais utilizado é o uso de antimicrobianos (França et al., 2010). Por ser capaz de controlar e impedir a progressão da doença, a terapia com antimicrobianos torna-se geralmente a primeira escolha quando um surto de enterite proliferativa ocorre em um rebanho. Dessa forma, para alcançar o melhor resultado possível, a escolha do melhor antimicrobiano é fundamental, porém informações sobre os resultados de sensibilidade *in vitro* contra *L. intracellularis* ainda são limitadas, tendo sido realizados estudos em outros países, não havendo estudos semelhantes no Brasil. E essa dificuldade ocorre, pois o isolamento de *L. intracellularis* a partir de intestino ou de fezes de animais contaminados é bastante difícil e demorado, o que impossibilita a obtenção de resultados de sensibilidade antimicrobiana para cada rebanho (McOrist et al., 1995; Wattanaphansak et al., 2009).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de ciprofloxacina, lincomicina e tiamulina para os dois isolados brasileiros de *L. intracellularis*.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

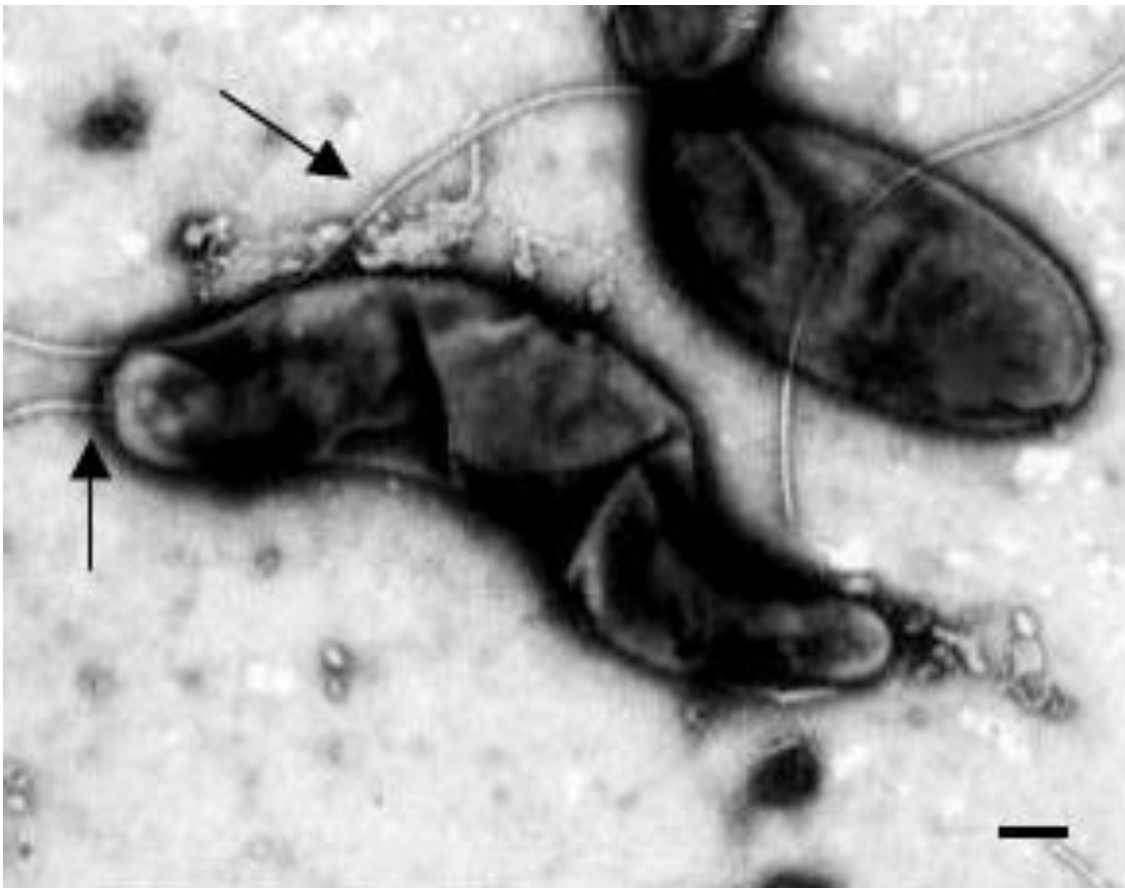
### 3.1 ENTERITE PROLIFERATIVA SUÍNA

#### 3.1.1 ETIOLOGIA

As lesões características da enterite proliferativa foram primeiramente descritas no ano de 1931 por Biester e Schwarte (1931) nos Estados Unidos e denominada adenomatose intestinal. Posteriormente, foi encontrada na maior parte das áreas produtoras de suínos do mundo. Em 1972, Rowland e Rowntree descreveram uma enterite hemorrágica associada a adenomatose intestinal, porém não foi encontrado nenhum agente etiológico associado. Foi só no ano de 1974 que Rowland e Lawson (1975) conseguiram visualizar o agente etiológico por imunofluorescência e microscopia eletrônica, em 1991 Stills e colaboradores (1991) conseguiram isolar o agente em a partir de intestinos de hamsters inoculados experimentalmente, porém foi só em 1993 Lawson e colaboradores (1993) tiveram sucesso no

isolamento do agente etiológico. No mesmo ano, McOrist e colaboradores (1993) conseguiram preencher os requisitos para os postulados de Koch reproduzindo a doença com sucesso em animais suscetíveis e reisolando a bactéria.

Em 1993, Gebhart e colaboradores (1993) fizeram a classificação do agente etiológico da enterite proliferativa. Foi descrito que a bactéria pertencia a classe Proteobacteria da subdivisão delta. Mas foi só com o sequenciamento do DNA, foi possível observar que o agente pertencia a uma nova espécie, da família das desulfovibrionaceas. É uma bactéria fisiológica e morfológicamente diferentes de outras bactérias da mesma família, sendo denominada *Lawsonia intracellularis* (McOrist et al., 1995c). *L. intracellularis* são víbrios, Gram-negativos, microaerófilos, com flagelo unipolar único (Figura 1), que não formam esporos (Kroll et al., 2005). A bactéria mede de 1,25 a 1,75  $\mu\text{m}$  comprimento por 0,25 a 0,43  $\mu\text{m}$  de largura e possui um envelope externo trilaminar (Vannucci e Gebhart, 2014).



**Figura 1:** Micrografia eletrônica de *Lawsonia intracellularis* em cultura pura. As setas indicam o flagelo unipolar único. (Fonte: Prof. Connie Gebhart, UMN)

### 3.1.2 ISOLAMENTO E CULTIVO

O primeiro relato de isolamento da bactéria, foi descrito por Stills e colaboradores (1991), décadas após a primeira descrição da doença. O organismo foi isolado a partir de intestinos de hamsters inoculados experimentalmente com conteúdo fecal de hamsters enfermos. Dois anos depois, Lawson e colaboradores (1993) também foram bem-sucedidos, utilizando uma linhagem de enterócitos de rato (IEC-18) e ambiente de microaerofilia, constituído de 82,2% de nitrogênio, 8,8% de dióxido de carbono e 8% de oxigênio, isolando e propagando a bactéria *in vitro* a partir de intestinos de suínos doentes. Vannucci et al (2012) descreveram um método alternativo de cultivo utilizando células McCoy em bolsas plásticas, sem necessidade de jarras de anaerobiose ou estufas tri-gás.

### 3.1.3 EPIDEMIOLOGIA

A Enterite Proliferativa Suína (EPS), também chamada de ileíte (Guedes et al., 2009), é uma doença entérica de distribuição mundial (McOrist e Gebhart, 2011), com vários estudos demonstrando alta prevalência ao longo dos anos, variando entre 80 e 100% (Aarestrup, 2008; Collins, 2013; Larsen et al., 2016). A doença acomete principalmente leitões em crescimento e terminação entre 6 a 20 semanas de idade, além de adultos jovens e cevados próximo à idade de abate (McOrist et al., 2000). Vários fatores estressantes como movimentação de animais, mudança de ração, temperaturas extremas e falta de higiene são sabidamente predisponentes para a ocorrência da EPS (Bane et al., 2001). A doença já foi descrita em outras espécies animais como o hamsters, coelhos, furões, raposas, cães, ratos, ovinos, cervos, emus, avestruzes, primatas não humanos e cobaios (Vannucci e Gebhart, 2014). A persistência da infecção pode ocorrer por até 10 semanas com excreção de numerosos microrganismos nas fezes (McOrist et al., 2000). A enfermidade nunca foi descrita em humanos, apesar da bactéria já ter sido pesquisada em pacientes com Doença de Chron (Michalski et al., 2006), tão pouco em crianças que habitavam locais próximas à propriedades suinícolas na Europa (Jacobson et al., 2007).

A transmissão é oro-fecal (Collins, 2013). A eliminação da bactéria nas fezes inicia-se a partir da primeira semana da infecção e dura por até 12 semanas, de forma intermitente e coincide com o aparecimento dos sinais clínicos (Guedes e Gebhart, 2003). Animais que se recuperaram naturalmente da doença, deixam de eliminar quantidade detectável do agente nas fezes sendo incapazes de transmitir a doença para animais não infectados (Collins, 2013).

De acordo com Collins (2013), surtos de EPS ocorrem em rebanhos sem infecção prévia, o que sugere que outras fontes de infecção possam estar associadas. É sabido que uma gama de espécies domésticas e silvestres podem se infectar com a bactéria e desenvolver a doença, dessa forma, pássaros, insetos, roedores e suídeos selvagens são considerados prováveis vetores para os suínos domésticos devido à sua proximidade com as granjas. Em um estudo realizado por Gabardo e colaboradores (2017), com o intuito de avaliar o envolvimento do camundongo na epidemiologia da EPS, ficou demonstrado que o camundongo é capaz de transmitir o agente para o suíno e que o contrário também ocorre. Portanto, isso é um indicativo de que os roedores são um importante reservatório de *L. intracellularis* em unidades de produção, bastando poucos gramas de fezes contaminada do roedor para garantir que a transmissão da infecção ocorra.

### 3.1.4 SINAIS CLÍNICOS

Existem três manifestações que ocorrem em casos de infecção por *L. intracellularis*, a adenomatose intestinal suína ou crônica e a enterite proliferativa hemorrágica ou aguda, sendo que a primeira é geralmente observada em animais entre 6 e 20 semanas de idade e a segunda em animais adultos jovens entre 4 a 12 meses de idade (Vannucci e Gebhart 2014). Os sinais clínicos da forma crônica são diarreia pastosa amarelada (Figura 2a) ou acinzentada transitória, variação de peso entre os animais (McOrist et al., 2000), emaciação acompanhada de redução na conversão alimentar e no ganho de peso diário (Figura 2b) (Larsen et al., 2016).

A manifestação aguda ou hemorrágica da EPS é geralmente observada em matrizes e machos com origem de granjas de alto padrão sanitário que são introduzidos em novos sítios de produção, que são eventualmente encontrados mortos sem sinal clínico detectado previamente. Mas com frequência esses animais desenvolvem diarreia sanguinolenta e óbito em dois a cinco dias (Collins, 2013).

A desuniformidade dos lotes, o reduzido ganho de peso diário (GPD) e a diminuição na conversão alimentar na ausência de uma diarreia evidente configuram a forma subclínica ou endêmica da EPS, que é responsável por aumentar significativamente o custo de produção, na época estimados entre €9 a €86 porca/ano (Pommier et al., 2008). Em estudo reproduzindo essa forma da doença observou redução do GPD em 37-42%, e no consumo de ração foi descrito aumento de 27-37% (Pommier et al., 2008). Segundo Collins (2013), a redução no GPD variou de 17-84% e a redução da conversão alimentar em mais de 50%.



**Figura 2:** Leitões de creche experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*. A) Quadro clínico de diarreia causada por *Lawsonia Intracellularis* (Fonte: Dra. Luisa Vianna); B) Quadro crônico de EPS, mostrando variação de peso entre os animais e baixo desempenho (Fonte: Prof. Roberto Guedes, UFMG)

### 3.1.5. PATOLOGIA

Nos animais acometidos pela forma crônica da doença, pode ser observado presença de edema de mesentério na região de inserção com as alças intestinais lesionadas, e a serosa do órgão apresenta aspecto cerebroide, pois se assemelha às circunvoluções cerebrais, e a parede intestinal está espessada e a mucosa apresenta as pregas bastante evidentes, sendo o íleo a região do intestino delgado mais frequentemente afetada, porém as lesões podem ser encontradas isoladas em jejuno, ceco ou cólon. Em animais com lesões mais acentuadas, pode ser observado membrana fibrinonecrótica e em animais com manifestações mais brandas as lesões podem ser pequenas ou nem serem observadas (Figura 3) (Guedes et al., 2016).

Nos casos agudos e hemorrágicos, há um intenso espessamento da mucosa associado a presença de sangue no lúmen ileal (Figura 4). Outras lesões associadas podem ser observadas como: edema do mesentério da porção afetada e efusão intraperitoneal acentuada. O conteúdo luminal contém fluido sanguinolento com a mucosa difusamente hiperêmica e após 12 horas do surgimento dos sinais clínicos, ocorre sobreposto aos coágulos sanguíneos o aparecimento de uma membrana de fibrina e restos de células que recobrem todo o epitélio (Love e Love, 1979).

À histologia, devido a proliferação das células imaturas das criptas intestinais, ocorre diminuição marcante de células caliciformes e presença da bactéria no citoplasma dos enterócitos hiperplásicos (Collins, 2013).

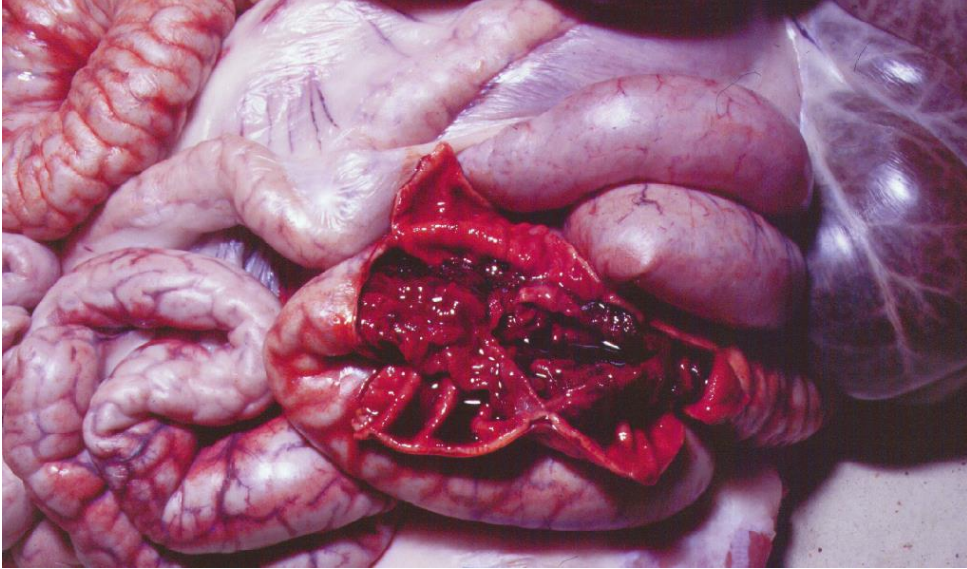
Na histopatologia, pode ocorrer acúmulo acentuado de fluido proteináceo no interstício e no interior de vasos linfáticos da lâmina própria e ápices das vilosidades. Há presença de hemorragia discreta e acentuado infiltrado inflamatório que vai diminuindo substancialmente nas 24 horas seguintes, porém o contrário também ocorre, onde a hemorragia e a hiperemia aumentam excessivamente. Neste ponto, observa-se hemorragia no lúmen ileal e nas criptas há presença de epitélio hiperplásico e pouco diferenciado e diminuição marcante das células caliciformes (Figura 5). A presença das bactérias no citoplasma dos enterócitos na porção apical pode ser visualizada com a coloração de Warthin-Starry, imuno-histoquímica ou hibridização in situ fluorescente, e também no interstício da lamina própria e da submucosa (Love e Love, 1979; Jensen et al., 2010; Collins, 2013).



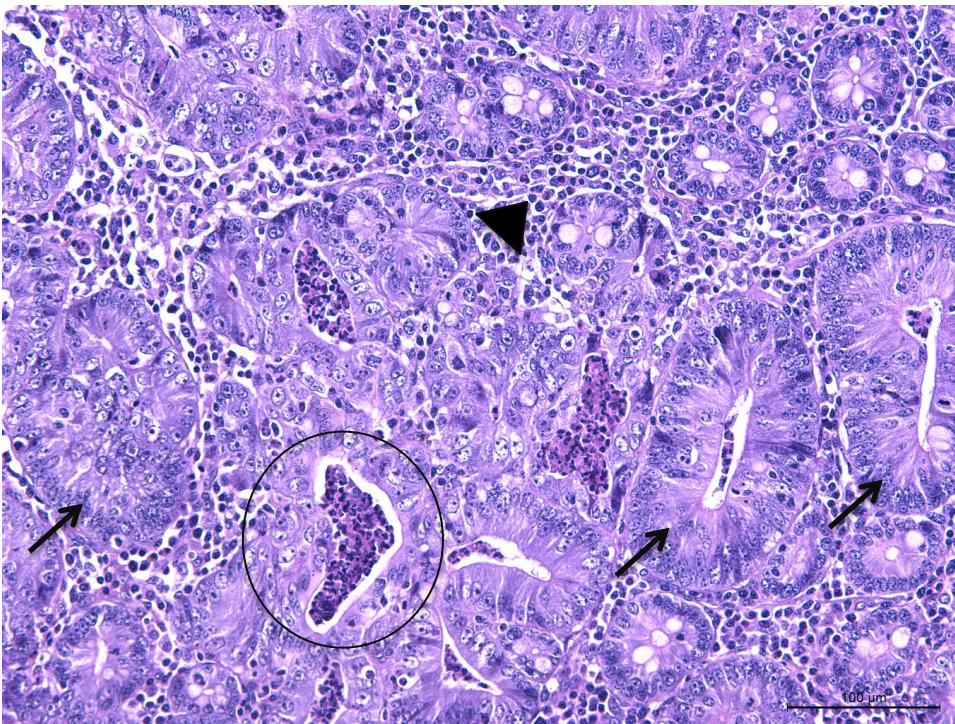
**Figura 3:** Enteropatia proliferativa suína. Forma crônica (arquivo pessoal). A) Porção de intestino delgado apresentando edema de mesentério próximo à inserção com as alças intestinais lesadas e serosa intestinal com aspecto cerebroide devido a proliferação da mucosa. B) Corte longitudinal de porção de intestino delgado apresentando hiperemia e edema no mesentério próximo à inserção com as alças



intestinais, com parede intestinal e mucosa espessadas com restos celulares e necrose multifocal, hiperemia e hemorragia discretas.



**Figura 4:** Marrã com PHE. Corrugação e hiperemia de serosa de intestino delgado, espessamento de parede intestinal de jejuno, coágulos e fibrina no lúmen e evidência de pregas da mucosa. Conteúdo vermelho escuro no intestino grosso (Fonte: Prof. Roberto Guedes, UFMG).



**Figura 5:** Secção de intestino delgado corada em H&E apresentando discreto infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário multifocal na lâmina própria (ponta de seta), evidente hiperplasia do epitélio das criptas intestinais associado a atrofia marcante de células caliciformes (setas) e abscessos de cripta multifocais (circulado). Aumento 40x. (Fonte: Dra. Luísa Vianna)

### 3.1.6 DIAGNÓSTICO

Historicamente, o diagnóstico da EPS tem sido baseado em características clínicas e anatomo-patológicas da infecção. O diagnóstico diferencial inclui a disenteria suína (*Brachyspira hyodysenteriae*), salmonelose e úlceras gástricas (Vannucci e Gebhart, 2014).

O diagnóstico *ante-mortem* da EPS é baseado em identificação molecular de DNA de *L. intracellularis* em fezes dos animais acometidos, pela PCR, ou por detecção de IgG específica para *L. intracellularis* por sorologia. A diferença entre as duas técnicas é que a PCR das fezes indica eliminação do agente no ambiente e, conseqüentemente, infecção ativa, enquanto a sorologia indica exposição prévia ao agente (Vannucci e Gebhart, 2014). Ambas são ferramentas que veterinários e produtores utilizam, pois ajudam identificar fatores de risco com eficácia em tempo real para mensurar os métodos de controle como vacinação, medicação e higiene (Collins, 2013).

O diagnóstico *post-mortem* da EPS é baseado em observação de lesões macroscópicas indicativas da enfermidade associada com as lesões histológicas características. Associado a isso, podem ser utilizadas técnicas histoquímicas como a coloração de Warthin-Starry e a imuno-histoquímica utilizando anticorpos específicos para o agente sendo considerada o padrão ouro para o diagnóstico da EPS (Vannucci e Gebhart, 2014), além da hibridização *in situ* fluorescente (Jensen et al, 2010).

### 3.1.7 RESPOSTA IMUNE

Observações iniciais com relação à resposta imune induzida pela infecção por *L. intracellularis* eram a limitada infiltração inflamatória descrita apenas em animais com a formação das lesões características (Vannucci e Gebhart, 2014), mas foi demonstrado por Guedes e Gebhart (2003) que após exposição experimental com *L. intracellularis* patogênica são detectadas respostas imune humoral e mediada por células. A resposta humoral ocorre por período limitado (entre 2 a 3 meses), e ocorre principalmente na fase inicial com produção de IgM, indicando a fase ativa da doença, seguida pela produção de IgG. A produção de IgA específica pra *L. intracellularis* foi descrita que ocorre apenas em soro de animais infectados (Cordes et al., 2012), sendo detectada em até 3 semanas após inoculação nos animais por lavagem intestinal (Guedes e Gebhart, 2003), mas a IgA não específica já foi detectada próxima a *L. intracellularis* nos enterócitos por imuno-histoquímica (Cordes et al., 2012).

Devido à natureza intracelular do agente a resposta imune mediada por células é considerada importante. Essa resposta ocorre por infiltração de células CD8+ e macrófagos, sendo observada nos intestinos dos animais com EPS. Isso foi descrito por Cordes e colaboradores (2012) em um modelo experimental onde foi mostrado a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T, utilizando a técnica de “ELISA sandwich”, indicando uma importante relação com o controle da patologia. Entretanto em outro estudo realizado por MacIntyre e colaboradores (2003) foi observada redução nos números de células T e B no intestino associados à presença da *L. intracellularis*, sugerindo algum mecanismo imunossupressivo.

### 3.1.8 USO DE ANTIMICROBIANOS NO CONTROLE DA EPS

A venda de antimicrobianos para a indústria suinícola representa 34% da venda total de antibióticos para a produção animal global, estimada em 1,7 bilhões de dólares. A maioria dos tratamentos são para as infecções entéricas (Aarestrup et al., 2008), sendo a via oral a mais amplamente utilizada no seu controle (Larsen et al., 2016).

As penicilinas são os antibióticos mais utilizados em terapias em massa de população em suínos (van Hout et al., 2016), porém as tetraciclina, tiamulina, valnemulina, tilvalosina e a tilosina seriam os antimicrobianos mais efetivos no controle da EPS, baseados em experiências clínicas (Aarestrup et al., 2008). McOrist et al. (2000) avaliaram a eficácia do tratamento com lincomicina e espectinomicina via água de bebida, onde dois grupos foram tratados com a droga em concentrações diferentes (21 e 42 ppm), ambos por sete e 14 dias. Ocorreu melhora na consistência das fezes e em ganho de peso e os animais pararam de eliminar a bactéria pelas fezes em ambos grupos medicados. Foi concluído então que o tratamento da EPS com lincomicina e espectinomicina, na concentração, dose, e períodos recomendados foi efetivo para o controle da EPS. Os dados também sugeriram que o tratamento por sete dias foi tão eficaz quanto o de 14 dias (McOrist et al., 2000).

Na Dinamarca, o princípio ativo mais utilizado nos animais para o tratamento das desordens gastrointestinais tem sido as do grupo das tetraciclina. Baseado nisso, foi realizado estudo para avaliar a eficácia da oxitetraciclina na água de bebida para tratar a EPS. O intuito do experimento foi avaliar a eficácia do princípio ativo na eliminação de *L. intracellularis* nas fezes, sobre a redução do quadro de diarreia e a melhora na média de ganho de peso diário (Larsen et al., 2016). Nessa avaliação, foram testadas três dosagens diferentes (5, 10 e 20 mg/kg), e a conclusão foi que todas as doses utilizadas no tratamento resultaram na diminuição do quadro de diarreia e eliminação da bactéria nas fezes. Particularmente para as doses mais altas (10 e 20 mg/kg) houve a redução da enteropatia. Os resultados também mostraram que os animais tratados com a dose de 5 mg/kg tendiam a ter as fezes mais amolecidas, e apresentaram probabilidade maior de continuarem eliminando a bactéria nas fezes, após o tratamento, se comparado com maiores dosagens (Larsen et al., 2016).

Em relação ao ganho de peso diário não foi encontrada associação com a dose de tratamento. A dose de 5 mg/kg foi adequada para a redução dos sinais clínicos e eliminação do agente nas fezes, porém, em doses maiores, obtiveram resultados superiores e na dosagem de 10 mg/kg obteve a redução máxima no nível de eliminação nas fezes (Larsen et al., 2016).

De acordo com França e Guedes (2008), para se avaliar a eficiência da antibioticoterapia nos casos de enteropatias, o princípio ativo deve ser capaz de reduzir a eliminação do agente nas fezes. Essa eficácia foi observada em experimentos realizados *in vivo* em várias publicações (McOrist et al., 2000; Walter et al., 2001; Winkelman et al., 2002; Alexopoulos, 2006; Pommier et al., 2008; Guedes et al., 2009; Larsen et al., 2016) utilizando diversos antimicrobianos para o tratamento da EPS. Entretanto, os testes de eficácia antimicrobiana contra *L. intracellularis* *in vivo* são laboriosos e caros devido à necessidade do uso de grande número de animais. Uma alternativa para avaliação de sensibilidade de antimicrobianos são testes *in vitro* de avaliação de concentração mínima inibitória (Wattanaphansak et al., 2009).

## 3.2 ANTIMICROBIANOS

### 3.2.1 CONCEITOS

As substâncias químicas que são utilizadas no combate aos microrganismos são denominadas antimicrobianos ou anti-infecciosos (Spinosa e Tárraga, 2011) foram descobertos na primeira metade do século XX (Cromwell, 2002). Essas moléculas podem atuar de modo específico ou inespecífico (Spinosa e Tárraga, 2011). Os antissépticos e desinfetantes são exemplos de antimicrobianos inespecíficos e atuam sobre microrganismos sejam eles patogênicos ou não. Já os quimioterápicos atuam em agentes infecciosos patogênicos, portanto são classificados como antimicrobianos específicos (Spinosa e Tárraga, 2011).

A partir dos estudos de Paul Ehrlich (1854 – 1915), o uso dos antimicrobianos específicos se inicia, sendo que Ehrlich definiu um quimioterápico como uma substância sintetizada em laboratório que, depois de utilizada no animal e no homem, é capaz de agir de modo seletivo nos agentes infecciosos sem causar dano ao hospedeiro. Porém, o emprego do termo quimioterápico hoje em dia é bem mais amplo se comparado ao que foi proposto por Ehrlich no passado. Com isso, há uma tendência em abandonar o uso desse termo quando se trata de substâncias que combatem agentes infecciosos (Spinosa e Tárraga, 2011).

O termo antibiótico (do grego *anti* = contra e *bio* = vida) foi sugerido por Selman Abraham Waksman (1888 – 1975) e é usado atualmente para definir as substâncias químicas produzidas por microrganismos e seus equivalentes sintéticos que tem a capacidade de inibir o crescimento (bacteriostático) ou então matar os agentes causadores de doenças (bactericida). Posteriormente, esse conceito foi ampliado, pois com o desenvolvimento tecnológico, foi possível a obtenção dessas substâncias de diversas formas (Spinosa e Tárraga, 2011). Em veterinária, antimicrobianos têm sido utilizados amplamente na pecuária, abrangendo tanto princípios produzidos por cultura de microrganismos quanto os sintetizados em laboratório, representando excelente forma de tornar a exploração animal mais eficiente (Cromwell, 2002). Já os antibióticos são usados somente para aqueles princípios produzidos a partir de cultura de microrganismos.

Os antimicrobianos podem ser classificados como biossintéticos, semissintéticos e sintobióticos. Os antimicrobianos biossintéticos são aqueles obtidos a partir de uma cultura de microrganismos. Os semissintéticos também são obtidos a partir de uma cultura de microrganismos, porém são adicionados radicais químicos a essa substância. Os sintobióticos são obtidos exclusivamente a partir da síntese laboratorial. Atualmente, a tendência é que se use o termo antimicrobiano, independentemente da forma como o mesmo é obtido, pois todas essas substâncias agem também em microrganismos patogênicos (Spinosa e Tárraga, 2011).

### 3.2.2 USO DE ANTIMICROBIANOS NA SUINOCULTURA

A finalidade do uso dos antimicrobianos na veterinária é mais ampla que aquela utilizada em medicina humana (Spinosa & Tárraga, 2011). A utilização de antimicrobianos pode ocorrer de quatro formas: terapêutica, metafilática, preventiva e para promoção de crescimento. O uso terapêutico é aquele onde medicam-se os animais doentes individualmente, de forma injetável,

ou pode ser realizada terapia massal do rebanho ou lote acometido via ração ou água. A forma metafilática é a terapia em massa após o surgimento de sinais clínicos em poucos indivíduos de determinado grupo. Essa forma baseia-se na premissa de que todos os animais alojados nas mesmas condições são igualmente suscetíveis a desenvolver a doença. A utilização preventiva ou profilática tem o intuito de prevenir determinada enfermidade antes da sua ocorrência (Barcellos et al., 2007), sendo normalmente utilizada adição de medicação na ração ou água. Aditivos ou promotores de crescimento são sempre incluídos em subdoses terapêuticas na ração, induzindo assim melhora no ganho de peso diário (Rosengren et al., 2007) e da conversão alimentar dos animais (McDermott et al., 2002).

Em estimativa realizada nos Estados Unidos, indicou-se que apenas 18% do uso de antimicrobianos na produção era direcionado para a promoção de crescimento e 82% para prevenção e tratamento de doenças (Cromwell, 2002). Em outro estudo conduzido no Canadá (Rosengren et al., 2008), demonstrou-se que a administração de antimicrobianos para a espécie suína ocorreu mais frequentemente através da via enteral. A exposição à droga na creche foi 40 vezes maior que nas fases subsequentes e a razão pela qual foi utilizada foi a prevenção de doenças, diferentemente das fases de recria, terminação e no rebanho de reprodução, onde o uso foi terapêutico.

### **3.2.3 CLASSIFICAÇÃO**

Uma das formas de classificação dos antimicrobianos específicos pode ser feita a partir de três categorias: se sua atividade é sobre bactérias (antibacterianos), fungos (antifúngicos) ou vírus (antivirais). Os antibacterianos, especificamente, podem ser classificados quanto a sua estrutura química, ação biológica (bactericida ou bacteriostático) e quanto ao seu espectro de ação (amplo ou curto espectro e atuação sobre bactérias Gram-positivas ou negativas) (Spinosa & Tárraga, 2011).

Quanto ao mecanismo de ação, os antibacterianos podem ser classificados como inibidores da síntese da parede celular, os que causam dano na função da parede celular, os inibidores da síntese ou da função dos ácidos nucleicos, os inibidores da síntese de proteínas e os inibidores da síntese do ácido fólico (Spinosa & Tárraga, 2011).

### **3.2.4 CIPROFLOXACINA**

A ciprofloxacina faz parte do grupo das quinolonas denominadas fluorquinolonas (quinolonas de segunda geração). Esse grupo de substâncias apresenta ampla aplicação em medicina veterinária e humana, incluindo os seguintes princípios ativos: enrofloxacin, orbifloxacin, difloxacin, marbofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, lomefloxacin, pefloxacin e ciprofloxacina (Górniak, 2011).

A ciprofloxacina é um antimicrobiano bactericida e seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da DNA girase (topoisomerase tipo II bacteriana), que impede o anelamento do DNA. Essas topoisomerases são as responsáveis por catalisar a direção e a extensão do espiralamento da molécula de DNA, não agindo nas topoisomerases presentes nos mamíferos (Górniak, 2011).

As fluorquinolonas possuem vasto potencial para uso no tratamento devido ao seu amplo espectro de ação, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia*

*spp.*, *Staphylococcus spp.* e bacilos entéricos Gram-negativos (Górniak, 2011). De ponto de vista do uso em medicina humana, as fluorquinolonas em geral tem se mostrado bastante efetivas no tratamento de infecções do trato urinário, ossos, articulações e também para o tratamento das diarreias por *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *E. coli* toxigenica e *Campylobacter sp.* Além dos usos já citados, a ciproloxacina é comumente utilizada em determinados casos, para o tratamento da tuberculose e das micobacterioses atípicas, meningite meningocócica ou então para a profilaxia da infecção em pacientes com neutropenia (Chambers, 2010). Dentre as opções, é uma das substâncias mais usadas em medicina veterinária (Górniak, 2011). Para suínos, as fluorquinolonas são eficazes para o tratamento de pneumonias, rinites, e diarreias (Paes, 2012).

### 3.2.5 LINCOMICINA

A lincomicina é um antimicrobiano do grupo das lincosamidas, também denominadas monoglicosídeos ligados a um aminoácido. Foi isolada a partir de culturas de *Streptomyces lincolnensis*, sendo portando um antimicrobiano biossintético. Por ter uma estrutura química semelhante à dos macrolídeos, seu espectro de ação se assemelha aos princípios ativos desse grupo (Spinosa, 2011), que abrange organismos gram-positivos, *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Listeria sp.*, e Gram-negativos (Chambers, 2010). A associação das lincosamidas, principalmente a lincomicina, com a espectinomicina aumenta a atividade contra as bactérias do gênero *Mycoplasma* (Spinosa, 2011).

O mecanismo de ação das lincosamidas é semelhante ao descrito para os macrolídeos, inibindo a síntese proteica bacteriana a partir da ligação com a subunidade 50S dos ribossomos, inibindo a translocação da fita de RNA transportador, interferindo na adição de novos aminoácidos, conseqüentemente, impedindo a formação das proteínas. Esse mecanismo não ocorre em mamíferos pois nos mesmos, os ribossomos possuem as subunidades 40S e 60S. Age portanto como uma substância bacteriostática, e em altas concentrações comporta-se como bactericida (Spinosa, 2011).

### 3.2.6 TIAMULINA

A tiamulina, juntamente com a valnemulina, faz parte dos antimicrobianos do grupo das pleuromutilinas. São semissintéticos produzidos a partir do fungo *Clitopilus passeckerianus*. Seu espectro de ação abrange principalmente bactérias gram-positivas e atividade moderada para alguns gram-negativos e *Mycoplasma*. É um grupo de antimicrobianos com uso exclusivo para a medicina veterinária, principalmente para a suinocultura. Seu mecanismo de ação é semelhante ao das lincosamidas e macrolídeos, atuando na inibição da síntese de proteínas das bactérias na subunidade 50S do ribossomo, inibindo a peptidil transferase. Por conta dessa semelhança, pode ocorrer competição com os macrolídeos e lincosamidas nos sítios de ligação dos ribossomos (Spinosa, 2011).

### 3.3. “MIC” PARA *Lawsonia intracellularis*

O teste *in vitro* usado para determinar a atividade antimicrobiana de um determinado princípio ativo é denominado de concentração inibitória mínima (“MIC”, “Minimal inhibitory concentration”), o qual vai determinar a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um microrganismo. Para sua determinação, são adicionados diferentes concentrações do antimicrobiano e incubado juntamente com a inoculação da bactéria. A inspeção é feita com a observação visual de crescimento bacteriano, que faz o meio ficar turvo.

A menor concentração a partir da qual não houve crescimento é considerada MIC para aquele microrganismo (Oliveira et al., 2009).

Esta técnica é amplamente utilizada para determinar a concentração inibitória mínima de organismos extracelulares, o que não se aplica para bactérias como *L. intracellularis* por ser um microrganismo intracelular obrigatório. Por isso, existe a necessidade de avaliar a eficácia de um antimicrobiano pela atividade extracelular, que avalia a sensibilidade da bactéria antes da mesma infectar a célula, e também a atividade intracelular avaliando a sensibilidade após sua entrada na célula (Wattanaphansak et al., 2009). Devido a dificuldade de cultivo do agente, os relatos de sensibilidade antimicrobiana para esta espécie são escassos (Wattanaphansak et al., 2009), existindo apenas cepas norte americanas, europeias e asiáticas com valores determinados (McOrist et al., 1995; Wattanaphansak et al., 2009; Yeh et al., 2011).

No estudo desenvolvido por Wattanaphansak e colaboradores (2009), no qual testou-se a sensibilidade *in vitro* de 10 isolados de *L. intracellularis* norte americanos e europeus, foi determinado que dentre o rol de antimicrobianos testados, os que obtiveram maior atividade foram o carbadox, tiamulina e valnemulina, seguido de clortetraciclina e tilosina com atividade intermediária e, por último, lincomicina com atividade antimicrobiana baixa. Em outro estudo realizado por McOrist e colaboradores (1995), também avaliando a sensibilidade *in vitro* de três isolados do Reino Unido, foi observado que os melhores resultados foram para penicilina, eritromicina, difloxacina, virginamicina e cloretetraciclina, seguido de tilmicosina e tilosina com atividade intermediária e compostos incluindo a bacitracina, avoparcina, e todos os aminoglicosídeos obtiveram baixa atividade. E em um estudo mais recente realizado por Yeh e colaboradores (2011), no qual foi avaliada a sensibilidade antimicrobiana de dois isolados sul coreanos, a tilosina e a tilmicosina obtiveram a maior atividade enquanto que a lincomicina e aminoglicosídeos tiveram os piores resultados. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Os antimicrobianos que foram utilizados nesse estudo foram a lincomicina, tiamulina e ciprofloxacina. Os isolados de *L. intracellularis* foram obtidos de suínos afetados pela forma aguda da EPS. O primeiro isolado, BRPHE01\_E5, foi obtido do íleo de um suíno de terminação de um rebanho comercial de múltiplos sítios localizado na região metropolitana de Belo Horizonte, em 2010. O segundo isolado, BRPHE02\_E8, foi obtido de um suíno também de terminação de uma granja do estado de São Paulo, em 2011. O isolamento e propagação de ambos os isolados foram bem-sucedidos nos anos de 2011 para primeira e em 2017 para a segunda, respectivamente. Os isolados de *L. intracellularis* BRPHE01\_E5 e BRPHE02\_E8 foram isolados e cultivados no Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da UFMG usando células McCoy (ATCC<sup>®</sup> CRL1696<sup>™</sup>), segundo Vannucci e colaboradores (2012), a 37°C sob condições de microaerofilia.

### 4.2 PREPARAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS

As soluções de estoque dos três princípios ativos usados no presente estudo foram preparadas em uma concentração final de 2560 µg/mL, diluídas em água destilada, com posterior esterilização

utilizando filtros de 0,22 µm e armazenadas em temperatura de -20°C até uso. Para o teste, os antimicrobianos foram diluídos em meio de cultivo nas concentrações finais de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 128 µg/mL e para confirmar a infecção, cada concentração testada havia um controle positivo sem antimicrobiano. (Wattanaphansak et al., 2009).

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana de *Lawsonia intracellularis* obtida a partir de estudos de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* anteriores.

Referência	Atividade	Antimicrobiano
McOrist et al., 1995	Alta	Penicilina
		Difloxacina
		Virginiamicina
		Clortetraciclina
	Intermediária	Tilmicosina
		Tilosina
Baixa	Bacitracina	
	Avoparcina	
	Aminoglicosídeos	
Wattanaphansak et al., 2009	Alta	Carbadox
		Tiamulina
		Valnemulina
	Intermediária	Clortetraciclina
		Tilosina
	Baixa	Lincomicina
Yeh et al., 2012	Alta	Tilosina
		Tilmicosina
	Intermediária	Clortetraciclina
	Baixa	Lincomicina
		Bacitracina
		Aminoglicosídeos



### 4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

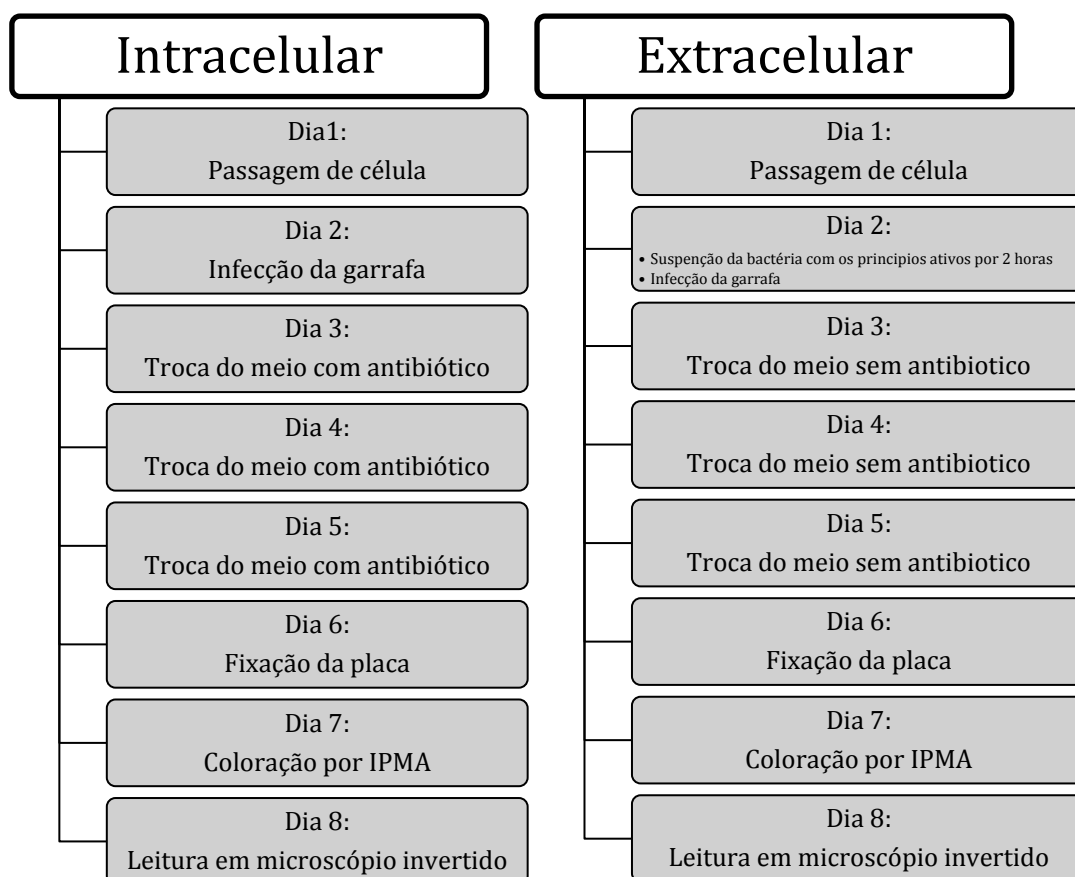
A determinação da sensibilidade *in vitro* contra *L. intracellularis* foi realizada pelo teste de concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com Wattanaphansak et al (2009). Resumidamente, a bactéria foi propagada em cultivo de células McCoy e realizadas, no mínimo, três passagens em garrafas de cultivo T175, para garantir maior grau de infecção da monocamada de células. Cada isolados foi testados duas vezes. Para cada isolado foram realizados dois testes independentes. Os isolados foram coletados da monocamada e diluídos em 100 µL de meio de cultura e essa suspensão foi adicionada em placas de cultivo de 96 poços (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Alemanha) contendo células McCoy de um dia de idade e com cerca de 30% de confluência.

Para determinar a sensibilidade de *L. intracellularis in vitro*, foram avaliados as atividades intracelular e extracelular, a partir de ensaios previamente descritos (McOrist et al., 1995; Wattanaphansak et al., 2009). O MIC intracelular é o teste que avalia o efeito do antimicrobiano após a bactéria ter infectado os enterócitos. Para tanto, foram inoculados 100 µL da suspensão com a bactéria em placas com células McCoy de um dia com aproximadamente 30% de confluência. após 24 horas de incubação, a monocamada de células foi exposta aos antimicrobianos nas diferentes concentrações. Este período de 24 horas é suficiente para que a bactéria infecte a célula hospedeira antes do desafio com os antimicrobianos. Após a incubação, o meio foi substituído por 100 µL por poço de meio de cultura contendo as diferentes concentrações dos antimicrobianos por três dias consecutivos, para garantir maior tempo possível de contato do antimicrobiano com as bactérias

O MIC extracelular avalia o efeito dos antimicrobianos antes da bactéria infectar os enterócitos. Foi realizada diluições em série dos antimicrobianos em meio de cultura contendo *L. intracellularis*. Essa suspensão contendo a bactéria e os princípios ativos testados foram incubados por duas horas a 37°C sob condições de microaerofilia, permitindo a exposição do agente testado aos antimicrobianos. Após a incubação, 100 µL da suspensão foi transferida para placas de 96 poços contendo células McCoy de um dia de idade com aproximadamente 30% de confluência. Após 24 horas, o meio removido é substituído por meio sem antimicrobianos, por três dias consecutivos, com incubação a 37°C sob condições de microaerofilia.

Após a terceira troca de meio no quinto dia de incubação, o sobrenadante de todas as placas infectadas foi removido e as mesmas foram fixadas adicionando por dois minutos 200 µL de solução contendo 50% de acetona e 50% de metanol. As placas foram coradas usando o método de coloração do ensaio de imunoperoxidase em monocamada de células (Guedes et al., 2002). A avaliação foi feita contando o número de células altamente infectadas (HIC, “high infected cells”) em cada poço. Essa contagem foi realizada utilizando microscópio invertido (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As células são consideradas HIC quando houver mais que 30 *L. intracellularis* no seu interior.

Os testes foram realizados na terceira passagem após o descongelamento e confirmação de aproximadamente 100% de infecção das células da monocamada em garrafa pela técnica de imunoperoxidase indireta utilizando anticorpo monoclonal específico para *L. intracellularis*, de acordo com Guedes e Gebhart (2003b). Cada isolado foi testado duas vezes para cada princípio ativo e cada duplicata foi executada independentemente, testando cada princípio ativo em triplicata. A sequencia dos eventos podem ser observadas em ordem cronológica de acordo com a figura 6.



**Figura 6.** Linha do tempo indicando a ordem cronológica para as técnicas de MIC intracelular e extracelular.

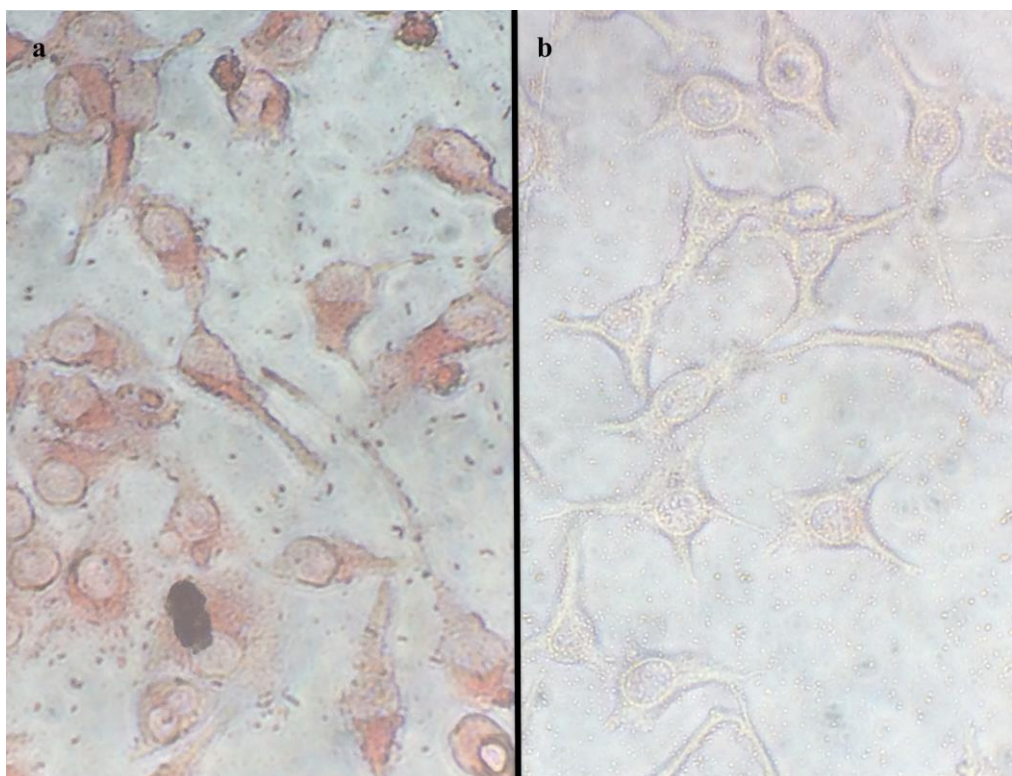
## 5 RESULTADOS

Os valores obtidos para MIC extracelular e intracelular de ciprofloxacina para os isolados BRPHE01-E5 e BRPHE02-E8 estão listados na Tabela 1. A ciprofloxacina foi a molécula mais ativa para o isolado BRPHE01-E5 no teste extracelular com resultados  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  para as passagens 23 e 29. No intracelular o princípio ativo obteve os melhores resultados com  $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$  e  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  nas passagens 23 e 31, respectivamente (Figura 6). Para o isolado BRPHE02-E8, a atividade extracelular de ciprofloxacina foi moderada com  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  na passagem 23 e  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  na passagem 31. Para atividade intracelular apresentou alta atividade com MIC  $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$  na passagem 23 e  $1 \mu\text{g/mL}$  na passagem 29.

**Tabela 2.** Concentração inibitória mínima, intra e extracelulares, de ciprofloxacina para os dois isolados brasileiros de *Lawsonia intracellularis*.

Isolado	Origem	Ano	Passagem	MIC intra*	Passagem	MIC extra
<b>BRPHE01-E5</b>	MG	2010	23	0,5	23	1
<b>BRPHE01-E5</b>	MG	2010	31	1	29	1
<b>BRPHE02-E8</b>	SP	2011	23	0,5	23	8
<b>BRPHE02-E8</b>	SP	2011	29	1	31	4

\* Os resultados são apresentados em  $\mu\text{g/mL}$ ;



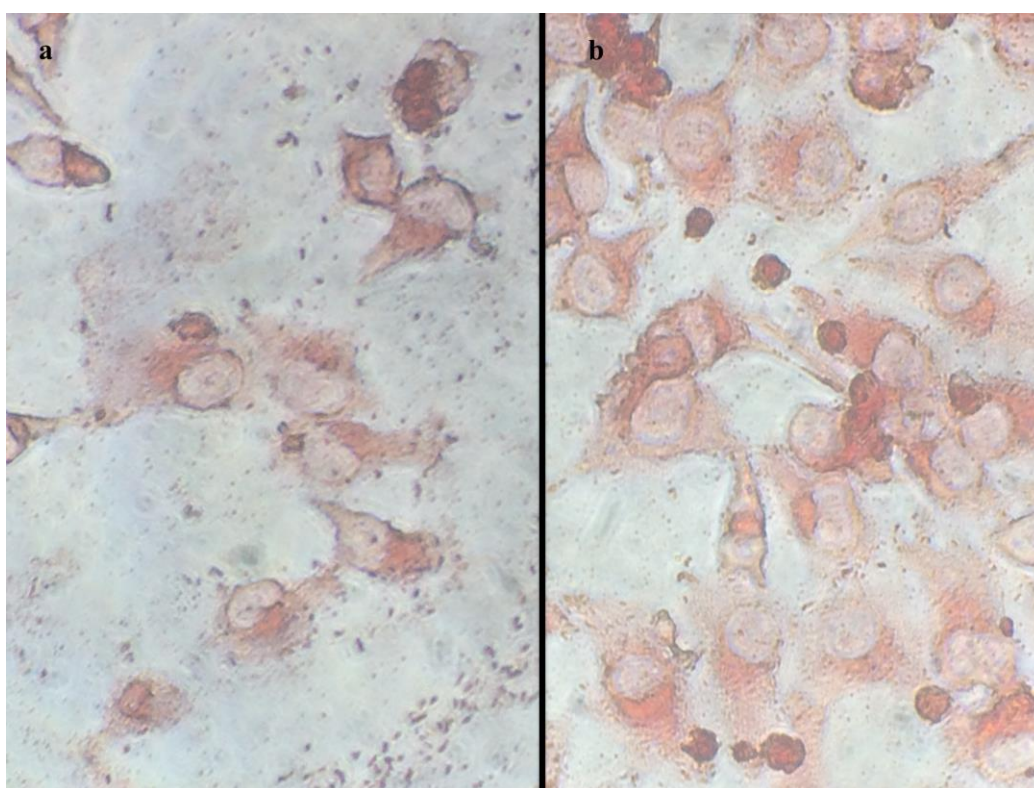
**Figura 7:** Resultado de MIC intracelular para ciprofloxacina com isolado BRPHE01-E5 passagem 23 (aumento 40x). a) Controle positivo. Observa-se crescimento no interior e fora das células com marcação em vermelho. b)  $\text{MIC} \geq 0,5 \mu\text{g/mL}$  ausência de bactérias no interior e fora das células, não havendo qualquer marcação (AEC).

A lincomicina apresentou as atividades mais baixas para os testes extra e intracelular com resultados  $\geq 128 \mu\text{g/mL}$  nas passagens 23 e 31 da cepa BRPHE01\_05 de *L. intracellularis* (**Figuras 7**). Os mesmos resultados foram obtidos para os testes extra e intracelulares da cepa BRPHE02-E8 com baixa atividade no valor de  $\geq 128 \mu\text{g/mL}$  nas passagens 23 e 31, e 23 e 29, respectivamente. Os resultados descritos para MIC extracelular e intracelular de lincomicina dos isolados BRPHE01-E5 e BRPHE02-E8 estão listados na (Tabela 2).

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima, intra e extracelulares, de lincomicina para os dois isolados brasileiros de *Lawsonia intracellularis*.

Isolado	Origem	Ano	Passagem	MIC intra*	Passagem	MIC extra
<b>BRPHE01-E5</b>	MG	2010	23	128	23	128
<b>BRPHE01-E5</b>	MG	2010	31	128	31	128
<b>BRPHE02-E8</b>	MG	2011	23	128	23	128
<b>BRPHE02-E8</b>	MG	2011	29	128	31	128

\* Os resultados são apresentados em µg/mL



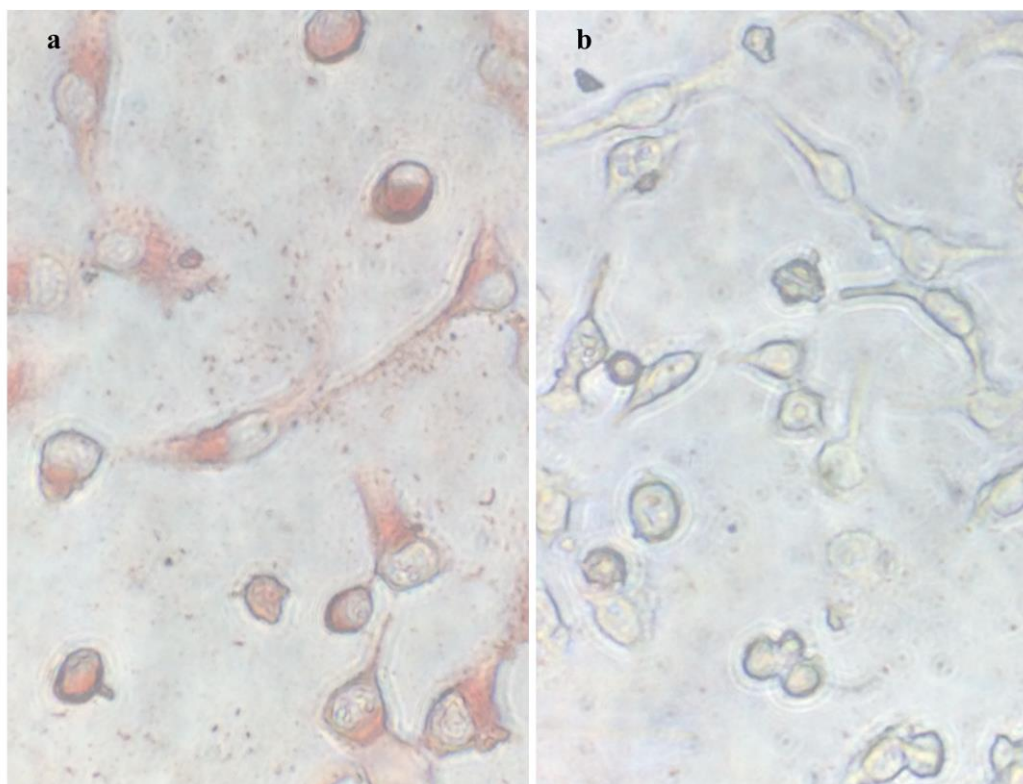
**Figura 8:** Resultado de MIC intracelular para lincomicina do isolado BRPHE01-E5 passagem 23 (aumento 40x). a) Controle positivo. Observa-se crescimento no interior e fora das células com marcação em vermelho. b) MIC  $\geq 128$  µg/mL presença de bactérias no interior e fora das células, demonstrando crescimento bacteriano (AEC).

Os resultados obtidos para MIC extracelular e intracelular de tiamulina a partir dos isolados BRPHE01-E5 e BRPHE02-E8 estão listados na Tabela 3. Os resultados para atividade extracelular de tiamulina para o isolado BRPHE01-E5 obteve atividade alta com MIC  $\geq 2$  µg/mL na passagem testada 23 e  $\geq 1$  µg/mL na passagem 29. A avaliação intracelular obteve resultado de atividade alto com MIC  $\geq 0,5$  µg/mL para a passagem 23 e MIC  $\geq 1$  µg/mL na passagem 29 (Figura 8). O isolado BRPHE02-E8 mostrou atividade extracelular de tiamulina alta com MIC  $\geq 0,25$  µg/mL nas passagens 13 e 14 e atividade intracelular obtendo também eficiência alta com MIC  $\geq 1$  µg/mL na passagem 13 e  $\geq 0,5$  µg/mL na passagem 14.

**Tabela 4.** Concentração inibitória mínima, intra e extracelulares, de tiamulina para os dois isolados brasileiros de *Lawsonia intracellularis*.

Isolado	Origem	Ano	Passagem	MIC intra*	MIC extra
<b>BRPHE01-E5</b>	MG	2010	23	0,5	2
<b>BRPHE01-E5</b>	MG	2010	29	1	1
<b>BRPHE02-E8</b>	MG	2011	13	1	0,25
<b>BRPHE02-E8</b>	MG	2011	14	0,5	0,25

\* Os resultados são dados em  $\mu\text{g/mL}$



**Figura 9:** Resultado de MIC intracelular para tiamulina do isolado BRPHE01-E5 passagem 23 (aumento 40x). a) Controle positivo. Observa-se crescimento no interior e fora das células com marcação em vermelho. b)  $\text{MIC} \geq 0,5 \mu\text{g/mL}$  ausência de bactérias no interior e fora das células, não houve crescimento bacteriano (AEC).

## 6 DISCUSSÃO

A resistência adquirida aos antimicrobianos nos microrganismos intracelulares obrigatórios é raramente citado na literatura, ao contrário do que ocorre quando se trata de organismos extracelulares, onde os fatores de transmissão genéticos que causam a resistência são amplamente conhecidos. De acordo com McOrist (2000), existem alguns relatos se tratando deste assunto para organismos intracelulares obrigatórios, principalmente para as bactérias do gênero *Rickettsia* e *Chlamydia*. Em um desses relatos, foi descrito o isolamento de uma espécie do gênero *Chlamydia* com aparente resistência a tetraciclina.

As bactérias gram-negativas e intracelulares obrigatórias falham em exibir resistência adquirida aos antimicrobianos, uma vez que os mecanismos de resistência, como por exemplo a capacidade de adquirir novos genes, incluindo genes de resistência, pelos plasmídios que são comuns nos extracelulares não ocorrem em intracelulares. Essa capacidade de portar plasmídios funcionais foi descrita apenas para *Coxiella burnetii*. Para *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp., e *Lawsonia intracellulares* não foi demonstrada a evidência de possuir plasmídios e como os genes de resistência aos antimicrobianos são carregados por plasmídios, estão consequentemente indisponíveis para essas espécies.

Na literatura, existem apenas três estudos realizados com o objetivo de testar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *L. intracellularis*. Um utilizando somente isolados europeus (McOrist et al., 1995), um utilizando isolados europeus e norte americanos (Wattanaphansak et al., 2009) e um com isolados asiáticos (Yeh et al., 2011). Esse tipo de relato é escasso devido às dificuldades que os laboratórios em geral possuem em isolar e manter as culturas desse agente. Da mesma forma nos estudos acima, o presente estudo realizou as técnicas de MIC intracelular e extracelular com a tentativa de mimetizar a ação do antimicrobiano antes e após a sua entrada na célula hospedeira, como acontece *in vivo*, utilizando dois isolados nacionais de *L. intracellularis*.

Os resultados do presente estudo corroboram os achados dos isolados norte americanos testados por Wattanaphansak e colaboradores (2009) e dos isolados asiáticos testados por Yeh e colaboradores (2011) relacionados à tiamulina e lincomicina. Para ciprofloxacina, essa comparação não foi possível pois nos estudos anteriores não se testou esse antimicrobiano, sendo este, o primeiro relato da atividade *in vitro* de ciprofloxacina para isolados de *L. intracellularis*, porém, se comparar os resultados de ciprofloxacina obtidos nesse estudo com os resultados de enrofloxacina e difloxacina obtidos nos estudos de Mc Orist e colaboradores (1995) e também no de Yeh e colaboradores (2012) se observa que a ciprofloxacina obteve MIC menor que a enrofloxacina e semelhante a difloxacina para ambas atividades, ou seja, atividade maior que a enrofloxacina e semelhante a difloxacina.

Por não existir nenhum padrão de MIC para microrganismos intracelulares em cultura de células, o teste foi executado em duplicata, cada uma feita independente da outra, e em cada duplicata, os antimicrobianos foram testados em triplicata. Isso foi necessário pois como a determinação da sensibilidade do teste é difícil, é necessário repetitividade dos resultados. É importante ressaltar também, um estudo em que Vannucci e colaboradores (2013) avaliou a atenuação da virulência de isolados de *Lawsonia intracellularis* após três diferentes passagens *in vitro* e o seu efeito em reprodução experimental da EPS, foi observado que não ocorreu atenuação da virulência dos isolados com 10 e 20 passagens e que só ocorre nos isolados a partir da quadragésima passagem. Portanto, o uso de diferentes passagens entre as duplicatas testadas deste trabalho não alteram nem introduzem viés aos resultados obtidos.

De acordo com França e Guedes (2008), a atividade *in vitro* dos antimicrobianos contra a *L. intracellularis* pode não condizer com a *in vivo*. Isso acontece com a tilosina a qual apresenta concentração inibitória mínima elevada, demonstrando pouca atividade *in vitro*; porém em estudos *in vivo* mostrou-se bastante eficiente na prevenção e tratamento da EPS. Outro ponto importante que justifica o reconhecimento de sensibilidade antimicrobiana foi demonstrado por Wattanaphansak et al. (2009) que mostrou diferenças de sensibilidade antimicrobiana entre os isolados de *L. intracellularis* norte americanos e europeus, indicando que esse padrão pode ser diferente conforme a localização geográfica. Baseado nisto, o objetivo do presente estudo foi

indicar preliminarmente quais princípios ativos seriam mais efetivos no tratamento da EPS no Brasil.

A atividade extracelular e intracelular da ciprofloxacina e tiamulina mostraram que as menores concentrações dos princípios ativos são capazes de inibir o crescimento da bactéria para ambos os isolados em diferentes passagens, apesar de a ciprofloxacina ter apresentado concentração moderada nas duas duplicatas testadas no teste extracelular para o isolado BRPHE02-E8 (variando de  $\geq 8$  e  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ). O mesmo não ocorreu para lincomicina, que apresentou concentrações altas ( $\geq 128$   $\mu\text{g/mL}$ ) em todos os testes realizados e para todos os isolados testados. Portanto, os isolados nacionais de *L. intracellularis* apresentam maior sensibilidade a ciprofloxacina e a tiamulina, em detrimento à lincomicina.

Outro resultado observado nesse estudo foi que, com exceção do teste de tiamulina intra e extracelulares da cepa BRPHE02-E8, o MIC extracelular foi sempre maior ou igual que do MIC intracelular, semelhante ao observado em estudos anteriores (McOrist et al, 1995; Wattaphanansak et al, 2009; Yeh et al, 2011). Uma provável explicação para essa diferença, segundo Wattanaphansak e colaboradores (2009), seria que no ensaio extracelular, a bactéria fica menos tempo em contato com o antimicrobiano (26 horas) se comparado ao intracelular, o qual a bactéria permanece em contato por três dias consecutivos. O MIC extracelular testa em qual concentração um determinado antimicrobiano atuaria sobre o microrganismo antes da mesma infectar a célula hospedeira, porém como *L. intracellulares* consegue infectar as células em um intervalo de 24 horas, o tempo é reduzido e uma porção da bactéria pode sobreviver após esse período e retornar à sua fase ativa após a troca do meio com antibiótico para o meio sem antibiótico. Isso sugere que uma única dose não seria suficiente para controlar o seu crescimento a campo.

Outra possível explicação para os resultados de MIC intracelulares serem menores que os extracelulares, segundo Wattanaphansak e colaboradores (2009), seria o acúmulo do princípio ativo no interior das células eucariotas, fazendo com que a concentração seja maior que no meio extracelular, e que essa concentração intracelular permite a ação do antimicrobiano contra a bactéria. O mesmo não ocorre para alguns grupos de antimicrobianos, como as lincosamidas, podendo justificar o resultado de MIC alto e semelhante ao MIC extracelular para esse princípio ativo, pois se a lincomicina não acumula na célula, a concentração do mesmo não é suficiente para inibir o crescimento mesmo que ela fique por três dias na presença das bactérias. Os resultados do MIC intracelular mostram que, com ressalvas a lincomicina, todos os antimicrobianos testados são capazes de entrar nas células e atuar sobre as bactérias, com atenção especial à ciprofloxacina que obteve MIC intracelular baixo e não há relatos anteriores dessa atividade.

## 7 CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível expandir as informações relacionadas a atividade antimicrobiana para *L. intracellularis*, principalmente para a realidade nacional, utilizando isolados brasileiros. Ao conhecer o padrão de sensibilidade de mais um antimicrobiano, como a ciprofloxacina, este passa a se tornar mais um possível alvo para futuros estudos de atividade *in vivo* e poder entrar na lista dos antimicrobianos eficazes no tratamento da enfermidade. Importante relembrar a impossibilidade de isolamento rotineiro dessa bactéria e a execução de antibiogramas para clientes na rotina de diagnóstico.

Baseado nos resultados do presente estudo podemos concluir que, utilizando dois isolados brasileiros de *L. intracellularis*, a tiamulina e a ciprofloxacina obtiveram a maior atividade antimicrobiana e a lincomicina alcançou a menor atividade.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M., DURAN, C. O., BURCH, D. G. S. Antimicrobial resistance in swine production. *Animal Health Research Reviews*, v. 09, n. 02, p. 135-148, 2008.

ALEXOPOULOS, C., TASSIS P. D., KYRIAKIS, C. S. et al. First experience on the effect of in-feed lincomycin for the control of porcine proliferative enteropathy in growing pigs. *Journal of Veterinary Medicine*. v. 53, p. 157-162, 2006.

BANE, P. B., NEUMANN, E., GEBHART, C. J., et al. Porcine proliferative enteropathy: a case-control study in swine herds in the United States. *Journal of Swine Health and Production*, v. 09, n. 04, p. 155 – 158, 2001.

BARCELLOS, D. E. S. N., SOBESTIANSKY, J., LINHARES, D., et al. Uso de antimicrobianos. In: SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D. E. S. N. *Doença dos Suínos*. 2ª edição, Goiânia: Cãnone editorial, 2007. p. 837-884.

BIESTER, H.E.; SCHWARTE, L.H. Intestinal adenoma in swine. *American Journal of Pathology*, v.7, p.175-185, 1931.

CHAMBERS, H. F. Tetraciclina, macrolídeos, clindamicina, cloranfenicol, e estreptogamínicos. In: KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10ª edição, Porto Alegre: AMGH, 2010. p. 671-680.

CHAMBERS, H. F. Aminoglicosídeos e espectinomicina. In: KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10ª edição, Porto Alegre: AMGH, 2010. p. 681-688.

COLLINS, A. M. Advances in ileitis control, diagnosis, epidemiology and the economic impacts of disease in commercial pig herds. *Agriculture*, v. 3, p. 536-555, 2013.

CORDES, H. RIBER U. JENSEN T. K. et al. Cell-mediated and humoral immune responses in pigs following primary and challenge-exposure to *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Research*, v. 43, n. 09, 2012.

CROMWELL, G. L. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*, v. 13, n. 01, p. 07-27, 2002.

FRANÇA, S. A., GUEDES, R. M. C. Antimicrobianos para o controle da enteropatia proliferativa suína. *Ciência Rural*, v. 38, n. 01, p. 288-296, 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. 06, p. 1378-1384, 2010.

GABARDO, M. P., SATO, J. P. H., DANIEL, A. G. S. et al. Evaluation of the involvement of mice (*Mus musculos*) in the epidemiology of porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology*, v.205, p.75-79, 2017.

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

GÓRNIAK, S. L. Sulfas, Quinolonas e Outros Quimioterápicos. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIAK, S. L. e BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 432-441.

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. *Journal of Diagnostic Investigation*, v. 14, p. 528-530, 2002.

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*. *Veterinary Microbiology*, v. 91, p. 135-145, 2003a.

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

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

GUEDES, R. M. C., BROWN, C. C., SEQUEIRA, J. L. et al. Sistema Digestório. In: SANTOS, R. L, ALESSI, A. C. *Patologia Veterinária*. 2ª edição, Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 87 - 180.

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

JENSEN, T. K., BOESEN, H. T., VIGRE, H. et al., Detection of *Lawsonia intracellularis* in formalin-fixed porcine intestinal tissue samples: Comparison of immunofluorescence and in-situ hybridization, and evaluation of the effects controlled

autolysis. *Journal of Comparative Pathology*. v.142, p. 1-8, 2010.

KROLL, J. J., ROOF, M. B., LORRAINE, J., et al. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Research reviews*, v. 6, n. 02, p. 173-197, 2005.

LARSEN, I., HJULSAGER, C. K., HOLM, A., et al. A randomized clinical trial on the efficacy of oxytetracycline dose through water medication of nursery pigs on diarrhoea, fecal shedding of *Lawsonia intracellularis* and average daily weight gain. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 123, p. 52-59, 2016.

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

LOVE, D.N.; LOVE, R.J. Pathology of proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. *Veterinary Pathology*, v.16, p.41-48, 1979.

MacINTYRE, N., SMITH, D. G. E., SHAW, D. J. et al. Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Veterinary Pathology*, v. 40, p. 421-432, 2003.

McDERMOTT, P. F., ZHAO, S., WAGNER, D. D., et al. The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotechnology*, v. 13, n. 01, p. 71-84, 2002.

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

McORIST, S., MACKIE, R. A. e LAWSON, G. H. K. Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 05, p. 1314-1317, 1995.

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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.520-525, 1995c.

McORIST, S. Obligate intracellular bacteria and antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*. v. 08, n. 11, p. 483-485, 2000.

McORIST, S., WAGER, M. A., KRATZER, D., et al. Therapeutic efficacy of water-soluble lincomycin-spectinomycin powder against porcine proliferative enteropathy in a European field study. *The Veterinary Record*, v. 146, p. 61-65, 2000.

McORIST, S. e GEBHART, C. J. Proliferative Enteropathy In: ZIMMERMANN, J. J., KARRIKER, L. A., RAMIREZ, A. et al. *Diseases of Swine*. 10ª edição, Ames: Wiley-Blackwell, 2011. p. 811-820.

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

OLIVEIRA, T. F., FERREIRA, J. S., BOA SORTE, P. M. F. et al. Concentração Inibitória Mínima (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. In: OLIVEIRA, T. F., FERREIRA, J. S., BOA SORTE, P. M. F. et al. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 49*. 1ª edição, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16 p.

PAES, A. C. Quinolonas. In: BARROS, C. M. e DI STASI, L. C. *Farmacologia Veterinária*. 1ª edição, Barueri: Manole, 2012. p. 406-415.

POMMIER, P., KEITA, A., PAGOT, E., et al. Comparison of tylvalosin with tylosin for the control of subclinical ileitis in swine. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 159, n. 11, p. 579-582, 2008.

ROSENGREN, L. B., WALDNER, C. L., REID-SMITH, R. J., et al., Associations between feed and water antimicrobial use in farrow-to-finish swine and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from grow-finish pigs. *Microbial Drug Resistance*, v. 13, n. 04, p. 261-269, 2007.

ROSENGREN, L. B., WALDNER, C. L., REID-SMITH, R. J., et al. Antimicrobial use through feed, water, and injection in 20 swine farms in Alberta and Saskatchewan. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 72, p. 143-150, 2008.

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

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

SPINOSA, H. S. Antibióticos Bacteriostáticos que Interferem na Síntese de Proteína: Macrolídeos, Lincosamidas, Pleuromutilinas, Estreptogaminas, Tetraciclina, Cloranfenicol e Derivados. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S. L. e BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 464-473.

SPINOSA, H. S. e TÁRRAGA, K. M. Considerações Gerais sobre os Antimicrobianos. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S. L. e BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 409 - 417.

STEGE, H., JENSEN, T. K., MØLLER, K., et al. Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 50, p. 153-164, 2001.

STILLS, H.F.Jr. Isolation of an intracellular bacterium from hamsters (*Mesocricetus auratus*) with proliferative ileitis and reproduction of the disease with a pure culture. *Infection and Immunity*, v.59, p.3227- 3236, 1991.

VAN HOUT, J., HEUVELINK, A., GONGGRIJP, M. Monitoring of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* in the Netherlands, 2013-2015. *Veterinary Microbiology*, v. 194, p. 05-10, 2016.

VANUCCI, F. A., WATTANAPHANSACK, S., GEBHART, C. J. An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 50, n. 3, p. 1070-1072, 2012.

VANNUCCI, F. A., BECKLER, D., PUSTERLA, N. Attenuation of virulence of *Lawsonia intracellularis* after *in vitro* passages and its effects on the experimental reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology*. v. 162, p. 265-269, 2013.

VANUCCI, F. A., GEBHART, C. J. Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 02, p. 465-477, 2014.

VIOTT, A. M., LAGE A. P., CRUZ, E. C. C., et al. The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 145 – 151, 2013.

WALTER, D., KNITTEL, J., SCHWARTZ, K., et al. Treatment and control of porcine proliferative enteropathy using different tiamulin delivery methods. *Journal of Swine Health and Production*, v. 09, n. 03, p. 109-115, 2001.

WATTANAPHANSACK, S., SINGER, R. S. e GEBHART, C. J. *In vitro* antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates. *Veterinary Microbiology*, v.134, p. 305-310, 2009.

WINKELMAN, N. L., CRANE, J. P., ELFRING, G. D. et al. Lincomycin-medicated feed for the control of porcine proliferative enteropathy (ileitis) in swine. *Journal of Swine Health and Production*. v.10, n. 03, p. 106-110, 2002.

YEH, J. Y., LEE, J. H, YEH, H. R. et al. Antimicrobial susceptibility testing of two *Lawsonia intracellularis* isolates associated with proliferative hemorrhagic enteropathy and porcine intestinal adenomatosis in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 55, n. 09, p. 4451-4453, 2011.