

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**USO DA PESAGEM E DA PAQUIMETRIA NA  
MONITORAÇÃO DA ILEÍTE SUÍNA EM ABATEDOUROS**

**Ibrahim Nabil Abdel Fattah Ibrahim**  
Médico Veterinário

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL  
2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E  
VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**USO DA PESAGEM E DA PAQUIMETRIA NA  
MONITORAÇÃO DA ILEÍTE SUÍNA EM ABATEDOUROS**

**Ibrahim Nabil Abdel Fattah Ibrahim**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

Jaboticabal - São Paulo  
2011

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**IBRAHIM NABIL ABDEL FATTAH IBRAHIM** - nascido em 21 de fevereiro de 1986, no município de Ibitinga - SP, filho de Nabil Abdel Fattah Ibrahim e Edna Artuso Ibrahim. Ingressou em fevereiro de 2004 no Curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV - Unesp - Jaboticabal), concluindo-o em dezembro de 2008. Em março de 2009 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV - Unesp - Jaboticabal.

**Dedico esse trabalho a minha  
família, que sempre esteve ao  
meu lado, me apoiando a cada  
passo dessa árdua caminhada.  
Vocês são o que eu tenho de  
melhor.**

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais e as minhas irmãs, que são a base de tudo o que sou e serei durante toda minha vida. Com eles compartilho todos os méritos pelo trabalho realizado.

Ao professor Luiz Fernando, que aceitou o desafio de me orientar durante o mestrado e pelas conversas e conselhos.

Ao meu companheiro e amigo de trabalho, Guido, o qual considero meu co-orientador. Sempre esteve comigo me ajudando e indicando o melhor caminho a seguir.

Aos meus amigos-irmãos Felipe e Leonardo. Pessoas que durante os últimos sete anos estiveram mais tempo ao meu lado do que minha própria família, e por consequência disso e da lealdade e amizade, tornaram-se parte dela. Vocês estarão pra sempre guardados no meu coração.

Ao grupo de estudos Suinesp, companheiros de estudo e trabalho difíceis de serem encontrados numa área pouco difundida como a suinocultura.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram na realização deste trabalho.

À FCAV-Unesp Jaboticabal, por ter sido meu lar durante esses sete anos e por ter me propiciado ser o que hoje eu sou profissionalmente.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 ETIOLOGIA.....	3
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	4
2.3 PATOGÊNESE.....	5
2.4 SINAIS CLÍNICOS.....	9
2.5 LESÕES.....	10
2.6 DIAGNÓSTICO.....	11
2.7 CONTROLE.....	13
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 COLHEITA, EXAME MACROSCÓPICO, PAQUIMETRIA E PESAGEM DAS AMOSTRAS DE ÍLEO .....	18
4.2 EXAMES ANATOMOPATOLÓGICOS.....	19
4.3 HISTOMORFOMETRIA.....	20
4.4 FORMAÇÃO DOS GRUPOS.....	20
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 PESO, ESPESSURA E DIÂMETRO DO ÍLEO.....	22
5.2 EXAMES ANATOMOHISTOPATOLÓGICOS.....	22
5.3 MORFOMETRIA.....	23
5.4 AVALIAÇÃO GLOBAL DOS RESULTADOS.....	24
5.5 DISCRIMINAÇÃO DOS GRUPOS E ELABORAÇÃO DAS EQUAÇÕES MATEMÁTICAS .....	25
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	28
7. CONCLUSÕES.....	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXO I.....	51

## LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Médias e desvios-padrão para o comprimento das vilosidades e profundidade das criptas da porção final do íleo de suínos suspeitos, afetados e não afetados por ileíte. Jaboticabal, 2011.	24
TABELA 2	Teste de Tukey Studentizado com 5% de probabilidade comparando as médias de cada grupo entre si, para as variáveis estudadas.	24
TABELA 3	Distância entre os centróides de cada um dos grupos formados ( <i>Squared Mahalanobis Distances</i> )	25
TABELA 4	Confiabilidade estatística da distância entre os centróides dos grupos ( <i>P-levels</i> )	25
TABELA 5	Análise das funções discriminantes das variáveis do modelo	26
TABELA 6	Matriz de classificação segundo as funções criadas.	26

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Equipamento desenvolvido para obtenção de amostras padronizadas, com 10 cm de comprimento. A amostra inicial de 30 cm era fixada ao gancho da parte superior do aparato e transpassada pelo interior do mesmo. A secção do íleo era realizada utilizando navalha histológica e orientada pelas ranhuras do aparato.	18
FIGURA 2 Lâmina corada pela técnica de Warthin-Starry (WS) onde é possível evidenciar a bactéria <i>L. intracellularis</i> no citoplasma celular (aumento de 400x).	23

## USO DA PESAGEM E DA PAQUIMETRIA NA MONITORAÇÃO DA ILEÍTE SUÍNA EM ABATEDORUROS

**RESUMO** - O complexo enteropatia proliferativa dos suínos (EPS), causado pela bactéria *Lawsonia intracellularis*, é doença infecciosa de grande importância para suínos nas fases de crescimento e terminação e para adultos jovens. Caracteriza-se por determinar alterações proliferativas, hemorrágicas e necróticas da porção final do intestino delgado (íleo). É doença de ocorrência mundial e afeta especialmente animais de alto valor genético, oriundos de programas sanitários tipo SPF (*Specific Pathogen Free*), sendo responsabilizada por importantes perdas econômicas, seja devido à morte ou queda no desempenho produtivo dos animais. Com o objetivo de desenvolver metodologia rápida e barata para monitoramento padronizado das lesões na linha de abate foi realizado este estudo. Durante o processo de abate, em frigoríficos localizados em Ipuã-SP e Tupã-SP, foram colhidas ao acaso, amostras da porção final do íleo de 156 suínos, todos castrados, de linhagens comerciais, aproximadamente com 150 dias de idade e peso médio de 110 kg. Após padronizadas no comprimento, para exatos 10 centímetros, as amostras foram submetidas à paquimetria, para verificação da sua espessura e do seu diâmetro, e à pesagem, em balança de precisão. Foram, em seguida, cuidadosamente inspecionadas e palpadas, externa e internamente, com o intuito de identificar lesões macroscópicas de ileíte, sendo os resultados destas análises anotados em fichas apropriadas e individuais. Fragmentos de tecido foram colhidos e imersos em formalina neutra a 10%, para análises histopatológicas posteriores. O exame microscópico das secções do íleo, coradas pela hematoxilina e eosina e submetidas à impregnação com a prata - empregando a técnica de Warthin-Starry (WS) modificada, como também as análises histomorfométricas, aferindo o comprimento das vilosidades e profundidade de criptas ileais, permitiram a classificação dos animais em três grupos distintos – sabidamente positivos, cujas análises permitiram a identificação da *Lawsonia intracellularis* no citoplasma dos enterócitos, suspeitos, cujos resultados foram negativos para a presença do agente, mas positivos ao exame patológico e sabidamente negativos, cujos resultados não evidenciaram a bactéria no citoplasma dos enterócitos e não apresentavam qualquer alteração macroscópica e/ou microscópica. Os valores médios de peso, diâmetro e espessura do íleo, obtidos para cada um destes grupos, foram comparados entre si. A partir desses valores foi possível estabelecer equações capazes de classificar as amostras futuramente analisadas, em negativas ou suspeitas, apenas com o emprego de paquimetria e pesagem, com uma eficiência

superior a 90%. Concluiu-se que tal método de monitoramento serve de triagem e pode ser empregado em frigoríficos com o intuito de se estabelecer quais lotes apresentam alterações entéricas dignas de atenção especial.

Palavras-chave: enterite proliferativa suína, ileíte, íleo, peso, espessura, diâmetro.

## USE OF WEIGHT AND MONITORING CALIPER IN ILEITIS SWINE IN SLAUGHTERHOUSES

**ABSTRACT** - The complex of porcine proliferative enteropathy (PPE), caused by the bacteria *Lawsonia intracellularis*, is an infectious disease of great importance to pigs during the growing and ending and for the young adults. Characterized by determining proliferative disorders, hemorrhagic and necrosis of the small intestine (ileum)'s final portion. It is a worldwide occurrence disease and particularly affects animals of high genetic value, type of health programs from SPF (*Specific Pathogen Free*), being responsible for important economic losses, either due to death or failure in the of animals' productive performance. With the main goal to develop rapid and inexpensive methodology for standardized monitoring of lesions on the slaughter line this study was accomplished. During the slaughter in slaughterhouses located in Ipuã-SP and Tupã-SP, samples were picked at random from final portions of the ileum from 156 pigs, all castrated, of commercial strains, with approximately 150 days old and weighing 110 kg. After standardized in length, to exactly 10 centimeters, the samples were submitted to the caliper to check the thickness and diameter, and weighing on a precision scale. They were, after all carefully inspected and palpated, externally and internally, in order to identify gross lesions of ileitis, and the results of these tests recorded on proper and individual forms. Fragments of tissue were harvested and immersed in 10% neutral formalin for subsequent histopathological analysis. Microscopic examination of sections of ileum stained with hematoxylin and eosin are subjected to impregnation with the silver - the technique of Warthin-Starry (WAS) modified, as well as the histomorphometric analysis, checking the length of the villi and ileal crypt depth, allowing the classification of animals into three distinct groups - known to be positive, whose analysis allowed the identification of *Lawsonia intracellularis* in enterocytes's cytoplasm, suspects, whose results were negative for the agent's presence, but positive in the the pathological examination and negative known results did not show bacteria in the enterocytes's cytoplasm and did show no gross lesions or microscopic alteration. The average values of weight, diameter and thickness of ileum, obtained for each of these groups were compared. From these values it was possible to establish equations that can classify future samples analyzed, negative or suspect, only with the use of pachymetry and weighing with a superior efficiency of 90%. Concluding that this monitoring method is used for screening and can be used in refrigerators in order to establish which lot where the enteric alternation is shown, is worthy of special attention.

Keywords: porcine proliferative enteritis, ileitis, ileus, weight, thickness, diameter.

## 1. INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa suína (EPS), também designada como ileíte regional, adenomatose intestinal proliferante, enterite necrótica ou enterite proliferativa hemorrágica, representa enfermidade que afeta suínos desde o desmame até o estágio de adultos jovens.

A EPS ou simplesmente ileíte representa o conjunto de processos patológicos, agudos ou crônicos, que acomete várias espécies de mamíferos e aves, inclusive silvestres, ocorrendo, entretanto, mais frequentemente em suínos. Sendo essa espécie a mais importante do ponto de vista econômico-produtivo, acometendo principalmente os animais nas fases de recria e terminação.

Tal afecção entérica é causada por bactéria que tem atuação intracelular obrigatória, denominada *Lawsonia (L.) intracellularis*. Devido a esta característica, induz apenas resposta imunológica fraca e variável em suínos. Sendo assim, os métodos microbiológicos e sorológicos não apresentam resultados satisfatórios para o diagnóstico de rotina.

Os animais infectados pela *L. intracellularis* apresentam hiperplasia da mucosa intestinal com progressiva substituição dos enterócitos maduros e colunares das vilosidades, por células pouco diferenciadas, muito semelhantes às células do epitélio das criptas intestinais. Acredita-se que a diarreia observada em casos de EPS seja por má absorção, consequência da hipotrofia de vilosidades e/ou da presença de células imaturas hiperplásicas com reduzida expressão de proteínas e transportadores de membrana. Essas são as teorias mais aceitas da patogenia para justificar a redução do ganho de peso e atraso no crescimento dos animais afetados. Porém, ainda são desconhecidos os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela diarreia e pela diminuição do desempenho zootécnico dos animais.

Os sinais clínicos não são patognomônicos, sendo observada diminuição do apetite, diarreia e, em alguns casos, morte dos animais. Porém, há alteração patológica comum, visível à necropsia, caracterizada pelo espessamento da mucosa

do intestino delgado (íleo) associado à proliferação de células das criptas intestinais e diminuição da quantidade de células calciformes. A doença já foi descrita em vários países com suinocultura tecnificada, dentre eles o Brasil e afeta predominantemente suínos de alto valor genético. Por isto determina grande morbidade e prejuízos econômicos consideráveis à suinocultura, em muitos países.

Na Austrália, estima-se que custe à indústria cerca de US\$20/porca/ano. Nos Estados Unidos US\$98 milhões de dólares são perdidos anualmente. Em áreas endêmicas, 15 a 30% dos rebanhos são afetados.

O controle da doença nos rebanhos é realizado com base no monitoramento de lesões no íleo, durante o processo de abate, nos frigoríficos. A capacitação para o reconhecimento das lesões, só é adquirida com a prática e representa fator limitante no trabalho de profissionais ainda jovens e inexperientes. Por basear-se apenas na percepção visual e tátil do examinador, perde a eficiência pela subjetividade. Amostras negativas para um profissional podem ser positivas para outro.

Por isso a necessidade de viabilizar o emprego da paquimetria e da pesagem (métodos simples, objetivos, práticos e de baixo custo) de amostras de íleo de suínos, na detecção da EPS, durante o processo de abate.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Etiologia

O primeiro relato sobre a ocorrência de EPS ocorreu em 1931, caracterizou a enfermidade como uma alteração proliferativa transmissível (BIESTER e SCHWARTE, 1931). Mais de 40 anos depois, Rowland et al. (1973) relacionaram as lesões proliferativas à presença de um microorganismo intracelular situado na porção apical de células das criptas intestinais.

Só que o isolamento bacteriano e sua manutenção *in vitro* foi feito pela primeira vez por Lawson e McOrist (1993). No mesmo ano, a doença foi induzida experimentalmente e a bactéria reisolada, cumprindo os requisitos do postulado de Koch (McORIST et al., 1993). O microorganismo foi classificado dentro da subdivisão delta de Proteobacteria (GEBHART et al., 1993) com taxonomia distinta de outras bactérias intracelulares. Baseado no sequenciamento do DNA ribossômico 16S, a bactéria, previamente descrita como organismo *Campylobacter-like*, *Ileal symbiont intracellularis* e *Ileobacter intracellularis*, foi classificada como sendo de novo gênero e nova espécie dentro da família das Desulfovibrionaceas, e chamada de *Lawsonia intracellularis* (McORIST et al., 1995a) em homenagem ao pesquisador escocês, Dr. Gordon H. K. Lawson.

A *L. intracellularis* tem dimensões pequenas (cerca de 1,25-1,75µm de comprimento e 0,25-0,43µm de largura), curva, Gram negativa, microaerófila e não formadora de esporos (LAWSON & McORIST, 1993). Através de microscopia eletrônica foi observado um flagelo longo e unipolar. Contudo, o mesmo não foi identificado quando a bactéria encontrava-se no citoplasma de enterócitos (LAWSON & GEBHART, 2000). No ano de 2002 foi finalizado o sequenciamento do genoma da bactéria sendo composto por um cromossomo circular e três plasmídeos, totalizando 1344 genes (GEBHART & KAPUR, 2002).

## 2.2 Epidemiologia

Mesmo sendo evidenciada e relatada mais frequentemente em suínos (FACCINI et al., 2005; ZLOTOWSKI et al., 2008), a enterite proliferativa (EP) já foi descrita em hamsters (JOHNSON e JACOBY, 1978), cobaias (ELWELL et al., 1981), equinos (DUHAMEL e WHEELDON, 1982), ratos (VANDENBERGHE et al., 1985), furões (FOX e LAWSON, 1988), raposas (ERICKSON et al., 1990), cães (LEBLANC et al., 1993), veados (DROLET et al., 1996), coelhos (HOTCHKINS et al., 1996), emas (LEMARCHAND et al., 1997), avestruzes (COOPER et al., 1997b), macacos (KLEIN et al., 1999), camundongos (SMITH et al., 2000), bovinos, porcos-espinhos e girafas (HERBST et al., 2003). Acredita-se que animais de vida livre possam ser reservatórios e potenciais transmissores da afecção. Tal suspeita foi levantada após detecção do microorganismo em fezes de mamíferos selvagens, capturados nos arredores de haras com histórico de animais com enterite proliferativa (PUSTERLA et al., 2008).

Apesar de relatos da existência da EP em primatas não humanos, até o momento não foi observada a infecção por *L. intracellularis* no homem. As características anatomopatológicas da enterite proliferativa são similares às observadas na doença intestinal inflamatória humana (doença de Crohn), contudo, a *L. intracellularis* não foi identificada em pacientes com a doença (MICHALSKI et al., 2006).

Atualmente, pouco se sabe sobre a epidemiologia molecular do agente da EPS. A transmissão ocorre por via oro-fecal por meio da ingestão do agente presente nas fezes de animais infectados (JORDAN et al., 2004). Os suínos infectados podem eliminar aproximadamente  $10^8$  organismos de *L. intracellularis* por grama de fezes e a eliminação do agente pode persistir por até três meses (SMITH & McORIST, 1997; GUEDES & GEBHART, 2003b). A colonização intestinal pela bactéria foi detectada por 14 dias em suínos inoculados oralmente com fezes mantidas a 23°C, evidenciando

também a sobrevivência do microorganismo por até 2 semanas à temperatura ambiente (COLLINS et al., 2000). Foi possível infectar leitões pela inoculação oral de  $10^3$  organismos de *L. intracellularis* (COLLINS et al., 2001).

Animais que apresentam a enfermidade subclínica não manifestam quadros de diarreia, típicos da doença, por terem sido submetidos a infecção por poucos microorganismos, entretanto, apresentam baixo desempenho zootécnico e são capazes de eliminar o agente, portanto são importantes fontes de infecção para animais suscetíveis (GUEDES & GEBHART, 2003b). Também foi comprovado que suínos clinicamente saudáveis que eliminavam *L. intracellularis* nas fezes tiveram menor desempenho que animais sadios que não eliminavam o agente nas fezes (JACOBSON et al., 2003).

### **2.3 Patogênese**

Sabe-se que a *L. intracellularis* tem tropismo por células do epitélio intestinal, sendo os mecanismos envolvidos na patogênese da EPS determinados pela infecção e posterior hiperplasia de enterócitos presentes na região das criptas intestinais (LAWSON & GEBHART, 2000). Entretanto, ainda não estão bem esclarecidos os fatores de virulência envolvidos na infecção (GEBHART & GUEDES, 2004). O mecanismo por meio do qual a *L. intracellularis* se adere e penetra a célula não é conhecido. Entretanto, McCluskey e colaboradores identificaram o gene denominado Lsa A que é transcrito e traduzido pela *L. intracellularis* durante a infecção, com possível importância durante a adesão e entrada da bactéria nas células epiteliais imaturas. Esse gene é responsável pela síntese de algumas proteínas de superfície que se ligariam a receptores específicos presentes na superfície apical de enterócitos (McCLUSKEY et al., 2002). Ainda através da análise da sequência genética do microorganismo foram identificadas regiões homólogas aos fatores de membrana Yop

(proteína externa da *Yersinia*) indicando que o sistema de secreção tipo III, encontrado em bactérias enteropatogênicas Gram negativas, pode auxiliar no processo de invasão e evasão do sistema imune do hospedeiro (GEBHART & GUEDES, 2004; KROLL et al., 2005). Há indícios de que possa haver uma associação de eventos que promova a penetração da bactéria na célula alvo.

Primeiramente, ocorre a interação entre antígenos de superfície da *L. intracellularis* e receptores específicos presentes na superfície externa apical do enterócito imaturo (McORIST et al., 1997a). Posteriormente, utilizando-se de processo endocítico, envolvendo polimerização de actina pela célula epitelial, a bactéria penetra na célula (LAWSON et al., 1995).

Sabe-se que o mecanismo de invasão não depende da viabilidade da bactéria. Células eucariotas são capazes de internalizar organismos de *L. intracellularis* fixados em formol (LAWSON et al., 1995). O bloqueio do metabolismo e do citoesqueleto celular por citocalasina D reduziu significativamente a invasão bacteriana, mas ainda assim houve infecção pelo microorganismo, portanto, outros mecanismos podem estar envolvidos nesse processo (GEBHART & GUEDES, 2004).

Neste contexto, a *L. intracellularis* parece ser internalizada por indução de mecanismos específicos de endocitose (LAWSON & McORIST, 1993). Em seguida, ocorre formação de vacúolo intracitoplasmático, com posterior liberação da bactéria para o citoplasma (McORIST et al., 1995b). Especula-se que a *L. intracellularis*, assim como *Shigella*, *Listeria*, *Clostridium piliforme* e algumas espécies de *Rickettsia*, seja capaz de produzir toxinas (citolisinas ou hemolisinas) que possibilitam sua saída do vacúolo intracitoplasmático e da digestão lisossômica, sendo então liberada no citoplasma do enterócito infectado, podendo assim se multiplicar livremente (GUEDES & GEBHART, 2003c). Tal atividade citolítica foi observada em pesquisa com infecção *in vitro* da *L. intracellularis* (GEBHART & GUEDES, 2004).

A maior parte dos estudos sobre a patogênese da EP é realizada *in vivo*. As lesões caracterizam-se por proliferações dos enterócitos imaturos, levando ao

espessamento da mucosa do íleo, do ceco e, menos frequentemente, da mucosa do cólon (LAWSON & GEBHART, 2000). A primeira alteração observada na infecção pela *L. intracellularis* é a hiperplasia da mucosa intestinal com progressiva substituição de enterócitos maduros, colunares e absortivos das vilosidades, por células pouco diferenciadas, semelhantes às células do epitélio das criptas intestinais (SMITH & McORIST, 1997). A alteração proliferativa está diretamente relacionada à infecção e replicação bacteriana. Entretanto, os mecanismos que promovem essa hiperplasia ainda não estão esclarecidos (KROLL et al., 2005; GUEDES, 2007).

A redução temporária de mecanismos indutores de apoptose pela *L. intracellularis* poderia favorecer as alterações proliferativas. Na fase de resolução das lesões, a ausência da bactéria nos enterócitos associa-se ao aumento do número de células bem diferenciadas (McORIST et al., 1996). Contudo, Machuca et. al. (1999) demonstraram aumento da apoptose nas vilosidades e criptas hiperplásicas de suínos com ileíte. Ainda, a identificação de caspase-3, por IHQ, foi significativamente maior em criptas hiperplásicas, comparadas com as criptas normais (GUEDES, 2002).

Com exceção das características proliferativas, até o momento não foram observados outros efeitos citopatológicos nos enterócitos infectados *in vitro* ou *in vivo* (GEBHART & GUEDES, 2004). A inflamação pode ser observada nos estágios mais tardios da doença, mas não é característica primária da infecção por *L. intracellularis*.

A avaliação ultra-estrutural das lesões da ileíte em suínos identificou a presença da *L. intracellularis* no lúmen das criptas intestinais associadas à membrana celular e em vacúolos intracitoplasmáticos (McORIST et al., 1989). As bactérias encontram-se livres no citoplasma, enquanto as células infectadas entram em mitose transmitindo o microorganismo para as células filhas (McORIST et al., 1995b). Eventualmente, bactérias são liberadas no lúmen intestinal, o que permite a expansão da infecção no íleo, jejuno, ceco e cólon. As células M, importantes no reconhecimento antigênico do epitélio intestinal, podem estar envolvidas na patogênese da ileíte, visto

a presença de lesões na região das placas de Peyer nas fases iniciais da infecção (McORIST et. al., 1993).

Em suínos, a infecção experimental identificou a bactéria a partir do quinto dia após a inoculação do microorganismo. Por um lado, as lesões microscópicas foram observadas no 11º dia pós-infecção (GUEDES, 2002). Por outro contudo, usando marcação imunoistoquímica, não foram observadas lesões macroscópicas e histológicas até 29 dias após a infecção experimental de suínos (McORIST et al., 1987; GEBHART & GUEDES, 2004).

O crescimento e manutenção *in vitro* da *L. intracellularis* permitiu a realização de estudos dos mecanismos envolvidos na entrada da bactéria em células suscetíveis e a evolução da infecção em cultura celular (LAWSON & GEBHART, 1993). Embora não haja proliferação celular *in vitro*, a infecção em monocamada de células demonstrou a dinâmica da invasão celular pela bactéria. McORIST et al. (1995b) observaram contato íntimo entre a *L. intracellularis* e a superfície de células eucariotas (IEC-18 e IPEC-J2) 10 minutos após a exposição à bactéria, sendo o microorganismo encontrado em vacúolos intracitoplasmáticos uma hora pós-exposição. A partir de três horas, a bactéria pode ser observada livre no citoplasma. Então a bactéria multiplicou-se por divisão binária formando protrusões celulares repletas de *L. intracellularis*, ruptura e liberação do agente no meio extracelular entre o segundo e o sexto dia no citoplasma celular.

A replicação bacteriana no citoplasma das células das criptas intestinais associa-se a quadros de diarreia em animais infectados experimentalmente a partir do sétimo dia após inoculação oral da bactéria. Contudo, até o momento os mecanismos fisiopatológicos determinantes para diarreia na EPS ainda não são conhecidos (MOESER & BLIKSLAGER, 2007). A partir da hiperplasia das criptas intestinais, especula-se a possível redução na expressão de proteínas e transportadores de membrana na superfície celular comprometendo a capacidade de absorção. Fisiologicamente, as células das criptas possuem canais iônicos na superfície apical

responsáveis pela secreção de íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) (WELSH et al., 1982). A possível expressão destes canais na membrana apical de células hiperplásicas poderia intensificar a secreção no epitélio intestinal, contribuindo para processo diarréico. Além disso, é conhecido que células das criptas e do ápice das vilosidades apresentam diferenças quantitativas e qualitativas de suas proteínas de membrana celular. Por exemplo, enterócitos imaturos das criptas apresentam número significativamente maior de proteínas que formam bombas de co-transporte de íons sódio e bicarbonato (SEIDLER et al., 2001). Esse fato pode ajudar a explicar a diarréia, em animais com hiperplasia de mucosa. A avaliação da expressão gênica de enterócitos hiperplásicos, talvez possa mostrar o aumento quantitativo de algumas proteínas e a diminuição de outras. Contudo, o envolvimento de mecanismos secretórios ou absorptivos na patogênese da EP não está esclarecido.

## **2.4 Sinais Clínicos**

Em suínos, a EP apresenta três formas clínicas distintas - a aguda, a crônica e a subclínica. A apresentação aguda, também chamada de enteropatia proliferativa hemorrágica, acomete suínos de 4 a 12 meses, normalmente animais de reposição ou próximos ao abate. Esta síndrome é caracterizada por diarréia hemorrágica resultando em morte súbita do animal, o qual se encontra pálido e com hemorragia intestinal profusa (LAWSON & GEBHART, 2000).

A forma crônica ocorre em leitões em crescimento entre 2 e 4 meses de idade e caracteriza-se por anorexia, redução no ganho de peso, diminuição do crescimento e desuniformidade entre animais da mesma idade e diarréia transitória (LAWSON & GEBHART, 2000; GUEDES, 2007). A diarréia, por ser transitória, muitas vezes é considerada de pouca importância pelo tratador, pois imagina que a doença se resolveu, com o desaparecer da diarréia.

Quando a EPS é induzida experimentalmente os sinais clínicos começam a ser observados de sete a dez dias após a inoculação do agente, ou seja, o período de incubação da EP é de aproximadamente sete dias (LAWSON & GEBHART, 2000; GUEDES, 2002). As bactérias ingeridas ou inoculadas por via intragástrica colonizam o terço médio e final do intestino delgado, ceco e cólon, resultando em proliferação das células epiteliais das criptas de Lieberkühn no intestino delgado e glândulas mucosas do intestino grosso, com subsequente espessamento da mucosa intestinal (JUBB et al., 1993; HUERTA et al., 2003). Ponto importante a ser considerado é que animais infectados, mesmo que não apresentem diarreia, sofrem redução de desempenho zootécnico durante algum período da infecção (FRANÇA, 2007).

## **2.5 Lesões**

Independentemente da espécie acometida, a alteração macroscópica mais evidente é o espessamento da mucosa intestinal, sendo facilmente identificada à necropsia. Em suínos, o exame intestinal de animais mortos subitamente pode ser determinante para confirmação da forma aguda da EP. As lesões normalmente são observadas no íleo e caracterizam-se por espessamento da parede intestinal, edema e congestão do mesentério, rugosidade da mucosa, com pregas bem evidentes e conteúdo intestinal fibrinohemorrágico associado à presença de coágulos (MORÉS et al., 1985). Embora o íleo seja o segmento intestinal mais afetado, as lesões podem ser encontradas do duodeno ao reto (GUEDES, 2002).

As lesões macroscópicas que se associam à forma crônica da enfermidade são observadas com maior frequência em suínos (KROLL et al., 2005). Além do espessamento da parede intestinal e da maior evidência das pregas da mucosa, placas de material necrótico podem estar presentes, aderidas à superfície do intestino (WARD & WINKELMAN, 1990). À necropsia, as alterações podem ser discretas,

caracterizadas por edema de mesentério associado à lesão proliferativa focal. Nesses casos, a avaliação das lesões é subjetiva e depende da experiência do médico veterinário observador (GUEDES et.al., 2002). Sendo assim, torna-se necessário o envio de amostras para realização de exame histopatológico, visando a confirmação do diagnóstico.

As características histopatológicas da EP independem da espécie acometida e da apresentação clínica. As lesões caracterizam-se por proliferação das células das criptas de Lieberkühn no intestino delgado associado a presença de microorganismo intracelular no citoplasma apical desses enterócitos (ROWLAND & LAWSON, 1974). As criptas tornam-se alongadas, dilatadas, há maior presença de células imaturas e elevado índice mitótico. Há significativa redução no número de células caliciformes nas criptas afetadas (GEBHART & GUEDES, 2004). A infiltração de células inflamatórias é mínima e não constitui característica marcante da enfermidade.

## **2.6 Diagnóstico**

Desde a primeira descrição da doença, o diagnóstico da EP tem como fundamento a avaliação clínica e anatomopatológica, por meio do exame macroscópico da mucosa intestinal, para avaliação da presença de lesões proliferativas associadas às alterações histológicas de hiperplasia das criptas intestinais observadas pela coloração de hematoxilina-eosina (HE) (ROWLAND & HUTCHINGS, 1978), da demonstração da bactéria intracelular em secções de tecido coradas pela coloração com nitrato de prata, conforme técnica de Warthin-Starry (WS) e pela detecção de *Lawsonia intracellularis* por meio de ensaio de imunofluorescência (JONES et al., 1993a; JORDAN et al., 1999).

A bactéria pode ser demonstrada na porção apical de enterócitos imaturos por técnicas histoquímicas de coloração pela prata (ROWLAND & LAWSON, 1974;

MORÉS et al., 1985), imunofluorescência indireta (McORIST et al., 1987), hibridização *in situ* fluorescente (GEBHART et al., 1994; BOYE et al, 1998) e imunoistoquímica (JENSEN et al., 1997) usando anticorpo específico contra *L. intracellularis* (McORIST et al., 1987). A partir de estudo comparativo utilizando anticorpos específicos para *L. intracelullaris*, Guedes et al. (2002) demonstraram que a técnica de imunoistoquímica é mais sensível que a coloração histológica de HE, WS e reação em cadeia da polimerase de amostras fecais.

O exame macroscópico dos intestinos durante o processo de abate tem sido usado em estudos epidemiológicos. Os resultados, porém, são contraditórios, o que deve ser explicado pela sensibilidade e especificidade da técnica (JONES et al., 1993a), demonstrando que ainda não existe uma padronização. O uso da coloração HE como diagnóstico, está restrito aos casos que demonstram evidente proliferação dos enterócitos, presente nos processos moderados e severos de EPS (GUEDES et al., 2002). Modificações na técnica de coloração com nitrato de prata de WS (YOUNG, 1969) são satisfatórias para uso de rotina e o diagnóstico positivo é determinado pela presença da bactéria no citoplasma dos enterócitos proliferados (McORIST & GEBHART, 1999).

Ao longo dos anos, o desenvolvimento de técnicas diagnósticas sensíveis e específicas permitiu o reconhecimento da doença também *antemortem* com identificação do microorganismo ou de anticorpos específicos para *L. intracelullaris*. Porém, os testes sorológicos têm aplicação restrita dada a necessidade de manutenção *in vitro* da *L. intracellularis* como fonte de antígeno - poucos laboratórios no mundo têm conseguido manter culturas puras desta bactéria (GUEDES et al., 2002).

Alguns trabalhos descrevem o sucesso e a aplicabilidade das técnicas moleculares para o diagnóstico da EPS. Moreno et al. (2002), utilizando fezes de 1215 suínos de importantes regiões produtoras do Brasil, demonstraram com sucesso a sensibilidade da PCR para estudos epidemiológicos, o que de fato foi descrito por

Jones et al. (1993a), mostrando que a técnica de PCR pode identificar *L. intracellularis* a partir de  $10^3$  por g de fezes. Na República Tcheca, Tomanova et al. (2006) demonstraram a presença de *L. intracellularis* em 9,1% nas amostras de tecido (íleo e linfonodo) provenientes de suínos selvagens utilizando a técnica conhecida como Nested-PCR, corroborando com os achados de Plawinska et al. (2004), que descreveram com sucesso a mesma técnica para diagnóstico individual em suínos acometidos pela EPS. Recentemente, a PCR em tempo real (RT-PCR) foi utilizada com sucesso para a quantificação de *L. intracellularis* em suínos acometidos pelas formas aguda e subclínica (GOY et al. 2008).

Em suínos, outras infecções entéricas devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da EP. Na forma aguda, a coleta de tecidos para exames bacteriológicos são importantes para descartar suspeitas de enterocolite por *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e infecções por *Brachyspira hyodysenteriae* (disenteria suína). Ainda, úlceras gástricas e síndrome intestinal hemorrágica também devem ser consideradas (GUEDES et al., 2002). Os diagnósticos diferenciais da forma crônica da EPS devem incluir doenças que cursam com diarreia persistente, como gastroenterite transmissível enzoótica, infecções por *Brachyspira pilosicoli* (colite espiroquetal), disenteria suína, enterocolite por *S. enterica* sorotipo Typhimurium, colibacilose e hipersensibilidade a soja (GUEDES, 2007).

## 2.7 Controle

A EPS causa importantes perdas econômicas para a indústria suinícola mundial (LAWSON & GEBHART, 2000; LEE et al., 2001; GUEDES, 2003). Nos EUA, esse prejuízo equivale a aproximadamente 98 milhões de dólares anuais (LAWSON & GEBHART, 2000). Por esse motivo, é importante a utilização de métodos para o controle da doença, que é realizado principalmente pela utilização de antimicrobianos,

administrados na ração, na água de beber ou por injeção intramuscular (BANE et al., 2001).

Diversos estudos foram conduzidos para se conhecer drogas eficientes no controle e tratamento da EPS. Diferentes antimicrobianos mostraram eficácia no tratamento e controle da doença, merecendo destaque os macrolídeos, as tetraciclina, lincosamidas e pleuromitilinas. Fármacos do grupo dos macrolídeos são os mais utilizados em suínos e equinos (LEE et al., 2001; ATHERTON & MCKENZIE, 2006).

A avaliação da eficiência de antimicrobianos *in vivo* tem sido realizada utilizando-se da indução experimental da EP em suínos (FRANÇA, 2007). Neste contexto, a redução da eliminação de bactérias nas fezes, detectada por PCR, a diminuição da extensão e severidade das lesões macroscópicas no intestino e a melhora no desempenho de animais testados são os parâmetros avaliados (SCHWARTZ et al., 1999; WALTER et al., 2001). Entretanto, seu uso deve ser criterioso, pois a utilização de posologia inadequada pode aumentar a probabilidade de ocorrência de surtos de doenças entéricas (BANE et al., 2001). A escolha do princípio ativo do antimicrobiano deve ter como fundamento o conhecimento farmacológico e custo da droga, idade dos animais e presença de outras enfermidades concomitantes, como salmonelose, disenteria suína, espiroquetose colônica, micoplasmose e pasteurelose, que possam ser controladas pelo mesmo antimicrobiano (GUEDES, 2003).

A administração de antimicrobianos para tratamento de EPS deve ser considerada em duas situações principais. A primeira em rebanhos com a forma crônica da EPS, nos quais a mortalidade é mínima, mas existe impacto significativo no desempenho zootécnico. Nestes casos, a antibioticoterapia tem como principal objetivo melhorar os índices produtivos da granja. A segunda situação é quando existe a forma aguda ou hemorrágica da EPS, e o objetivo do tratamento é minimizar a

mortalidade e reduzir as chances de ocorrência da doença em lotes subseqüentes (LAWSON & GEBHART, 2000).

Atualmente, o controle da EPS é realizado utilizando pulsos de antimicrobianos na ração por duas semanas, com intervalos de três semanas na fase final de creche, recria e terminação (GUEDES, 2007). Este protocolo terapêutico tem sido empregado em rebanhos com a forma crônica da doença, nos quais a mortalidade é mínima, contudo produz impacto positivo e significativo no desempenho produtivo dos animais. Desta forma, estimar o momento ideal de uso de um ou vários pulsos de antimicrobianos é um dos segredos do sucesso dos programas de controle. A interrupção de tratamento prolongados, usualmente adotada no período pré-abate, pode favorecer ao surgimento de casos agudos da doença (GUEDES et al., 2002a).

Além do uso de antimicrobianos, métodos alternativos de controle da EPS têm sido estudados. Dentre eles, o uso de vacina viva modificada, Enterisol Ileitis, vendida na forma liofilizada, que está disponível comercialmente em vários países do mundo, inclusive no Brasil. A aplicação desta vacina tem mostrado desenvolvimento de imunidade humoral e celular (GUEDES & GEBHART, 2003b), contra a *Lawsonia intracellularis*, melhorando assim o ganho de peso diário (GPD) em aproximadamente 30 gramas, quando comparado com animais não vacinados (KROLL et al., 2004; McORIST & SMITH, 2006; YAMAGUCHI et al., 2006) e possibilita reduzir a utilização de antimicrobianos na ração (BAK & RATHKJEN, 2009).

Alguns estudos têm mostrado os efeitos benéficos do uso de promotores de crescimento em animais afetados por EPS. Apesar disso, o efeito dessas substâncias sobre a doença é pouco conhecido (LAWSON & GEBHART, 2000). Por exemplo, o uso prolongado de promotores de crescimento poderia interferir na dinâmica da infecção de *L. intracellularis* no rebanho, induzindo com isto a formação de lotes de animais totalmente suscetíveis, que desenvolveriam a forma aguda da doença tardiamente, quando da retirada destas drogas da ração. Desta forma, não é possível

utilizar promotores de crescimento com o intuito de permitir baixos níveis de exposição a *L. intracellularis* e desenvolvimento de imunidade.

O emprego de acidificantes, adicionados à ração, representa alternativa para o controle da EPS. Sua eficiência, porém, ainda é motivo de muita especulação. Teoricamente, haveria diminuição significativa do pH intestinal, o que resultaria em morte de grande número de bactérias entéricas (BOESEN et al., 2004), inclusive de *L. intracellularis* presentes no lume intestinal. Assim, o número destes microrganismos que conseguiriam penetrar nos enterócitos seria menor. Entretanto, esta diminuição de pH do conteúdo intestinal, provavelmente não resultaria em alterações do pH citosólico dos enterócitos, não havendo interferência na viabilidade dos microrganismos (*L. intracellularis*) que estivessem no interior destas células.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Estudar a viabilidade de estabelecimento de metodologias simples, baratas e práticas para monitoramento da ileíte suína comprovada por exames anatomopatológicos e histomorfometria.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a eficiência e viabilidade do uso de paquímetro para a mensuração da espessura de fragmentos de íleo e estabelecer padrões para a diferenciação de animais afetados e não afetados pela ileíte;
- Avaliar a eficiência e viabilidade do uso da pesagem de fragmentos de íleo e estabelecer padrões para a diferenciação de animais afetados e não afetados pela ileíte.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Colheita, exame macroscópico, paquimetria e pesagem das amostras de íleo

Durante o processo de abate, em frigoríficos localizados em Ipuã-SP e Tupã-SP, foram colhidas amostras com aproximadamente 30cm da porção final do íleo de 156 suínos, todos castrados, de linhagens comerciais, idade entre 145 e 155 dias e peso entre 95 e 105 kg. Em seguida, estas amostras foram seccionadas com o auxílio de equipamento apropriado (Figura 1), para a obtenção de seguimento com exatos 10 cm.

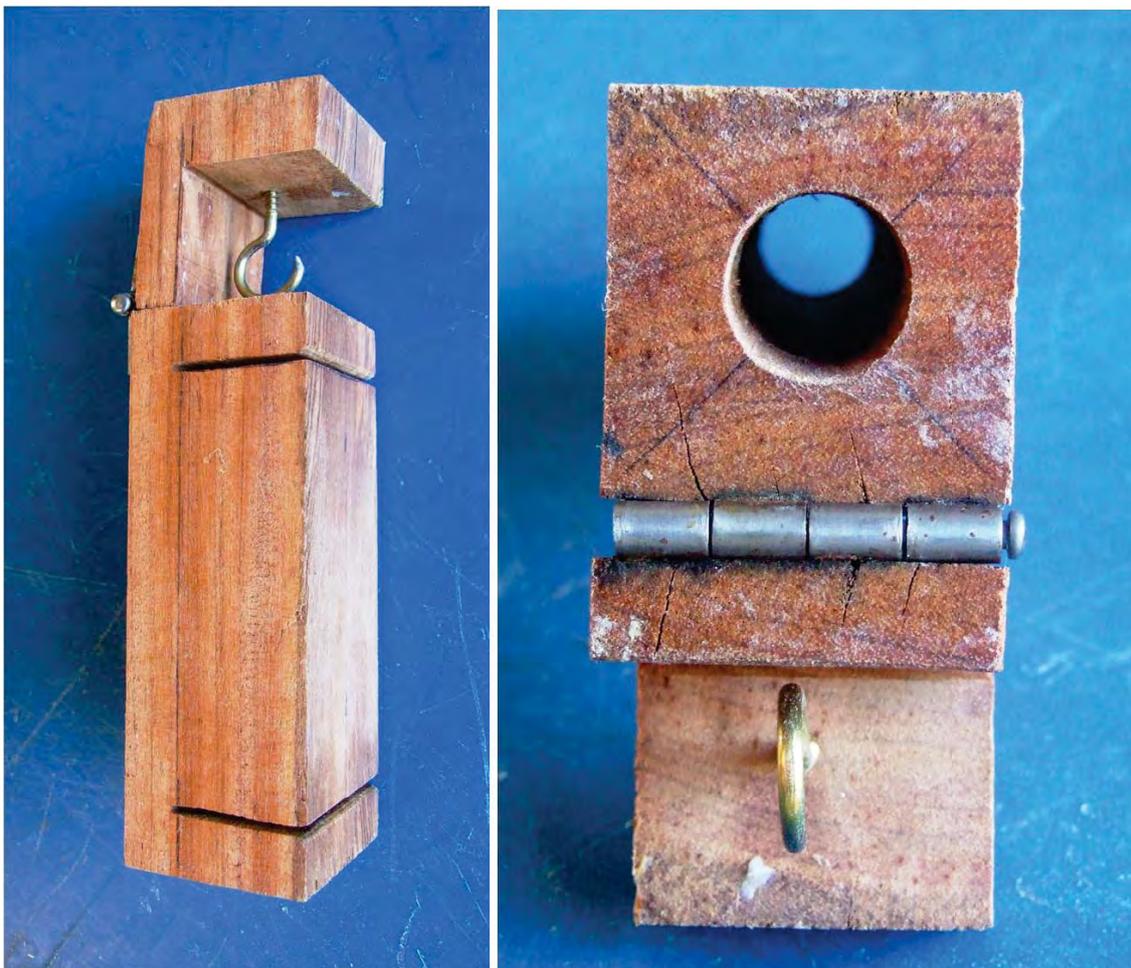


FIGURA 1: Equipamento desenvolvido para obtenção de amostras padronizadas, com 10 cm de comprimento. A amostra inicial de 30 cm era fixada ao gancho da parte superior do aparato e transpassada pelo interior do mesmo. A secção do íleo era realizada utilizando navalha histológica e orientada pelas ranhuras do aparato.

O fragmento obtido era em seguida pesado, mediante emprego de balança de precisão (Gehaka, modelo PG400, São Paulo, Brasil), sendo o valor (em gramas) registrado em ficha apropriada. Com o auxílio de paquímetro (Mitutoyo, Kawasaki, Japão) a espessura e o diâmetro externos do fragmento de íleo eram medidos e seus valores em centímetros eram devidamente registrados. Subseqüentemente, por inspeção e palpação, eram examinados externa e internamente à procura de lesões sugestivas de ileíte. Todas estas informações eram anotadas em fichas individuais apropriadas.

O material era identificado e fragmentos da parede do íleo eram colhidas e individualmente colocadas em frascos identificados contendo formalina a 10% neutra tamponada a 10%, para as análises posteriores.

Os responsáveis pelas granjas de origem dos animais foram inqueridos, de modo a obter o histórico das doenças já diagnosticadas no plantel.

#### **4.2 Exames anatomopatológicos**

No exame macroscópico das amostras procurou-se identificar, interna e externamente, lesões sugestivas de EPS, tais como o edema de mesentério e íleo, o espessamento da mucosa com diminuição do lúmen, o diâmetro total externo, na área de corte, e a consistência do referido órgão e a condição da mucosa ileal.

Após devidamente fixados os cortes de íleo foram processados, segundo as técnicas rotineiramente empregadas em histopatologia. Os cortes, com a espessura de 5 µm, foram corados com HE e examinados histopatologicamente em microscópio óptico comum. Neste exame investigou-se, em especial, a presença de lesões do tipo infiltrado inflamatório, quantidade de células calciformes, proliferação de enterócitos jovens e mitoses, bem como placas de Peyer reativas.

A impregnação com nitrato de prata - técnica de WS modificada (HUERTA et al. 2003) também foi utilizada, objetivando a visualização e identificação do agente, morfológicamente encurvado presente no citoplasma das células ileais. A confecção das lâminas histopatológicas, bem como as coloração das mesmas pelas técnicas de HE e coloração argêntica, foram realizadas no Departamento de Patologia Animal da FCAV – Jaboticabal, sendo as lâminas posteriormente analisadas com uso de microscópio ótico comum no Laboratório de Microbiologia de Suínos da FCAV.

### **4.3 Histomorfometria**

Para a realização das análises morfométricas da mucosa do íleo as preparações histológicas foram analisadas em microscópio apropriado (Leica, modelo DM5000B, Heerbrugg, Suíça) acoplado à câmera digital (Leica, modelo DFC300FX, Heerbrugg, Suíça), pela qual se capturavam as imagens e com o programa de análise (Leica, Leica Qwin® - Leica Image Processing and Analysis Software, Heerbrugg, Suíça) era possível aferir os parâmetros desejados para a realização do presente estudo. Foram mensuradas 30 vilosidades e 30 criptas de cada uma das amostras.

O comprimento da vilosidade (CV) foi tomado a partir de sua base, o que coincide exatamente com a porção superior das criptas. Traçaram-se duas retas paralelas, uma inferior - na base da vilosidade, e outra superior - tangenciando o ápice do vilo. A distância em  $\mu\text{m}$ , fornecida pelo analisador de imagens, entre estas duas retas paralelas correspondia ao comprimento do vilo no sentido longitudinal. A profundidade da cripta (PC) foi tomada da sua base até a região de transição cripta-vilo.

### **4.4 Formação dos Grupos**

A análise global dos resultados obtidos para cada animal permitiu que fossem classificados em três grupos distintos:

- **Grupo positivo** – composto apenas por animais sabidamente positivos, ou seja, cujas amostras apresentavam alterações macroscópicas e microscópicas típicas da doença e evidencia da *L. intracellularis*;
- **Grupo suspeito** – composto por animais cujas amostras revelaram alterações macroscópicas ou microscópicas sugestivas da doença, mas que não tiveram o agente evidenciado na microscopia;
- **Grupo negativo** – composto por amostras sabidamente negativas, ou seja, que não apresentavam alterações no exame macroscópico e microscópico e que não foi evidenciada a *L. intracellularis* ao exame microscópico.

#### 4.5 Análises Estatísticas

Os dados obtidos para cada um dos animais e grupos foram submetidos a análise de variância. As médias obtidas para cada um dos grupos e para cada um dos parâmetros registrados foram comparadas entre si, mediante o emprego do teste de Tukey, a 5% de probabilidade (SAS, 1998).

A análise discriminante foi complementarmente realizada, objetivando não apenas verificar se havia distinção entre os grupos (positivo, negativo e suspeito), como o cálculo de equação que permitisse indicar se um determinado peso, espessura e diâmetro ileal, poderia classificar um animal em teste num dos três grupos referidos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Peso, Espessura e Diâmetro do Íleo

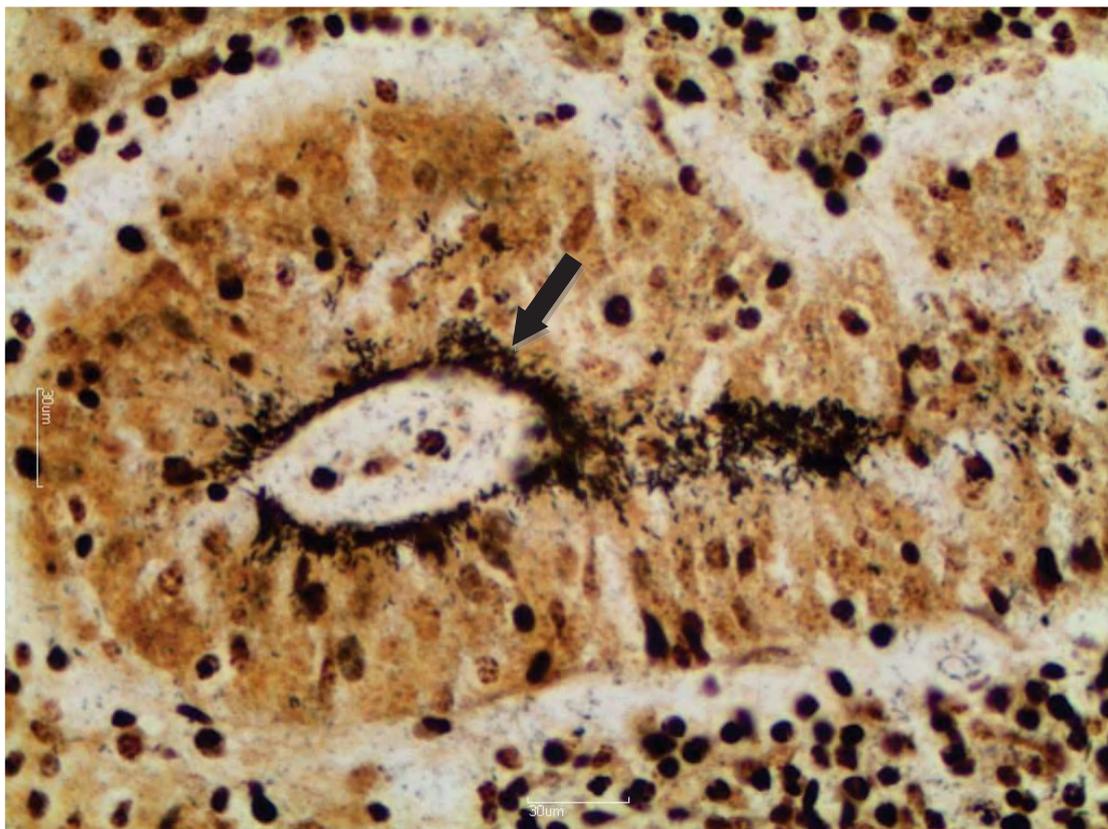
O peso das amostras de 10 cm de íleo dos animais envolvidos neste estudo indicou valores entre 7,64 e 21,66 gramas, com média geral de 13,18 gramas. A espessura, por outro lado, variou entre 1 e 10 mm, com média de 5 mm e o diâmetro 0,6 a 1,5 mm, com a média de 1,06 mm.

### 5.2 Exames Anatomohistopatológicos

O exame macroscópico das porções de íleo dos 156 suínos envolvidos neste estudo mostrou espessamento da parede intestinal, edema e congestão do mesentério e maior evidência das pregas da mucosa, como principais alterações. Das amostras analisadas, 61,54% não apresentavam qualquer alteração, seja pela inspeção, seja pela palpação. O restante (38,46%) mostrava algum grau de alteração.

Presença de infiltrado inflamatório e placas de Peyer reativas, diminuição no número de células caliciformes e elevada presença de enterócitos jovens, foram as alterações registradas ao exame microscópico em 89 amostras (57,05%) examinadas. As demais 67 amostras (42,95%), não apresentavam qualquer tipo de alteração.

A impregnação pela prata (FIG. 2) permitiu a identificação da *L. intracellularis* em apenas 18 amostras (11,54%). Em parte das demais, embora pudessem apresentar alterações indicativas de ileíte, não foi detectada a presença do agente.



**FIGURA 2** - Lâmina corada pela técnica de Warthin-Starry (WS) onde é possível evidenciar a bactéria *L. intracellularis* no citoplasma celular (aumento de 400x).

### 5.3 Morfometria

As análises morfométricas revelaram aumento significativo no comprimento das vilosidades e na profundidade de criptas das amostras positivas para a presença da *L. intracellularis* no citoplasma apical, detectadas pela coloração argêntica, quando comparadas às vilosidades e criptas das amostras classificadas como suspeitas ou negativas (TABELA 1).

**TABELA 1.** Médias e desvios-padrão para o comprimento das vilosidades e profundidade das criptas da porção final do íleo de suínos positivos, suspeitos ou negativos para ileíte. Jaboticabal, 2011.

Variável	Infecção por <i>L. intracellularis</i>		Coef. de Var. (%)	F
	Positivos	Negativos e Suspeitos		
Comprimento da vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	377,14 $\pm$ 73,79 <sup>a</sup>	273,85 $\pm$ 14,26 <sup>b</sup>	15,14	<0,0001
Profundidade da cripta ( $\mu\text{m}$ )	91,52 $\pm$ 18,10 <sup>a</sup>	71,28 $\pm$ 3,14 <sup>b</sup>	12,65	0,0002

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem pelo teste T ( $P>0,05$ ).

#### 5.4 Avaliação Global dos Resultados

A avaliação conjunta dos resultados obtidos nos exames realizados nas amostras de íleo, colhidas de cada um dos animais envolvidos neste estudo, possibilitou classificar e distribuir as amostras nos três grupos distintos - positivo, suspeito e negativo. Através de Análise de Variância foi possível verificar que havia diferença estatística entre as médias dos grupos formados para as variáveis peso, espessura e diâmetro médios do íleo. Na tabela 2, exposta a seguir, podem ser vistas as médias de peso, espessura e diâmetro do íleo obtido em cada um dos grupos, sendo comparadas entre si pelo teste de Tukey Studentizado com 5% de probabilidade.

**TABELA 2.** Teste de Tukey Studentizado com 5% de probabilidade comparando as médias das variáveis (peso, espessura e diâmetro) de cada grupo entre si.

Grupo	N	Peso $\pm$ Desv.Padr.	Espessura $\pm$ Desv.Padr.	Diametro $\pm$ Desv.Padr.
Negativo	61	10,70 $\pm$ 1,41 c	0,36 $\pm$ 0,10 b	0,96 $\pm$ 0,11 b
Suspeito	77	15,15 $\pm$ 2,43 a	0,59 $\pm$ 0,13 a	1,14 $\pm$ 0,15 a
Positivo	17	13,47 $\pm$ 3,07 b	0,56 $\pm$ 0,20 a	1,12 $\pm$ 0,20 a

Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey Studentizado com 5% de probabilidade.

### 5.5 Discriminação dos grupos e elaboração das equações matemáticas.

Através de análise discriminante foi possível delimitar espacialmente cada um dos três grupos e observar que os mesmos apresentavam alto grau de distinção entre si. Distinção maior foi verificada entre o grupo negativo e os demais. Esse parâmetro foi significativo, entre os grupos suspeito e positivo. Para isto, foram verificadas as distâncias entre os centróides (TABELA 3) dos três grupos, sendo as mesmas avaliadas estatisticamente (TABELA 4).

**TABELA 3.** Distância entre os centróides de cada um dos três grupos formados (positivo, suspeito e negativo) – *Squared Mahalanobis Distances* – onde é possível observar o quão distante os grupos são entre si.

<b>Grupos</b>	<b>Negativo</b>	<b>Suspeito</b>	<b>Positivo</b>
<b>Negativo</b>	...	5.03	2.98
<b>Suspeito</b>	5.03	...	0.74
<b>Positivo</b>	2.98	0.74	...

**TABELA 4.** Confiabilidade estatística da distância entre os centróides dos grupos (positivo, suspeito e negativo) – *P-levels* – demonstrando estatisticamente a significância dos valores obtidos quando aferidas as distâncias entre os centróides desses mesmos grupos.

	<b>Negativo</b>	<b>Suspeito</b>	<b>Positivo</b>
<b>Negativo</b>	...	0.0000	0.0000
<b>Suspeito</b>	0.0000	...	0.024
<b>Positivo</b>	0.0000	0.024	...

Ainda por meio da análise discriminante foram calculadas funções que permitam classificar em negativas, suspeitas ou positivas, utilizando apenas os valores obtidos na pesagem e paquimetria, novas amostras de íleo de outros suínos em idade de abate. Para estes cálculos, os valores obtidos devem ser substituídos pelas incógnitas das três fórmulas (P=peso; E=espessura, D=diâmetro). Serão obtidos

resultados numéricos para cada uma das equações. A amostra analisada será classificada como pertencente ao grupo da equação cujo cálculo der o maior resultado. Essas funções estão descritas abaixo.

$$\text{Negativo} = -24.8589 + 0.9395P - 0.9637E + 39.6376D$$

$$\text{Suspeito} = -37.9999 + 1.5741P + 7,0406E + 40.9369D$$

$$\text{Positivo} = -36.1592 + 1.0776P + 8.7649E + 43.3845D$$

O grau de significância de cada variável das equações foi especificado através da análise da função discriminante. Estes valores podem ser vistos na tabela 5. Verifica-se que a variável mais significativa para a classificação das amostras foi o peso, seguido da espessura e diâmetro respectivamente.

**TABELA 5.** Análise das funções discriminantes das variáveis do modelo, demonstrando o grau de significância de cada uma das variáveis (peso, espessura e diâmetro) dentro das equações.

	<b>Valor de F</b>	<b>P</b>
<b>Peso</b>	11,3537	0,000026
<b>Espessura</b>	8,2244	0,000408
<b>Diâmetro</b>	1,1325	0,324952

Por meio desta análise discriminante é possível observar que as variáveis significantes da equação são, por ordem de importância, o peso e a espessura, sendo o diâmetro pouco influente como elemento discriminatório.

A eficiência do método variou entre os grupos, sendo mais satisfatória para os negativos e suspeitos (TABELA 6).

**TABELA 6.** Matriz de classificação das amostras de íleos de suínos coletadas segundo as funções criadas e o percentual de acerto das mesmas.

	<b>Negativo</b>	<b>Suspeito</b>	<b>Positivo</b>	<b>Percentual de acerto</b>
<b>Negativo</b>	57	4	0	93,44
<b>Suspeito</b>	7	70	0	90,9
<b>Positivo</b>	9	7	1	5,88

A matriz anterior indica que, utilizando apenas as equações resultantes do presente estudo, é possível classificar amostras de óleo colhidas em frigoríficos como suspeitas ou negativas para EPS com confiabilidade superior a 90%.

## 6. Discussão

O presente estudo, conforme exposto, objetivou avaliar se a pesagem ou mensuração da espessura ou do diâmetro de amostras de íleo, poderiam ser empregadas como meio auxiliar no diagnóstico da ileíte em suínos, durante o processo de abate.

A coloração WS modificada foi empregada para a identificação dos animais infectados pela *L. intracellularis*. Embora em um número relativamente pequeno de animais, o uso da técnica permitiu a visualização da bactéria que se concentrava no ápice das células ileais. Quando em grande quantidade, formava aglomerados cuja justaposição conferia à porção apical das células epiteliais coloração marrom-escura. A eficiência da coloração argêntica para detecção de bactérias intracelulares já foi descrita anteriormente (ROWLAND & LAWSON, 1974; MORES et al., 1985) e pode ser usada para identificação da bactéria na parte apical do citoplasma de enterócitos durante exame ao microscópio óptico (WILLIAMS et al., 1996; COOPER et al., 1997b; FRANK et al., 1998; AL-GHAMDI, 2003; WUERSCH et al., 2006).

Desta maneira, conforme já verificado por outros autores, pode-se reafirmar que a coloração pelo nitrato de prata deva ser considerada como método de confirmação da doença (ROWLAND & LAWSON, 1974; WILLIAMS et al., 1996; COOPER et al., 1997b; FRANK et al., 1998; LAVOIE et al., 1998 e 2000; BREES et al., 1999; LAVOIE & DROLET, 2002; AL-GHAMDI, 2003; BIHR, 2003; WUERSCH et al., 2006; KIMBERLY et al., 2007). Entretanto, para o diagnóstico da doença é recomendado que haja associação entre a presença do microrganismo e as lesões histopatológicas para confirmar a doença (MACEDO et al., 2008).

O exame *post-mortem* é realizado para reconhecimento das lesões macroscópicas associadas às alterações histológicas de hiperplasia das criptas intestinais observadas pela coloração de HE (ROWLAND & HUTCHINGS, 1978).

Segundo Smith e McOrist, (1997) a primeira alteração observada na infecção pela *L. intracellularis* é a hiperplasia da mucosa intestinal. Todas as amostras positivas

colhidas apresentaram espessamento da parede intestinal, edema e congestão do mesentério e maior evidenciação das pregas da mucosa, corroborando com França (2007) que descreveu ainda, serosa intestinal apresentando aspecto cerebriode.

A hiperplasia da mucosa é ocasionada pela progressiva substituição de enterócitos maduros e colunares das vilosidades, por células pouco diferenciadas, semelhantes às células do epitélio das criptas intestinais (McORIST et al., 1996; SMITH & MCORIST, 1997). As criptas são alongadas, alargadas e forradas por células epiteliais imaturas ocorrendo muitos eventos de mitose (MCORIST & GEBHART, 1999).

Todas as lâminas foram analisadas para avaliar a presença ou a ausência de lesões histológicas. Nas lâminas positivas para EPS (confirmadas pela visualização do agente etiológico por meio de coloração argêntica) no material original havia alongamento das vilosidades e extensa proliferação do epitélio com aprofundamento das criptas (TABELA 1). O trabalho realizado por Vannucci (2009) descreve hiperplasia caracterizada pela presença de vilosidades longas e tortuosas. Em alguns cortes histológicos, foram observadas criptas com a luz extremamente reduzida, em razão do aumento das camadas de células epiteliais. Segundo Smith e McOrist (1997), na EPS há substituição de enterócitos maduros e colunares das vilosidades, por células pouco diferenciadas, semelhantes às células do epitélio das criptas intestinais, levando à hiperplasia dos enterócitos presentes na região das criptas intestinais (LAWSON & GEBHART, 2000) que podem ser observadas pela coloração de HE (ROWLAND & HUTCHINGS, 1978).

Entretanto, alguns cortes histológicos, apresentaram criptas compostas por uma única camada de células achatadas, com luz de diâmetro bastante aumentado, contendo restos de células epiteliais e células inflamatórias, sendo também observada diminuição na proporção entre células caliciformes e enterócitos. Sabe-se que na EPS há redução marcante do número de células caliciformes nas criptas afetadas (LAWSON & GEBHART, 2000) ou essas podem ainda estar ausentes (ROWLAND &

LAWSON, 1992). Ainda nos animais positivos, foram também observadas a presença, acima do comum, de mitoses, frequentes no epitélio das criptas infectadas, acompanhadas de enterócitos imaturos e pouco diferenciados. Esta alteração já foi descrita por McOrist e Gebhart, (1999) e França (2007).

Outros parâmetros, como presença de infiltrado inflamatório e reatividade das placas de Peyer foram analisados, porém, não foram encontrados exclusivamente nas amostras positivas. Sabe-se que lesões histológicas proliferativas acompanhadas de hiperplasia do tecido linfóide associado ao intestino, infiltração inflamatória linfocitária e neutrofílica na lâmina própria e submucosa, a presença de células multinucleadas e macrófagos com características epitelióides, caracterizam as lesões da íleite em estudos realizados Faccini et al. (2005) e Vannucci (2009).

Boa parte das amostras classificadas visualmente como negativas apresentavam infiltrado inflamatório contendo neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, acompanhado de placas de Peyer reativas, o que sugere enterites causadas por outros agentes ou por sensibilidade alimentar.

Com todas as informações obtidas pela metodologia empregada neste estudo, foi possível estabelecer com segurança quais os animais que eram inquestionavelmente portadores de EPS, quais não o eram e quais eram suspeitos, no conjunto de animais examinados. Com isto, foi possível determinar se havia correlação entre a positividade para a doença e as variáveis mensuradas (o peso, a espessura e o diâmetro do íleo).

Evidenciou-se neste estudo, prevalência de 11,54% para o parasitismo por *L. intracellularis*. Tal resultado corrobora observações de Rowland e Hutchings (1978), Winkelman (1996) e McOrist (1997), que com levantamentos realizados em abatedouros demonstraram variações de prevalência entre 0,7% e 12%. Faccini et al. (2005) também verificaram valores de prevalência que se enquadram na variação referida, observando prevalência de 3% em frigoríficos localizados no estado do Rio Grande do Sul. Ainda no Brasil, foi detectada prevalência de 13,8% em animais

provenientes dos estados de São Paulo e Santa Catarina (BACCARO et al., 1998), indicando valor aproximado ao obtido no presente estudo. Entretanto, valores superiores foram encontrados por Poleze (2009) e Alberton et al. (2011), que verificaram maiores prevalências da doença em suínos de granjas situadas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás (39,3%), e Mato Grosso (16,78%), respectivamente.

O número de casos positivos, porém, pode estar subestimado, visto que a sensibilidade da inspeção ao abate pode ser baixa para detectar doenças cujas lesões se resolvam previamente (STEVENSON, 1996). Devido à elevada taxa de renovação do epitélio intestinal (POINTON, 1989), animais afetados por EPS podem se recuperar e não apresentar lesões no momento do abate (HOLYOAKE et al., 1994).

O método desenvolvido mostrou-se bastante efetivo para determinar se as amostras avaliadas devem ser consideradas livres de qualquer afecção entérica ou se apresentam alterações que possam estar interferindo negativamente na produtividade da granja monitorada.

## CONCLUSÕES

Por meio de metodologia e das análises empregadas no presente estudo, foi possível identificar a presença de *Lawsonia intracellularis* em amostras de íleo de suínos em dois frigoríficos paulistas, causando alterações intestinais macroscópicas de peso, espessura e diâmetro do íleo dos animais e microscópicas.

Os métodos testados para serem utilizados no monitoramento da EPS durante o processo de abate foram pouco eficientes, especificamente (5,88%). Porém, podem ser de grande valia na detecção de enterites, independentemente da causa, já que conseguiram, com elevada eficiência (>90%), separar as amostras consideradas suspeitas das negativas.

Pode-se, desta forma, afirmar que o presente estudo viabilizou o estabelecimento de metodologia eficiente, simples, fácil, rápida e barata para o monitoramento não da ileíte causada pela *Lawsonia intracellularis*, mas das ileítes, específicas e não específicas, dos suínos em idade de abate.

## REFERÊNCIAS

AL-GHAMDI, G. **Characterization of proliferative enteropathy in horses**. 2003. 157f. Tese (PhD em Clínica) - of Veterinary Medicine, University of Minnesota, Minnesota, USA.

ALBERTON, E.L. Prevalência da enteropatia proliferativa suína causada por *Lawsonia intracellularis* em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2011. 39(1): 943.

ARMBRUSTER G.A., DEEN J., GEBHART C.J., PELGER G.A., KEFFABER K.K.; PARKS C.W. Review of *Lawsonia intracellularis* seroprevalence screening in the United States, June 2003 to July 2006. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARY – ANNUAL MEETING, 38, 2007, Orlando. **Proceedings...** Florida: AASV, 2007. p.231-234.

ATHERTON, R.P.; MCKENZIE III, H.C. Alternative antimicrobial agents in the treatment of proliferative enteropathy in horses. **J. Equine Vet. Sci.**, Wildomar, v.26, p.535-541, 2006.

BACARRO M.R., MORENO A.M; COUTINHO L.L. Porcine proliferative enteritis: histopathological aspects and diagnosis using polymerase chain reaction. In: *Proceedings of the 15th Congress of Internacional Pig Veterinary Society*, Birmingham. 1998. p.108.

BAK, H.; RATHKJEN, P.H.S. Reduced use of antimicrobials after vaccination of pigs against porcine proliferative enteropathy in a Danish SPF herd. **Acta. Vet. Scand.**, Copenhagen, v.51, p.1-13, 2009.

BANE, D.P.; NEUMANN, E.; GEBHART, C.J.; GARDNER, I.A.; NORBY, B. Porcine proliferative enteropathy: a case-control study in swine herds in the United States. **J. Swine Health Prod.**, Perry, v.9, n.4, p.155-158, 2001.

BIESTER, H.E.; SCHWARTE, L.H. Intestinal adenoma in swine. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.7, p.175-185, 1931.

BIHR, T.P. Protein-losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weanling foal. **Can. Vet. J.**, v.44, p-65-66, 2003.

BOESEN, H.T.; JENSEN, T.K.; SCHMIDT, A.J.; JENSEN, B.B.; JENSEN, S.M.; MØLLER, K. The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.103, p.35-45, 2004.

BOYE, M.; JENSEN, T. K.; MOLLER, K.; LESER, T.D.; JORSAL, S.E. Specific detection of *Lawsonia intracellularis* in porcine proliferative enteropathy inferred from fluorescent rRNA in situ hybridization. **Vet. Pathol.**, Washington, v.35, p.153-156, 1998.

BREES, J.; SONDHOFF, A.H.; KLUGE, J.P. et al. *Lawsonia intracellularis*-like organism infection in a miniature foal. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n. 4, p. 511-514, 1999.

COLLINS, A.M.; DIJK, M.V.; VU, N.Q. et al. Immunity to *Lawsonia intracellularis*. In: ALLEN D. LEMAN CONFERENCE, 28, 2001, Minneapolis. *Anais...*Saint Paul: Veterinary Outreach Programs/UMN 2001. p. 115-120.

COLLINS, A.M.; LOVE, R.J.; POZO, J. et al. Studies on the *ex vivo* survival of *Lawsonia intracellularis*. *Swine Health Prod.*, v.8, p.211-215, 2000.

COOPER, D.M.; SWANSON, D.L.; BARNS, S.M.; GEBHART, C.J. Comparison of the 16S ribosomal DNA sequence from the intracellular agent of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.47, p.635-639, 1997a.

COOPER, D.M.; SWANSON, D.L.; GEBHART, C.J. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer, and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.54, p.47-62, 1997b.

COOPER, D.M.; GEBART, C.J. Comparative aspects of proliferative enteritis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.212, p.1446-1451, 1998.

CORZO, C.A.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C.; BLACKWELL, T. Comparison of 2 serologic tests for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v.46, p.433-435, 2005.

DITTMAR, M.; HOELZLE, L.E.; HOELZLE, K.; SYDLER, T.; CORBOZ, L.; MISEREZ, R.; WITTENBRINK, M.M. Diagnosis of porcine proliferative enteropathy: Detection of *Lawsonia intracellularis* by pathological examinations, polymerase chain reaction and cell culture inoculation. **J. Vet. Med.**, Washington, v.50, p.332-338, 2003.

DRIEMEIER, D.; FACCINI, G.S.; OLIVEIRA, R.T.; COLODEL E.M.; TRAVERSO S.D.; CATTANI, C. Silver staining combined to alcian-blue and hematoxylin-eosin for

detection of swine proliferative enteropathy. **Acta Histochem.**, v.104, p. 285-287, 2002.

DROLET, R. et al. Proliferative enteritis in white-tailed deer. **J. Vet. Diag. Invest.**, Davis, v.8, p.250-253, 1996.

DUHAMEL, G. E.; WHEELDON, E. B. Intestinal adenomatosis in a foal. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 19, p. 447-450, 1982.

ELDER, R.O.; DUHAMEL, G.E.; MATHIESEN, M.R.; ERICKSON, E.D.; GEBHART, C.J.; OBEST, R.D. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, and salmonellae in porcine intestinal specimens. **J. Vet. Diag. Invest.**, Davis, v.9, p.281-286, 1997.

ELWELL, M.R.; CHAPMAN, A.L.; FRENKEL, J.K. Duodenal hyperplasia in a guinea pig. **Vet. Pathol.**, Washington, v.181, p.136-139, 1981.

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

FACCINI, G.S.; GUEDES, R.M.C.; PESCADOR, C.A.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Diagnóstico histoquímico e imunoistoquímico da enteropatia proliferativa (*Lawsonia intracellularis*) em suínos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.57, p.569-575, 2005.

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

FRANK, N; FISHMAN, C.E.; GEBHART, C.J., LEVY, M. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal. **Equine Vet. J.**, London, v.30, n.6, p.549-552, 1998.

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

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

GEBHART, C.J.; GUEDES, R.M.C. *Lawsonia intracellularis*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G. et al. (Ed). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p.363-372.

GEBHART, C.J; KAPUR, V. **Whole genome sequence of *Lawsonia intracellularis* PHE/MN1-00**, 2002. Disponível em: <[http://www.genome.jp/keggbin/show\\_organism?org=lip/](http://www.genome.jp/keggbin/show_organism?org=lip/)>. Acesso em: 26 ago. 2010.

GEBHART, C.J.; McORIST, S.; LAWSON, G.H.K.; COLLINS, J.E.; WARD,G.E. Specific in situ hybridization of the intracellular organism of porcine proliferative enteropathy. **Vet. Pathol.**, Washington, v.31, p.462-467, 1994.

GUEDES, R.M.C. Enteropatia proliferativa suína (ileíte). **Cad. Tec. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.42, p.45-56, 2003.

GUEDES, R.M.C. Enteropatia proliferativa. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed.) *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cânone Editorial, 2007. p.109-116.

GUEDES, R.M.C. *Lawsonia intracellularis* infection: a recurring problem in pigs in Brazil. **Acta Sci. Vet.**, Porto Alegre, v.36, n.1, p.77-80, 2008. Suplemento.

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

GUEDES, R.M.C. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. **J. Swine Health Prod.**, Perry, v.12, p.134-138, 2004.

GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; WINKELMAN, N.L.; MACKIE-NUSS, R.A.C.; MARSTELLER, T.A.; DEEN, J. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. **Can. J. Vet. Res.**, Ottawa, v.66, p.99-107, 2002.

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 enteropathy. **Can. J. Vet. Res.**, Ottawa, v. 66, p. 258-263, 2002a.

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

GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 15, n. 5, p. 438-446, 2003c.

GOY, D. N. et al. Quantification of *Lawsonia intracellularis* in porcine faecal samples by Real-Time PCR. **Pigprogres OR.** 03.41., 2008.

HEIJDEN, H.M.J.F.; BAKKER, J.; ELBERS, A.R.W.; VOS, J.H.; WEYNS, A.; SMET, M.; McORIST, S. Prevalence of exposure and infection of *Lawsonia intracellularis* among slaughter-age pigs. **Res. Vet. Sci.**, London, v.77, p.197-202, 2004.

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

HOLYOAKE, P.K.; CUTLER, R.S.; CAPLE, I.W. A diagnostic dilemma: detecting proliferative enteritis in pigs at slaughter. **Aust. Vet. J.**, v.71, p.308-309, 1994.

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

HUERTA, B.; ARENAS, A.; CARRASCO, L.; MALDONADO, A.; TARRADAS, C.; CARBONERO, A.; PEREA, A. Comparison of diagnostic techniques for porcine proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis* infection). **J. Comp. Path.**, Edinburgh, v.129, p.179-185, 2003.

JACOBSON, M.; ASPAN, A.; HELDTANDER KÖNIGSSON, M.; HARD AF SEGERSTAD, C.; WALLGREN, P.; FELLSTRÖM, C.; JENSEN-WAERN, M.; GUNNARSON, A. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.102, p.189-201, 2004.

JACOBSON, M.; SEGERTAD, C.H.; GUNNASRSSON, A. Fellstrom, C.; DE VERDIER KLINGENBERG, K.; WALLGREN, P.; JENSEN-WAERN, M. Diarrhoea in the growing pig – a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. **Res. Vet. Sci.**, London, p.74, v.163-169, 2003.

JASNI, S.; McORIST, S.; LAWSON, G.H.K. Experimental induced proliferative enteritis in hamsters: an ultra-structural study. **Rec.Vet. Sci.**, v.56, p.186-192, 1994.

JENSEN, T.K.; MÖLLER, 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. **Eur. J. Vet. Pathol.**, v.3, p.115-123, 1997.

JOENS, L.A.; NIBBELINK, S.; GLOCK, R.D. Induction of gross and microscopic lesions of porcine proliferative enteritis by *Lawsonia intracellularis*. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.58, p.1125-1131, 1997.

JOHNSON, E. A.; JACOBY, R. O. Transmissible ileal hyperplasia of hamsters. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 91, n. 3, p. 451-459, 1978.

JONES, G.F.; DAVIES, P.R.; ROSE, R.; WARD, G.E.; MURTAUGH, M.P. Comparison of techniques for diagnosis of proliferative enteritis of swine. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.54, p.1980-1985, 1993a.

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

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

JORDAN, D.M.; KNITTED, J.P.; ROOF, M.B.; SCHWARTZ, K.J.; HOFFMAN, L.J. Detection of *Lawsonia intracellularis* in swine using polymerase chain reaction methodology. **J. Vet. Diag. Investig.**, Davis, v.11, p.45-49, 1999.

JUBB, K.; KENNEDY, P.; PALMER, N. Infectious and parasitic diseases of the gastrointestinal tract. In: **Pathology of domestic animals**, San Diego : Academic Press, 1993. v. 2, p. 228-233

KIMBERLY, M.; MCGURRIN, J.; MODEST VENGUST; M., Arroyo, L.G.; Baird, J.D. An outbreak of *Lawsonia intracellularis* infection in a standardbred herd in Ontario al.. **Can. Vet. J.**, v. 48, p. 927- 930, 2007.

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

KNITTEL, J.P.; JORDAN, D.M.; SCHWARTZ, K.J.; JANKE, B.H.; ROOF, M.B.; McORIST, S.; HARRIS, D.L. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.59, p.722-726, 1998.

KROLL, J.J.; ROOF, M.B.; HOFFMAN, L.J.; DICKSON, J.S.; HARRIS, D.L. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. **Anim. H. Res. Rev.**, v.6, p.173-197, 2005.

KROLL, J. J.; ROOF, M. B.; McORIST, S. Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 65, n. 5, p. 559-565, 2004.

LANTZ, P.G.; AL-SOUD, W.A.; KNUTSSON, R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RADSTRÖM, P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. **Biotechnol. Ann. Rev.**, v.5, p.87-130, 2000.

LAVOIE, J.P.; DROLET, R. Proliferative enteropathy in foals. In: Mair, T; Divers, T; Ducharme, N. **Manual of equine gastroenterology**. 1st ed. WB Saunders pp, 2002. p. 508-509.

LAVOIE, J.P.; PARSONS, D; DROLET, R. Proliferative enteropathy in foals: A cause of colic, diarrhea, and protein-losing enteropathy. **AAEP Proceedings.**, v.44, 1998.

LAWSON, G.H.K.; GEBHART, C.J. Proliferative enteropathy: review. **J. Comp. Path.**, Edinburgh, v.122, p.77-100, 2000.

LAWSON, G.H.K.; MACKIE, R.A.; SMITH, D.G.E. **et al.** Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont *intracellularis* depends on host-cell function and actin polymerization. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.45, p.339-350, 1995.

LAWSON, G.H.K.; McORIST, S. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. **J. Comp. Path.**, Edinburgh, v.108, p.41-46, 1993.

LEBLANC, B.; FOX, J. G.; LE NET, J. L.; MASSON, M.T.; PICARD, A. Hyperplastic gastritis with intraepithelial *Campylobacter*-like organism in a beagle dog. **Vet. Pathol.**, Washington, v.30, p.391-194, 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 tilosin in Korea. **J. Vet. Sci.**, Suwon, v.2, p.209-212, 2001.

LEMARCHAND, T.X.; TULLY, T.N.Jr.; SHANE, S.M.; DUNCAN, D.E. Intracellular *Campylobacter*-like organisms associated with rectal proliferative enteroproctitis in emus (*Dromaius novaehollandiae*). **Vet. Pathol.**, Auburn, v. 34, p.152-156, 1996.

MACEDO, N.R.; AL-GHAMDI, G.; GEBHART, C.J.; GUEDES, R.M.C. **Enteropatia proliferativa em eqüinos**. *Cienc. Rural* [online]. 2008, vol.38, n.3, pp. 889-897. ISSN 0103-8478.

MACHUCA, M. A.; QUIROGA, M. A.; RIGANTI, J.; MASSONE, A.R.; IDIART, J.R.; ARMOCIDA, A.D.; PERFUMO, C.J. Porcine proliferative enteropathy: immune labeling of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 9, 1999, Belo Horizonte, **Anais...**Belo Horizonte: FEP-MVZ/UFMG Editora, 1999. p.11.

McCLUSKEY, J.; HANNIGAN, J.; HARRIS, J.D.; WREN, B.; SMITH, D.G. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection *in vitro* and *in vivo*. **Infect. Immun.**, v.70, p.2899-2907, 2002.

McORIST, S., BOID, R., LAWSON, G. H. K. Monoclonal antibodies to intracellular *Campylobacter*-like organisms of the porcine proliferative enteropathies. **Vet. Rec.**, London, v. 121, p. 421-422, 1987.

McORIST, S.; GEBHART, C.J. Porcine proliferative enteropathies. In: TAYLOR, D.J.; STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L. (Ed.) **Diseases of swine**. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.521-534.

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

McORIST, S.; GEBHART, C.J.; LAWSON, G.H.K. Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.41, p.205-212, 1994.

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

McORIST, S.; JASNI, S.; MACKIE, R. A.; MAcINTYRE, N.; NEEF, N.; LAWSON, G.H.K. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure culture of *Ileal symbiont intracellularis*. **Infect. Immun.**, v.61, p.4286-4292, 1993.

McORIST, S.; LAWSON, G.H.K. Possible relationship of proliferative enteritis in pigs and hamsters. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.15, p.293-302, 1987.

McORIST, S.; LAWSON, G.H.K. Proliferative enteropathies: *Campylobacter* species in the faeces of normal and contact pigs. **Vet. Rec.**, London, v.124, p.40, 1989.

McORIST, S.; LAWSON, G.H.K.; ROWLAND, A.C.; MacINTYRE, N. Early lesions of proliferative enteritis in pigs and hamsters. **Vet. Pathol.**, Washington, v.26, p.260-264, 1989.

McORIST, S.; MACKIE, R.A.; LAWSON, G.H.K. Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont *intracellularis* isolated from pigs with proliferative enteropathy. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.5, p.1314-1317, 1995b.

McORIST, S.; MACKIE, R.A.; LAWSON, G.H.K.; SMITH, D.G. In vitro interactions of *Lawsonia intracellularis* with cultured enterocytes. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 54, p. 385-392, 1997a.

McORIST, S.; ROBERTS, L.; JASNI, S.; ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.; GEBHART, C.J., BOSWORTH, B. Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenic mechanisms. **J. Comp. Pathol.**, Edinburgh, v.115, p.35-45, 1996.

McORIST, S.; SMITH, S.H. Field evaluation of the ileitis vaccine in Australia. In: IPVS CONGRESS, 19., 2006, Copenhagen. **Proceedings...**v.2, p.196.

MICHALSKI, C.W.; MOLA, F.F.; KUMMEL, K.; WENDT, M.; KONINGER, J.S.; GIESE, T.; GIESE, N.A.; FRIESS, H. Human inflammatory bowel disease does not associate with *Lawsonia intracellularis* infection. **BMC Microbiol.**, v.6, p.1-7, 2006.

MOESER, A.M.; BLIKSLAGER, A.T. Mechanisms of porcine diarrhea. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.231, p.56-67, 2007.

MORENO, A.M.; BACCARO, M.R.; COUTINHO, L.L. *Lawsonia intracellularis* detection in swine feces from important producing regions in Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, p.5-8, 2002.

MORÉS, N; NOGUEIRA, R.H.G.; NEVES, O.S. et al. Diagnóstico clínico e anatomohistopatológico de casos espontâneos de enterite proliferativa hemorrágica dos suínos (EPH). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.37, p.29-37, 1985.

MÖLLER, K.; JENSEN, T.K.; JORSAL, S.E.; LESER, T.D.; CARSTENSEN, B. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.62, p.59-72, 1998.

PLASWINSKA, J. KLIMCZAK, Z. JAKUBOWSKI, T.; KLAWE, W.; BINEK, M. Nested PCR and IFAT in the diagnosis of porcine proliferative enteritis. **Bull Vet. Inst. Pulawy**, Pulawy, v.48, p.247-250, 2004.

POINTON, A.M. *Campylobacter* associated intestinal pathology in pigs. **Aust. Vet. J.**, v.66, p.90-91, 1989.

POLEZE, E. **Prevalência dos principais agentes infecciosos entéricos em rebanhos suínos avaliados nos Estados do RS, SC, PR, MS e GO**, 2009. Disponível em: < [http://pt.engormix.com/articles\\_view.aspx?AREA=POR165&id=136&pag=0](http://pt.engormix.com/articles_view.aspx?AREA=POR165&id=136&pag=0)>. Acesso em: 07 JAN. 2011.

PUSTERLA, N.; MAPES, S.; REJMANEK, D.; GEBHART, C. Detection of *Lawsonia intracellularis* by real-time PCR in the feces of free living animal from equine farms with documented occurrence of equine proliferative enteropathy. **J. Wild. Dis.**, Lawrence, v.44, p.992-998, 2008.

REGINA, M.; FALES, W.H.; WAGNER, J.E. Effects of antibiotic treatment on the occurrence experimentally induced proliferative ileitis of hamsters. **Lab. Anim. Sci.**, Memphis, v.30, p.38-41, 1980.

RISTOW, L.E.; ZICA, K.G.B.; BOTELHO, R.G.A.; SILVA, L. G. C. Evaluation of indirect immunofluorescent test and frequency of antibody detection for *Lawsonia intracellularis* against this bacterium in the state of Minas Gerais. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne. **Proceedings**...Melbourne: IPVS, 2000. p.78.

ROWLAND, A.C.; HUTCHINGS, D.A. Necrotic enteritis and regional ileitis in pigs at slaughter. **Vet. Rec.**, London, v.103, p.338-339, 1978.

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

ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K. Porcine proliferative enteropathies In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, S. et al. *Disease of swine*. 7.ed. Ames: Iowa State University, 1992. p.560-569.

ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K.; MAXWELL, A. Intestinal adenomatosis in the pig: occurrence of a bacterium in affected cells. **Nature**, London, v.247, p.417, 1973.

SAS INSTITUTE. The SAS system, Version 9.0. Raleigh: SAS Institute, 1998.

SCHWARTZ, K. et al. Effect of oral tiamulina on the development of porcine proliferative enteropathy in a pure-culture challenge model. **Swine Health Prod.**, Bloomington, v.7, p.5-11, 1999.

SEIDLER, U.; BACHMANN, O.; JACOB, P.; CHRISTIANI, S.; BLUMENSTEIN, I.; ROSSMANN, H. Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – co-transporte in normal and cystic fibrosis intestine. **J. Pancreas**, v. 2, n. 4, p. 247-256, 2001.

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

SMITH, S.H.; McORIST, S. Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. **Res. Vet. Sci.**, London, v.62, p.6-10, 1997.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L.F.; OLIVEIRA, S. **Clínica e Patologia Suína**. 2. ed. Goiânia: Art 3, 1999., p.63-67.

STEGE, H.; JENSEN, T.K.; MÖLLER, K.; VESTERGAARD, K.; BAEKBO, P.; JORSAL, S.E. Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in pig herds. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.104, p.197-206, 2004.

SUH, D.K. and SONG, J.C. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in swine intestinal specimens by multiples polymerase chain reaction. **J. Vet. Sci.**, Suwon, v.6, p.231-237, 2005.

TOMANOVA, K. D.; SMOLA, J.; TRKA, I.; LAMKA, J. PAVLIK, I. Detection of *Lawsonia intracellularis* in wild boar and follow deer bred in one game enclosure in the Czech Republic. **J. Vet. Med.**, Washington, v.43, p.42-44, 2006.

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

VANNUCCI, F.A. **Avaliação funcional e histomorfométrica do intestino de Syrian hamsters (*mesocricetus auratus*) experimentalmente Infectados com *lawsonia intracellularis***. 2009. Dissertação de mestrado (Medicina Veterinária, Patologia Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

WALTER, D.; KNITTEL, J.; SCHWARTZ, K.; KROLL, J.; ROOF, M. Treatment and control of porcine proliferative enteropathy using different tiamulin delivery methods. **J. Swine Health Prod.**, Perry, v.9, p.109-115, 2001.

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

WELSH, M.J.; SMITH, P.L.; FROMM, M.; FRIZZELL, R.A. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. **Science**, Washington, v.218, p.1219-1221, 1982.

WILLIAMS, N.M.; HARRISON, L.R.; GEBHART, C.J. Proliferative Enteropathy in a Foal Caused by *Lawsonia intracellularis* Bacterium. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, n.2, p. 254-256, 1996.

WINKELMAN, N.L.; DEE, S.D. Ileitis: an update. **Comp. Cont. Educ.**, v.19, p.519-525, 1996.

WUERSCH, K. et al. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a filly. **Journal Veterinary Medicine, series A. Physiology Pathology and Clinical Medicine**, Oxford, v.53, p.17-21, 2006.

YAMAGUCHI, T. Y.; TAKAHASHI, Y.; MIYASHITA, M.; KELLER, C.; ELBERS, K. A field safety and efficacy trial of enterisol ileitis vaccine in Japan. In: IPVS CONGRESS, 19., 2006, Copenhagen. Proceedings...v.2, p.199.

YOUNG, B. A reliable method for demonstrating spirochaetes in tissue sections. **J. Med. Lab. Technol.**, London, v.26, p.248-252, 1969.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA, A.M.R.; BORBA, M.R. et al. Enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* and porcine circovirus type 2 infection in wild boars in Southern Brazil. **Cienc. Rural.**, Santa Maria, v.38, p.2540-2544, 2008.

## **ANEXO I. Warthin-Starry (Modificações de Young)**

Os cortes desparafinados e reidratados foram lavados com tampão acetato (pH 3,8) e incubados em solução de nitrato de prata 1% por 1 hora a 60°C. A solução reveladora foi preparada pela dissolução de três soluções separadamente: 0,2 g de nitrato de prata em 9 ml de tampão acetato (Solução 1), 0,3 g de quinol em 8 ml de tampão acetato (Solução 2), e 3 g de gelatina em 45 ml de solução tampão acetato (Solução 3). As três soluções foram misturadas imediatamente antes do uso. A solução reveladora foi adicionada com agitação constante, até que os cortes obtivessem uma coloração marrom pálido. Eles foram então lavados com água imediatamente, desidratados e montados para exame com microscópio óptico.