

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANE CALEFFO

**FREQUÊNCIA DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS* E ROTAVÍRUS EM EQUINOS
CRIADOS NO OESTE PARANÁ**

PALOTINA
2017

TATIANE CALEFFO

**FREQUÊNCIA DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS* E ROTAVÍRUS EM EQUINOS
CRIADOS NO OESTE PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Setor de Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª Dra Aline de Marco Viott

PALOTINA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C148 Caleffo, Tatiane
Frequência de *lawsonia intracellularis* e rotavírus em equinos criados no oeste do Paraná / Tatiane Caleffo. – Palotina, 2016.
74f.

Orientadora: Aline de Marco Viott.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1. Enteropatia proliferativa equina. 2. Estudo de frequência. 3. Diarréia. 4. Cavalos. I. Viott, Aline de Marco. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.1.09



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TATIANE CALEFFO** intitulada: **FREQUÊNCIA DE *Lawsonia intracellularis* E ROTAVÍRUS EM EQUINOS CRIADOS NO OESTE DO PARANÁ**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Palotina, 20 de Fevereiro de 2017.

ALINE DE MARCO VIOTT
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO
Avaliador Interno (UFPR)

JULIANA SPEROTTO BRUM
Avaliador Externo (UFPR)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tatiane Caleffo, filha de Edna Aparecida Baptista Caleffo e Ailton Roberto Caleffo, concluiu sua graduação em Medicina Veterinária no ano de 2012 pela Universidade Estadual de Londrina. Em 2013 ingressou no Programa de Residência Multiprofissional em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Paraná Setor Palotina na área de Patologia Veterinária, sob a orientação da Prof^a Dr^a Aline de Marco Viott. No ano de 2015 ingressou no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná Setor Palotina, sob a orientação da mesma docente.

Para Thalia, e todos aqueles que
de alguma forma me acolheram no mundo
equestre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente é necessário agradecer a Deus por todas as oportunidades de crescimento e aprendizagem que Ele me proporcionou até então.

Mãe, a você meu 'muito obrigada' do mais fundo do meu coração. Você que foi uma verdadeira guerreira durante meus anos de graduação, residência e mestrado. Admiro e sou grata pela forma com que você e o pai me criaram e me ensinaram o que é certo. Pai, aonde quer que você esteja ali no céu, 'valeu' por tudo!

Aline, minha querida orientadora de residência e agora de mestrado, foram quatro anos de muito aprendizado contigo. Por vezes também foi minha irmã mais velha, minha amiga. Espero que o fim deste ciclo não seja o final dessa amizade.

Se a vida nos mostra irmãos de pais diferentes, estes foram o Luan e a Michele. Sem vocês a vida nessa cidade seria entediante. Aonde quer que eu vá, levarei vocês no coração!

Pri, Isa, Tom, Paula e Santaninha, o mestrado não teria sido tão legal sem vocês. Obrigada por todo o apoio e amizade. Izabel e Andressa, cada dia no laboratório era um aprendizado diferente com vocês, muito obrigada por todos os conselhos, dicas e incentivos de que daria tudo certo no final. Vocês estavam certas.

Dizem que quando os estribos se encostam, nasce uma grande amizade. E não foi diferente com a Michelle Ballester e o Fábio Taques. Grandes amigos que o CTG (centro de tradições gaúchas) me proporcionou. Obrigada por toda a companhia durante esses anos nessa 'grande' pequena cidade. Cafú e Lucimar, o casal que sempre me tratou como uma filha e por quem tenho um carinho especial, obrigada pela grande amizade, por cuidarem tão bem da minha Thalia, e por sempre me incentivarem a ser uma amazona melhor a cada dia. Obrigada Thalia, por conseguir ser tão compreensiva nos dias de estresse e por traduzir em gestos todo esse carinho que tem por mim.

Michelle Gabardo e Prof. Dr. Renato Guedes, obrigada por abrirem as portas da UFMG para parte do meu projeto, me ensinarem técnicas e fornecerem o controle positivo do meu experimento. Especialmente à Michelle pela amizade criada durante minha estadia em Belo Horizonte.

Aos colegas de laboratório da UFPR, obrigada por toda a ajuda no projeto.

Aos alunos de iniciação científica que sempre me ajudaram muito, Jéssica e Cheng, e às residentes Mayane e Mônica, que sempre estavam por perto para ajudar. Um 'obrigada' especial aos alunos Poliana, Luan e Lucas, que mesmo não sendo meus estagiários se propuseram a me ajudar nas coletas durante as férias. Sem esquecer da minha mãe, que também se tornou estagiária por um dia.

Ao "Like a Boss", e especialmente à Karina, Eliane e Aline, obrigada por se fazerem presentes na minha vida.

Luiz, você foi o último a entrar na minha vida, mas sem sua energia positiva e otimismo meus dias de estresse com o experimento talvez se prolongassem por semanas. Obrigada por estar presente no momento em que eu estava mais ausente, obrigada pela companhia, pela força, por todo o carinho e especialmente pela paciência.

*Desenhei então o interior da jiboia,
a fim de que as pessoas grandes
pudessem compreender. Elas tem sempre
necessidade de explicações.*

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A diarreia é um sinal clínico comum a diversas doenças, sejam de origem bacteriana, viral, ou parasitária. O diagnóstico correto da causa se torna fundamental para o tratamento adequado de potros. A *Lawsonia intracellularis* é um patógeno muito estudado em suínos, porém nos equinos os primeiros relatos começaram a surgir na década de 1980, e ainda são poucos os casos relatados na literatura veterinária. O rotavírus vem sendo relatado na literatura como causador de diarreias em diversas espécies animais. Em potros, seu relato é atualmente escasso. Foi pesquisada a frequência de *L. intracellularis* e de rotavírus em equinos com idades entre um mês e cinco anos criados no oeste do estado do Paraná. Os equinos eram provenientes de 15 propriedades oriundos de cinco cidades da região oeste do Paraná. Dos animais utilizados no experimento, 80 (53,69%) eram fêmeas e 69 (46,31%) eram machos. Foram coletadas amostras de sangue e de fezes de 149 animais. No exame sorológico de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC), 4,69% dos animais se apresentaram positivos, provenientes de seis propriedades distintas, dentre as 15 pesquisadas. Esses animais apresentavam idades entre seis meses e cinco anos, e títulos sorológicos de 1:60, 1:240 e 1:480. Para a pesquisa de rotavírus foi utilizada a eletroforese em gel de agarose. Não houveram animais positivos para a eliminação de partículas virais nas fezes.

Palavras-chave: Enteropatia proliferativa equina; estudo de frequência; diarreia; cavalos.

ABSTRACT

Diarrhea is a common clinical sign of several diseases, of bacterial, viral, or parasitic origin. Correct diagnosis of the cause is essential for proper treatment of foals. *Lawsonia intracellularis* is a very well known pathogen in swine, however, in foals the first reports date from 1980, and since then rare cases were reported in the veterinary literature. Rotavirus has been described in the literature as causing diarrhea in several animals. In foals, rotavirus occurrence is currently scarce. The frequency of *L. intracellularis* and rotavirus was investigated in horses aged between one month and five years old raised in the western state of Paraná. The horses came from 15 farms from the five cities of western Paraná. Of animals used in this research, 80 (53.69%) were females and 69 (46.31%) were males. In serological tests using immunoperoxidase performed on cell monolayers (IPMC), 4.69% of animals were positive, totaling six of fifteen farms analyzed. These animals had between six months and five years, and the serological titers varied from 1:60, 1:240 and 1:480. For an investigation of rotavirus agarose gel electrophoresis was performed. No one animal was positive for rotavirus in faeces.

Key words: Equine proliferative enteropathy; Frequency study; diarrhea; Horses.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – *Lawsonia intracellularis* em imagem de microscopia eletrônica. Bactéria gram-negativa, curvada ou em vírgula, medindo 1,25 a 1,75µm de comprimento, com um envelope triplo frequentemente separado da membrana citoplasmática por uma zona eletro-lucente. Apresenta um flagelo longo, único e unipolar.21
- FIGURA 2 – Lesões macroscópicas e microscópicas. A) *Lawsonia intracellularis*. Imagem ultrassonográfica evidenciando o espessamento da parede do íleo de uma potra quarto de milha de 6 meses de idade. B) Segmento de íleo coletado durante necropsia de um potro puro sangue de 8 meses de idade. O espessamento pode ser notado por toda a mucosa. C) Lesão macroscópica com espessamento da mucosa difuso e pseudomembrana encontrada em um potro puro sangue de 11 meses de idade. D) Enterócitos presentes na cripta contendo em seu ápice agregados de bactérias (*L. intracellularis*)30
- FIGURA 3 – Imagem esquemática do genoma do rotavírus equino pela eletroforese e também da partícula viral.....36
- FIGURA 4 – Rotavírus visualizado por microscopia eletrônica. Imagem com visualização normal (A), e com imagem negativa (B)37
- FIGURA 5 - Histologia de segmento de intestino delgado de rato 72 horas após a infecção. O intestino delgado corado com hematoxilina-eosina apresenta vacuolização severa nos enterócitos infectados por Rotavírus44
- FIGURA 6 - Técnica de IPMC em amostras de soro equino. Na imagem A nota-se a presença de células (seta) do cultivo celular, porém sem a presença do anticorpo. Na imagem B, observa-se a presença de anticorpo anti *L. intracellularis*, com marcações em vermelho (seta).....53

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Genoma completo do rotavírus | 38 |
| TABELA 2 – Equinos positivos para a técnica de imunoperoxidase em monocamada celular com respectivas titulações, organizados de acordo com o sexo, idade e propriedade..... | 52 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 | <i>LAWSONIA INTRACELLULARIS</i> | 18 |
| 2.1.1 | História da Doença | 18 |
| 2.1.2 | Etiologia | 20 |
| 2.1.3 | Epidemiologia | 21 |
| 2.1.4 | Patogênese | 23 |
| 2.1.5 | Sinais Clínicos | 25 |
| 2.1.6 | Patologia | 27 |
| 2.1.7 | Diagnóstico | 30 |
| 2.1.8 | Tratamento e prevenção | 32 |
| 2.2 | ROTAVÍRUS | 34 |
| 2.2.1 | História da Doença | 34 |
| 2.2.2 | Etiologia | 35 |
| 2.2.3 | Epidemiologia | 39 |
| 2.2.4 | Patogênese | 40 |
| 2.2.5 | Sinais Clínicos | 41 |
| 2.2.6 | Patologia | 42 |
| 2.2.7 | Diagnóstico | 44 |
| 2.2.8 | Tratamento e prevenção | 46 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 3.1 | COLETA DE AMOSTRAS | 48 |
| 3.2 | SOROLOGIA PARA <i>L. INTRACELLULARIS</i> | 49 |
| 3.3 | DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS | 50 |
| 3.3.1 | Extração e Eletroforese para Rotavírus | 50 |
| 4 | RESULTADOS | 51 |
| 4.1 | <i>LAWSONIA INTRACELLULARIS</i> | 52 |
| 4.1.1 | Sorologia | 52 |
| 4.2 | ROTAVÍRUS | 53 |
| 5 | DISCUSSÃO | 54 |
| 6 | CONCLUSÃO | 63 |

| | |
|---|-----------|
| REFERÊNCIAS..... | 64 |
| ANEXO 1 – FICHA INDIVIDUAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRA COLETADA..... | 74 |

1. INTRODUÇÃO

A equinocultura no Brasil mantém uma tropa de aproximadamente 5 milhões de animais, incluindo animais de lida, lazer, esporte e de raça, contando com 3 milhões e 900 mil animais para utilização a campo. Os estados com maior representatividade na equinocultura brasileira são Minas Gerais, seguido pelo Rio Grande do Sul, com 14,29% e 10,08% respectivamente do percentual da tropa brasileira para o ano de 2013. Com relação às raças, destaca-se o Mangalarga Marchador, com 600.000 animais. A raça crioula representa 85% dos animais criados no Rio Grande do Sul, sendo a quarta raça com mais animais registrados no país (Lima e Cintra, 2016). A população nacional de equinos é a quarta maior no mundo (Almeida e Silva, 2010).

O agronegócio equino movimenta cerca de 7,5 bilhões de reais e gera 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (Almeida e Silva, 2010, apud Lima et al 2006). Além da criação direta dos animais, pode-se destacar a indústria de rações e medicamentos veterinários, com faturamento de 158,24 milhões em 2013. Dentre os animais de esporte e lazer destacam-se animais utilizados para o hipismo (17,2%) e das raças Quarto de Milha e Crioulo (60,1%). De todos os animais inseridos no mercado esportivo e de lazer estima-se que a movimentação econômica atinja 5,86 bilhões de reais (Lima e Cintra, 2016).

O custo para a criação de um potro no país é variável, dependendo da finalidade, aptidão do animal e do tipo de criação (confinado em cocheira ou completamente a pasto). Animais de esporte de alto desempenho como o

hipismo podem atingir valores superiores a 500 mil reais para o comprador final. Potros nascidos de pais com genética consagrada atingem alto valor agregado, e se utilizadas as técnicas de inseminação artificial ou transferência de embriões esse valor pode ser ainda maior. A perda de um potro significa a perda de muito investimento por parte do proprietário, levando em conta que uma gestação dura 11 meses e uma fêmea equina gesta apenas um animal por prenhez. Em estudo realizado no estado de Minas Gerais, o gasto total anual computado somando a mão de obra, impostos e insumos para a criação de equinos no estado é de 1.521.856.379,52 reais por ano (Vieira et al., 2015).

Durante os primeiros meses de vida os neonatos são submetidos a diferentes desafios e adaptações fisiológicas, adquirem imunidade passiva através da ingestão de colostro e estão modulando a imunidade ativa pelo contato com o ambiente (Rizzoni e Myiauchi, 2012). Distúrbios gastrointestinais em potros que causam dor abdominal são comuns, dentre eles a diarreia é o distúrbio gastrointestinal mais comum nos potros jovens, sendo que 80% dos animais nascidos apresentam pelo menos um episódio de diarreia nos primeiros seis meses de vida (Melo et al., 2007). Doenças virais e bacterianas são amplamente relatadas na literatura como causadoras de diarreia em potros, dentre elas a enterite proliferativa equina causada por *L. intracellularis* e a diarreia por rotavírus equino tem sido reportadas no Brasil e no mundo (Nemoto et al., 2011; Gabardo et al., 2015)

Ambas as afecções podem ser letais ou até mesmo levar a quadros subclínicos, e nesses casos os animais afetados podem se tornar fonte de

contaminação do ambiente e causar transmissão para potros sadios (Endara et al., 2007; Gabardo et al., 2015). Devido a isso o objetivo desse trabalho foi de estabelecer a frequência de *L. intracellularis* e Rotavírus em equinos do estado do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LAWSONIA INTRACELLULARIS

2.1.1. História da Doença

A enterite proliferativa foi primeiramente relatada em suínos no ano de 1931 por Biester e Schwarte. Em 1972, Rowland e Rowntree identificaram nesta espécie uma síndrome enteropática hemorrágica na qual o intestino apresentava proliferações da mucosa. Em 1973, Rowland e Rowntree identificaram a presença de uma bactéria curva nas lesões proliferativas, no citoplasma dos enterócitos lesionados, classificando-a dentre o gênero *Campylobacter* (Lawson e Gebhart, 2000).

No ano de 1982, Duhamel e Wheeldon relataram um caso de adenomatose intestinal em um potro de seis meses de idade, macho, da raça Puro Sangue Árabe. Nesta situação foi identificada uma bactéria curva semelhante à bactéria presente nas lesões adenomatosas de suínos, que até então era identificada como *Campylobacter sputorum* subsp. *Mucosalis*, e este

foi o primeiro caso relatado de adenomatose intestinal em potros.

Em 1983 Gebhart et al. conseguiram isolar *Campylobacter hyointestinalis* das lesões intestinais de suínos. Em 1985, Gebhart et al. demonstraram a susceptibilidade de hamsters à doença, utilizando homogenizado de intestino de suínos acometidos (Lawson et al., 2000). Estudos posteriores utilizando-se de anticorpos policlonais, monoclonais, transmissão experimental e hibridização do DNA demonstraram não se tratar de uma bactéria do gênero *Campylobacter spp.*, passando a ser conhecida por “organismo simbiote ileal intracelular” (Jones et al 1993; Lawsons e Gebhart, 2000). Jones et al. (1993) descreveram-na como sendo um organismo curvado, em forma de bastonete sempre encontrado no citoplasma dos enterócitos dos suínos afetados, formalmente conhecido como “*Campylobacter-like*” ou organismo semelhante à *Campylobacter spp.* Em 1991 esta bactéria foi isolada de hamster e em 1993 isolada em suínos utilizando cultivo celular estritamente microaerófilo (Gebhart et al., 2013).

A nomenclatura atual foi estabelecida na década de 1990, quando estudos taxonômicos através da amplificação do DNA ribossomal (rDNA) do gene 16S mostrou sua semelhança à protobactéria *Desulfovibrio desulfuricans* (91%). Novos estudos comparando o sequenciamento do gene 16S do “organismo ileal simbiote” encontrado nas lesões adenomatosas de hamsters e furões com as encontradas em suínos revelou 99% de semelhança gênica, abrindo a possibilidade para um novo gênero de bactérias. Decidiu-se por classificá-la na família Desulfovibrionaceae, com o nome de *Lawsonia*

intracellularis devido aos grandes esforços do pesquisador Gordon Lawson para a descoberta desta bactéria (McOrist et al., 1995).

2. 1. 2 Etiologia

A *L. intracellularis* (Figura 1) é uma bactéria obrigatoriamente intracelular (Smith e Lawson, 2001), gram-negativa, curvada ou em vírgula, medindo 1,25 a 1,75 μ m de comprimento e 0,25 a 0,43 μ m de largura. Apresenta um envelope triplo em sua parede, frequentemente separado da membrana citoplasmática por uma zona eletro-lucente. Apresenta um flagelo longo, único e unipolar (Lawson e Gebhart, 2000). A bactéria afeta as células em atividade mitótica das criptas intestinais, e são dependentes das células em mitose para sua propagação (Lawson et al., 1993; Smith e Lawson, 2001; Boutrup et al., 2010). Pode ser observada no citoplasma das células três dias após a infecção em experimentos *in vivo* (MacIntyre et al., 2003; Boutrup et al., 2010) É causadora de uma doença entérica transmissível que afeta além dos suínos e equinos (Macedo et al., 2008) outras espécies como a raposa do ártico, emas, avestruz (Lawson e Gebhart, 2000), e hamster (Cooper et al., 1997; Smith e Lawson, 2001).

Nos equinos os casos se tornaram mais frequentes após o ano de 2000, sendo relatados episódios no Canadá (Lavoie et al., 2000; McGurrin et al., 2007), Brasil (Guimarães-Ladeira et al., 2009; Gabardo et al., 2015), Estados Unidos (Duhamel e Wheeldon 1982; Al-Ghamdi et al., 2006; Mayer et al., 2014; Frazer, 2008), Arábia Saudita (Al-Ghamdi et al., 2006), Bélgica (Vyncke et al.,

2012; Deprez et al., 2015), Suíça (Wuersch et al., 2006), Austrália (McClintock e Collins, 2004), Holanda (Wollemberg et al., 2011) e Israel (Steimman et al., 2013).

Figura 1- *Lawsonia intracellularis* em imagem de microscopia eletrônica. Bactéria gram-negativa, curvada ou em vírgula, medindo 1,25 a 1,75 μ m de comprimento, com um envelope triplo frequentemente separado da membrana citoplasmática por uma zona eletro-lucente. Apresenta um flagelo longo, único e unipolar.



FONTE: Wattanaphansa, Singer and Gebhart (2010).

2. 1. 3 Epidemiologia

A *Lawsonia intracellularis* é causadora de uma enterite proliferativa caracterizada por espessamento do epitélio intestinal devido a proliferação de enterócitos, a qual é diretamente associada a presença de bactéria intracitoplasmática (Gebhart et al., 2013), tem sua via de transmissão fecal-oral, através do contato direto de animais sadios com animais acometidos, fômites,

fezes contaminadas ou mesmo carregadas por vetores (Guedes, 2004). McOrist et al. (2011), conseguiram identificar a presença de *L. intracellularis* em invertebrados como a *Musca domestica*, que é o invertebrado mais prevalente nas granjas suínas. A *L. intracellularis* foi identificada inclusive nas formas larvais da mosca sugerindo que esse espécime pode reter a *L. intracellularis* em seu estágio de pupa. Para a enterite proliferativa dos suínos, é levantada a hipótese de que sua transmissão possa ser devido a uma baixa qualidade na higienização do ambiente, técnicas inadequadas de desinfecção e animais apresentando a doença de forma subclínica (Page et al., 2014). Bae et al. (2013) sugerem como possíveis fatores de risco em criações de suínos a presença de *Salmonella spp.*, presença de roedores, o número de locais onde os animais são mantidos e *stress* por temperatura. Segundo Pusterla e Gebhart (2013), a fonte de infecção não foi determinada para equinos, porém especula-se desde os primeiros casos de EPE que a exposição às fezes contaminadas de suínos possam levar a infecção de equinos, apesar de na maioria dos casos não haver histórico de exposição direta ou indireta às fezes de suínos.

Em trabalho realizado por Pusterla et al. (2012), foram identificados em amostras de fezes de animais selvagens (gato selvagem, rato e coelhos) através da técnica de PCR a presença de *L. intracellularis*, e soropositividade nas amostras de sangue coletadas de ratos e coelhos, em fazendas de criação de equinos. A via de transmissão fecal-oral foi demonstrada por Pusterla et al. (2010) em potros de 4 a 5 meses de idade utilizando de um isolado de *L. intracellularis* obtido de um potro diagnosticado e necropsiado no Laboratório de

Diagnóstico Veterinário da Universidade de Minnessota. Al-Ghamdi et al. (2012) foram capazes de demonstrar a infecção através da reprodução da enterite proliferativa equina em potros utilizando homogenado de mucosa intestinal de suínos experimentalmente infectados.

O seu pico de eliminação ocorre entre 3 a 4 semanas pós-contaminação (Oliveira et al., 2015, Kroll et al., 2005). A enterite proliferativa pode ser observada em animais jovens, apesar de que animais adultos também podem ser acometidos (Cooper et al., 1997).

2. 1. 4 Patogênese

Inicialmente ocorre a colonização por *L. intracellularis* nos enterócitos com a adesão das bactérias e invasão dos enterócitos, que passam a apresentar atividade mitótica na região da cripta, levando à hiperplasia das criptas (Page et al., 2014; Oliveira et al., 2015). Essa hiperplasia resulta em mudanças macroscópicas significativas no trato intestinal, especialmente na mucosa do segmento de íleo, se manifestando como um espessamento deste tecido. As lesões podem ser focais, onde é possível observar pequenas ilhas de tecido acometido entre a mucosa normal, enquanto os quadros de lesões avançadas envolvem toda a área acometida do trato intestinal. Microscopicamente, as áreas afetadas apresentam perda das vilosidades que são repostas por um epitélio glandular, o qual apresenta vigorosa estrutura ramificada (criptas) com ausência de células caliciformes (Kroll et al., 2005).

As células que revestem a rede glandular apresentam marcada mitose celular. Em alguns casos não complicados há marcada resposta inflamatória na lâmina própria (Duhamel e Wheeldon, 1982; Lawson e Gebhart, 2000; Smith e Lawson, 2001). Um grande número de bactérias pequenas, curvadas e intracelulares são visíveis no citoplasma apical dos enterócitos das criptas quando o tecido afetado é submetido a coloração de prata (Rowland e Lawson, 1992; Cooper et al., 1997). A presença de *Lawsonia intracellularis* nas células da cripta revela um tropismo deste organismo por enterócitos imaturos em divisão, pois a rápida divisão celular promove o crescimento da bactéria melhor do que células diferenciadas que não estejam em divisão, além de que a constante proliferação e migração vertical da cripta no eixo cripta-vilosidade intermediam a disseminação da bactéria no epitélio intestinal (Vannucci e Gebhart, 2014).

As alterações macroscópicas são visíveis especialmente em porção final de íleo, se manifestando com espessamento do tecido, podendo elas serem focais ou segmentares. Microscopicamente nota-se a hiperplasia das criptas, com marcada mitose (Guedes e Gebhart, 2003). A proliferação dos enterócitos é induzida pela desregulação da fase G1 do ciclo da célula hospedeira, assim como sua falta de diferenciação pode estar associada à repressão de transportadores de membrana relacionados à digestão e aquisição de nutrientes (Vannucci e Gebhart, 2014).

Segundo recente trabalho publicado por Vannucci e Gebhart (2014), estima-se que 12 horas após a inoculação experimental de *Lawsonia intracellularis* por via oral, até que esta atinja os enterócitos, deve passar por

microambientes estressantes e competitivos, como o pH gástrico e a microbiota oral e intestinal, e para isso seu genoma apresenta dois sistemas essenciais para manter a homeostase do pH, o sistema glutamato decarboxilase (GAD) e F_0F_1 -ATPase operon. Em cultivo celular de enterócitos, após 10 minutos é possível notar a *Lawsonia intracellularis* aderida às células, e 3 horas após ocorre sua internalização através de vacúolos. Não é necessário que a bactéria esteja viável para que ocorra o processo de invasão celular, pois a entrada da bactéria depende da atividade da célula hospedeira e da polimerização da actina, podendo também existirem outros mecanismos envolvidos no processo.

Infecções experimentais em coelhos como modelo para estudo de infecções em equinos podem ser realizadas devido à semelhança anatômica e fisiológica com o trato gastrointestinal de equinos. Sampieri et al. (2012), inocularam *L. intracellularis* experimentalmente em coelhos, posteriormente realizando análises histológicas, imuno-histoquímica, sorológica e macroscópica, confirmando a semelhança entre as infecções. Apesar de ser possível essa reprodução da infecção, a espécie- especificidade da *L. intracellularis* para equinos e suínos já foi demonstrada (Sampieri et al., 2012; Vannucci et al., 2012.).

2. 1. 5 Manifestações Clínicas

Na América do Norte a enteropatia proliferativa equina ocorre entre os meses de agosto e janeiro, sendo ela sazonal, apresentando manifestações

clínicas e hematológicas características, sendo sua ocorrência especialmente em equinos entre 2 a 8 meses (Pusterela e Gebhart, 2009; Frazer, 2008). Clinicamente, a enteropatia pode se apresentar como perda de peso e crescimento lento, e nos casos agudos pode resultar em morte (Cooper et al., 1997; Rowland e Lawson, 1992; Lawson e McOrist, 1993). As manifestações clínicas mais comuns nos potros acometidos são letargia, anorexia, edema periférico, perda de peso, cólica e diarreia, e apesar desta ser o sinal mais evidente alguns animais podem apresentar fezes com características normais (Atherton e McKenzie III, 2006; Pusterela e Gebhart, 2009.). Infecções no trato respiratório, úlceras gástricas e parasitismo intestinal podem estar associados à enterite proliferativa (Pusterela e Gebhart, 2009; Pusterela e Gebhart, 2013). Os sinais da enterite proliferativa equina (EPE) podem ser facilmente confundidos com os de doenças gastroentéricas mais comuns, como infecções por rotavírus, coronavírus, compactação por areia, obstrução intestinal, ulcerações e outras doenças entéricas bacterianas (salmonelose, clostridiose e rodococose) (Pusterela e Gebhart, 2009; Pusterela e Gebhart, 2013).

Atherton e McKenzi III (2006) relataram hiperfibrinogenia e leucocitose em cinco de sete equinos de 5 a 12 meses de idade inoculados experimentalmente, e seis deles apresentaram hipoproteinemia. Leucocitose e hipoproteinemia são os sinais hematológicos mais relatados dentre os animais que apresentam EPE (Lavoie et al., 2000; Atherton e McKenzi III, 2006; McGurrrin ,2007; Macêdo et al., 2008, Pusterela e Gebhart, 2009; Pusterela e Gebhart, 2013;). Alterações hematológicas como hemoconcentração e hiperfibrinogenia podem ser

encontradas (Pusturela e Gebhart, 2013) A hipoproteinemia se dá devido à hipoalbuminemia, podendo o total de albumina sérica ser menor que 20g/l e a proteína menor que 50g/l (Pusterela e Gebhart, 2013; Pusterela e Gebhart, 2009). Sugere-se que a hipoalbuminemia seja uma combinação de fatores, sendo a queda na alimentação associada à má absorção e à perda de proteínas presentes no trato intestinal devido à proliferação acentuada dos enterócitos (Pusturela e Gebhart, 2013, Wong et al., 2009).

A infecção inicial normalmente ocorre dos 6 a 20 semanas de idade, para sua forma crônica e de 3 a 12 semanas para a forma aguda, com um período de incubação de 2 a 3 semanas. Em muitos casos há infecção subclínica, onde é observada uma baixa taxa de crescimento do animal (McOrist e Gebhart, 2012).

2. 1. 6 Patologia

As espécies mais comumente acometidas naturalmente pela *L. intracellullaris* são o suíno e o hamster (Rowland e Lawson, 1992; Smith e Lawson, 2001). Em coelhos, a ocorrência da enterite proliferativa também se dá de forma natural (Lawson e McOrist, 1993). A infecção por *L. intracellullaris* em equino também ocorre de forma natural (Gabarbo et al, 2015) e já foi estabelecida experimentalmente. Al-Ghamdi et al. (2012) utilizaram sete potros de dois meses de idade para testar se era possível reproduzir a enteropatia proliferativa experimentalmente a partir de macerado intestinal suíno. Os animais eram provenientes de uma propriedade livre de infecção por *L. intracellullaris* há

pelo menos dois anos, além de serem livres de outras bactérias entéricas patogênicas e parasitismo. Os animais foram divididos em dois grupos, sendo que no grupo A foi inoculado de forma intragástrica um macerado homogeneizado de mucosa intestinal proveniente de suínos experimentalmente infectados com *L. intracellularis* e que eram negativos para *Salmonella spp.* O grupo B foi incubado com placebo, se tornando o grupo controle. Cinco dos sete animais do grupo A apresentaram sinais clínicos de enterite proliferativa, sendo a doença reproduzida com sucesso em potros.

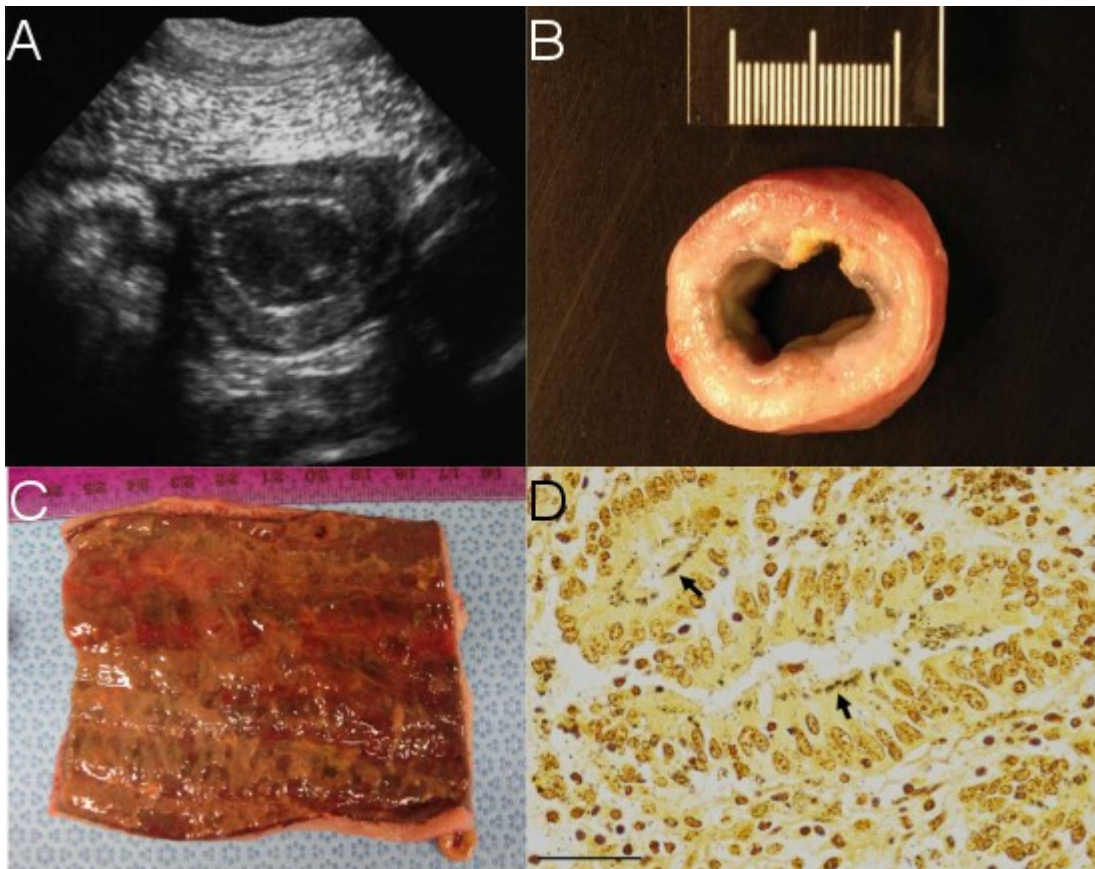
As alterações macroscópicas são observadas no trato intestinal, predominando em região de íleo (Smith e Lawson, 2001). Durante a necropsia são relatadas lesões em estômago, intestino delgado e rins, com presença de úlcera hemorrágica severa em região de piloro (Duhamel e Wheeldon, 1982) e em intestino delgado (McGurrin et al, 2007). Há espessamento irregular na região de íleo (Figura 2A e 2B) (Duhamel e Wheeldon, 1982; Cooper et al, 1997; Lavoie et al, 2000), com ondulações e hiperemia da mucosa (Al-Ghamdi et al, 2012) e corrugação proeminente em sua superfície, muitas vezes formando nódulos com depressões em seu centro (Duhamel e Wheeldon, 1982). Em animais cronicamente acometidos pode-se notar uma pseudomembrana recobrimdo a mucosa (Figura 2C) (Pusterla e Gebhart, 2013).

Nos cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina observa-se um espessamento extenso e irregular da mucosa de intestino delgado, normalmente próximo à válvula íleo-cecal (Pusterla e Gebhart, 2013) com marcada hiperplasia das criptas, apesar de outros segmentos mais distantes de intestino delgado

podem estar acometidos (Lawson e McOrist, 1993). Há redução no número de vilosidades, enquanto as criptas intestinais estão alongadas, ramificadas e muitas vezes se mesclam com as criptas adjacentes (Duhamel e Wheeldon, 1982; Lawson e McOrist, 1993; Al-Ghamdi et al., 2012). As criptas apresentam um epitélio colunar estratificado, com alta taxa de células em mitose e algumas células caliciformes presentes na base das criptas. Segundo caso estudado por Al-Ghamdi et al. (2012), as camadas podem conter de 2 a 5 células e apresentarem uma alta taxa de mitoses. Alguns segmentos de íleo apresentam áreas de infiltrado linfoplasmocitário em lâmina própria associada à necrose, que podem se estender focalmente até a submucosa, a qual pode se apresentar edematosa. Nestas áreas as criptas hiperplásicas geralmente apresentam um conteúdo purulento (Duhamel e Wheeldon, 1982; Allen et al., 2009 ; Al-Ghamdi et al., 2012). Também podem estar presentes áreas de ulceração (Al-Ghamdi et al., 2012), e diminuição das células caliciformes presentes (Lawson e McOrist, 1993; Pusterla e Gebhart, 2013).

Na coloração de prata (Warthin-Starry) podem ser visualizados organismos argentofílicos no citoplasma apical dos enterócitos (Figura 2D), compatíveis com *L. intracellularis* (Pusterla e Gebhart, 2013; McGurrim, 2007). Na microscopia eletrônica observa-se a presença da bactéria no citoplasma apical dos enterócitos das criptas (Duhamel e Wheeldon, 1982).

Figura 2: Lesões macroscópicas e microscópicas. A) *Lawsonia intracellularis*. Imagem ultrassonográfica evidenciando o espessamento da parede do íleo de uma potra Quarto de Milha de 6 meses de idade. B) Segmento de íleo coletado durante necropsia de um potro Puro Sangue de 8 meses de idade. O espessamento pode ser notado por toda a mucosa (Fonte: Pusterla e Gebhart, 2009). C) Lesão macroscópica com espessamento da mucosa difuso e pseudomembrana encontrada em um potro puro sangue de 11 meses de idade. D) Enterócitos presentes na cripta contendo em seu ápice agregados de bactérias (*L. intracellularis*).



FONTE: Pusterla and Gebhart (2013).

2. 1. 7 Diagnóstico

Devido as manifestações clínicas apresentadas pela EPE, dentre eles letargia, anorexia, febre, edema periférico, perda de peso, cólica e diarreia (Pusterela e Gebhart, 2009), a utilização de métodos *ante-mortem* eficientes para a detecção da doença nos equinos se torna necessária para um tratamento

específico e bem-sucedido dos equinos acometidos (Macedo et al., 2008), sendo que as técnicas utilizadas para o diagnóstico de *Lawsonia intracellularis* nos equinos são as mesmas utilizadas para suínos. Como diagnósticos *ante-mortem* podem ser utilizadas as técnicas sorológicas de imunofluorescência indireta, ELISA e imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC), além da técnica de PCR (Kroll et al., 2005).

O diagnóstico tradicional é feito no exame *post-mortem* e histopatológico utilizando da coloração de prata ou imuno-histoquímica para a identificação do agente etiológico (Rowland e Lawson, 1992; Cooper et al., 1997). Métodos moleculares podem ser utilizados *ante-mortem*, o que requer amostras de fezes ou *post-mortem*, com tecidos frescos ou congelados, os quais nem sempre estão disponíveis, especialmente se enviados para um laboratório de referência (Cooper et al., 1997).

Ladinig et al. (2009), compararam os métodos diagnósticos atualmente existentes para amostras de tecido com relação a sua especificidade e sensibilidade. Nos casos onde só há material fixado em parafina, os métodos de imuno-histoquímica e hibridização *in situ* se mostraram mais adequados do que o método de reação em cadeia da polímerase (PCR). A imuno-histoquímica se mostrou mais eficiente do que a hibridização *in situ* nos casos de animais em estágio final de recuperação, no qual há pequeno número de bactérias presentes no corte histológico.

Já Jensen et al. (2010), compararam os métodos de imunofluorescência (IFA) e hibridização *in-situ* (FISH) em amostras formolizadas de intestino suíno e

sobre a autólise controlada. O exame de imuno-histoquímica é considerado o padrão-ouro para a detecção de *L. intracellularis* em cortes histológicos, porém dentre a comparação dos métodos de FISH e IFA, quatro dos 69 casos apresentaram discrepância nos resultados, sendo o método de IFA o que diagnosticou todas as amostras positivas. Com relação à autólise, o método de FISH apresenta rápida queda em sua sensibilidade nas amostras coletadas dentre 1h e 2h e mantidas à 20°C. Cinco amostras armazenadas à 4°C por 12 semanas apresentaram cultura positiva, o demonstrando que mesmo sendo fracamente positivo para FISH, há a presença de bactérias ainda viáveis na amostra.

Para amostras sorológicas, os testes de imunofluorescência indireta (IFAT), ELISA e imunoperoxidase em monocamada (IPMC) são validados e padronizados para amostras de suínos e equinos, sendo a IPMC o teste sorológico de maior acurácia para pesquisa de anticorpos anti *L. intracellularis* em potros (Guedes et al., 2002; Slovis, 2014).

2. 1. 8 Tratamento e prevenção

Como os animais apresentam perda de peso e acentuada perda de proteínas, é necessário tratá-los antes das lesões se tornarem mais extensas. O tratamento pode ser feito utilizando antibióticos macrolídeos sozinhos ou associados à rifampicina, cloranfenicol, oxitetraciclina ou doxiciclina, administrados por duas a três semanas. Para a escolha do antimicrobiano deve

ser feita levando em conta um desequilíbrio da flora intestinal e sua toxicidade renal (Pusterla e Gebhart, 2013). Alguns animais necessitam de um tratamento intensivo e o uso de fluidoterapia, e ocasionalmente podem ir a óbito devido complicações secundárias. Nutrição parenteral, transfusão de plasma e drogas para combater ulcerações gástricas podem também ser utilizadas (Pusterla e Gebhart, 2013; Page et al., 2014).

Wattanaphasank et al. (2009) testaram a atividade antimicrobiana *in-vitro* sobre dez isolados de *L. intracellularis* provenientes da América do Norte e Europa. Foram testados carbadox, hidrocloridrato de clortetraciclina, hidrocloridrato de lincomicina, tartarato de tilosina, tiamulin hidrogênio, e cloridrato de fumarato e valnemulina. O melhor desempenho de ação antimicrobiana *in-vitro* foi encontrado no carbadox, tiamulin e valnemulin, seguido de uma ação intermediária de clortetraciclina e tilosina, e uma ação fraca da lincomicina.

Estratégias de prevenção podem ser utilizadas especialmente em suínos, como vacinas e antibióticos (Slovis, 2014). Pusterla et al. (2012) avaliaram a eficácia da vacina viva avirulenta intrarectal de *L. intracellularis* em potros saudáveis entre quatro a cinco meses de idade, divididos em grupo controle, vacinados e não vacinados. Os animais vacinados não apresentaram reações adversas atribuídas à vacina, e apenas no grupo de animais não vacinados foram observados sinais clínicos de enteropatia proliferativa.

2. 2 Rotavírus

2.2.1 História da Doença

O Rotavirus foi descoberto em 1973 por Bishop et al. (1973) enquanto observavam epitélio duodenal de uma criança com diarreia sob um microscópio eletrônico. O nome rotavírus teve origem devido sua semelhança a rodas quando observado ao microscópio eletrônico, e é derivado do Latim '*rota*' (Parashar et al., 1998; Surendran, 2008). O rotavírus símio e bovino foram isolados em cultivo celular em 1958 e 1971, respectivamente. Em 1977 o rotavírus suíno foi isolado tratando o inóculo com pancreatina ou tripsina antes da inoculação no cultivo celular (Tzipori e Walker, 1978; Imagawa et al., 1984). Em 1980, foi possível fazer passagens sucessivas de rotavírus humano em cultivo celular de células renais de macaco verde africano e depois inoculadas em leitões recém-nascidos (Imagawa et al., 1984).

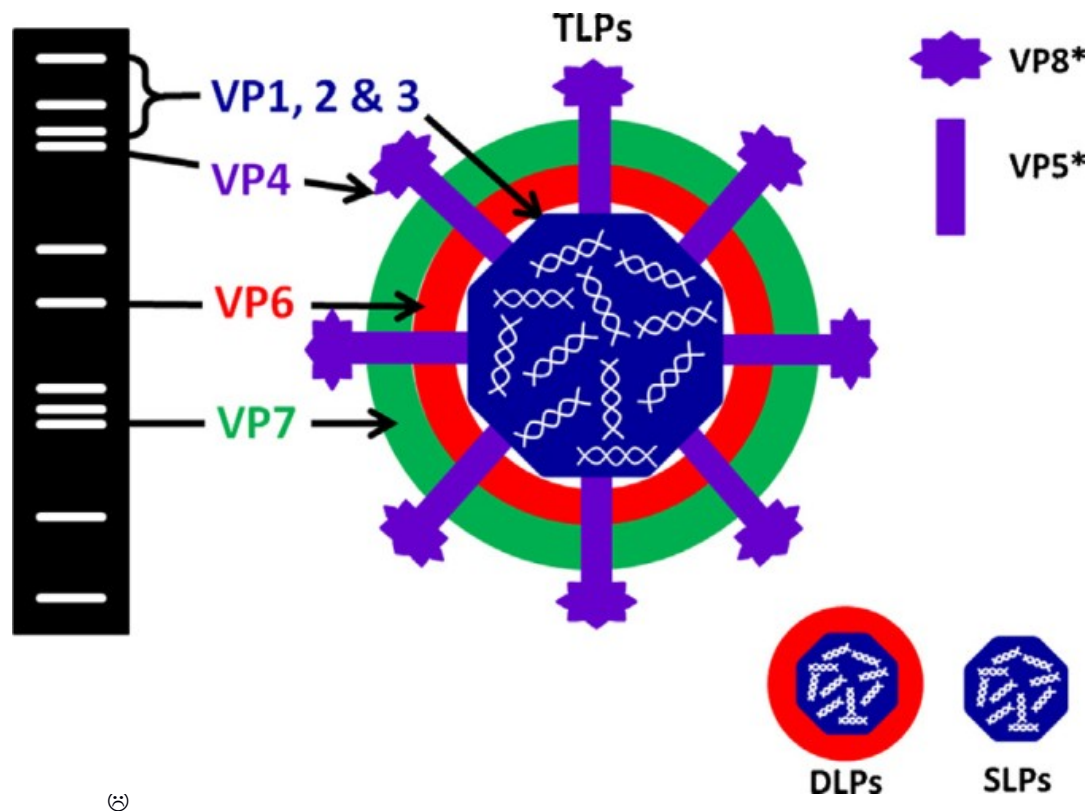
Em meados de 1970, os surtos de diarreias em potros eram associados à *Salmonella spp.*, *Corinebacterium equi*, *Streptococcus spp.* e *Actinobacillus equi*, sendo que *Coronavírus* e *Rotavírus* começavam a ser relatados (Tzipori e Walker, 1978). Apenas em 1975 o rotavírus equino foi isolado de fezes de potros na Grã-Bretanha (Bailey et al., 2013). O primeiro relato sobre a análise do genoma do rotavírus equino através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada por Rodger et al. em 1980, além da comparação do rotavírus equino com o rotavírus símio em cultivo celular, onde diferenças na

mobilidade eletroforética de alguns segmentos correspondentes indicam uma diferença genética na composição dos vírus.

2.2.2 Etiologia

O rotavírus (Figuras 3 e 4) pertencente à família *Reoviridae*, subfamília Sedoreovirinae, gênero Rotavirus, o qual é subdividido em grupos (A-H) de acordo com a diferença de expressão da proteína VP6 em seu capsídeo. Apresenta 76,5nm de diâmetro, formato icosaédrico, não envelopado, RNA fita dupla composto por 11 genes, que expressam seis proteínas virais (VP1-4, 6 e 7), e seis proteínas não-estruturais (expressadas apenas pela célula infectada), NSP 1-6; além de um décimo primeiro gene que expressa tanto NSP 5 quanto NSP 6 (Rodger et al., 1980; Surendran, 2008; Ntafis et al., 2010; Baylei et al., 2013; Sellon, 2014). O vírus apresenta um capsídeo triplo, cujo capsídeo mais externo expressa a proteína VP7, com espículas compostas por VP4, o capsídeo intermediário é formado por VP6, e o capsídeo mais interno é composto por VP2, VP3 e VP1 (Bailey et al., 2013).

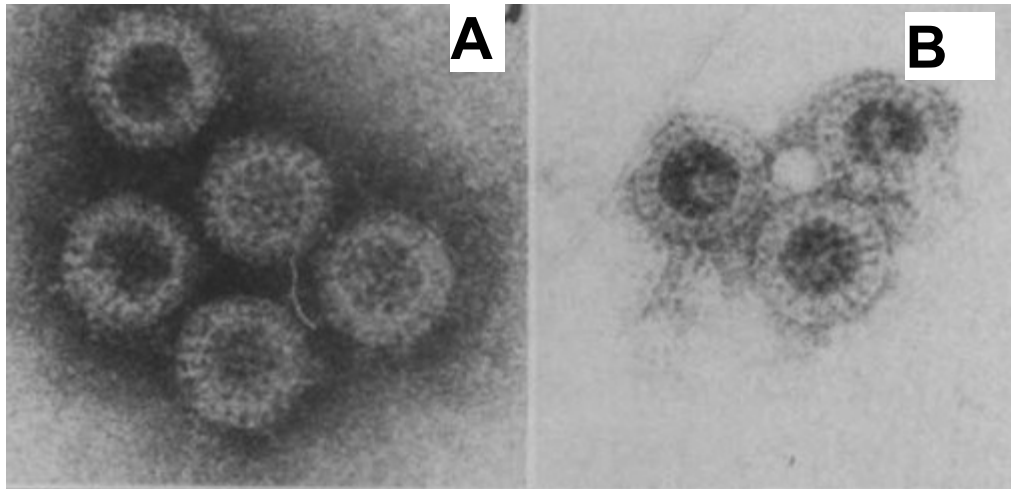
Figura 3- Imagem esquemática do genoma do rotavírus equino pela eletroforese e também da partícula viral.



⊕

FONTE: Bailey et al (2013).

Figura 4 - Rotavírus visualizado por microscopia eletrônica. Imagem com visualização normal (A), e com imagem negativa (B).



FONTE: Rodger et al. (1980)

Cada proteína viral possui uma localização e função específicas. A VP1 é uma enzima RNA polimerase localizada na porção mais central da partícula viral e a VP2 forma o envoltório central do vírion e sela o seu material genético. Já a VP3 é uma enzima guanilil transferase, que catalisa a formação de 5' pós transcrição de mRNA enquanto a VP4 se liga aos receptores na superfície celular e conduz a entrada do vírus na célula. A proteína VP6 é altamente antigênica e é utilizada para a identificação da espécie de rotavírus e a VP7 é uma glicoproteína envolvida na imunidade da infecção (Surendran, 2008). As duas proteínas externas, VP4 e VP7, além de estimular anticorpos neutralizantes e induzir a imunidade, são utilizados para a classificação do rotavírus em G (para glicoproteínas) e P (para sensível à protease) (Ntafis et al., 2010). Essa classificação utiliza-se do diagnóstico destas proteínas através da sorologia, e pelo menos seis sorotipos P (P1, P3, P7, P11, P12, P18) e sete

sorotipos G (G3, G5, G6, G8, G10, G13 e G14) já foram identificados em equinos (Bailey et al., 2013). A proteína VP6 é utilizada para a classificação do rotavírus em grupos de A-H, sendo o grupo A a maior causa de diarreia em animais e humanos, e nos equinos é o único grupo identificado até então (Bailey et al., 2013; Browning et al., 1991).

Das proteínas não estruturais, NSP3 é transformada em mRNA nas células infectadas e impede a síntese de proteínas celulares. A NSP4 é uma enterotoxina, responsável por induzir à diarreia e a NSP5 codifica o genoma de 11 segmentos do rotavírus A (Suredran, 2008). Na tabela 1, estão resumidos todos os genes e suas funções.

Tabela 1: Genoma completo do rotavírus.

| Produto do Gene | Segmento de RNA | Genótipo | Descrição do produto do gene |
|------------------------|------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| VP7 | 9 | G | Glicosilato |
| VP4 | 4 | P | Sensitivo a protease |
| VP6 | 6 | I | Capsídeo intermediário |
| VP1 | 1 | R | Rna-polimerase Rna dependente |
| VP2 | 2 | C | Capsídeo externo |
| VP3 | 3 | M | Metiltransferase |
| NSP1 | 5 | A | Agonista interferon |
| NSP2 | 8 | N | NTPase |
| NSP3 | 7 | T | Tradutor |
| NSP4 | 10 | E | Enterotoxina |
| NSP5 | 11 | H | Fosfoproteína |

FONTE: traduzido de Bailey et al.(2013)

2.2.3 Epidemiologia

O rotavírus equino foi detectado em fezes diarreicas de potros em diversos países, incluindo Estados Unidos, Argentina, Reino Unido, Alemanha, Austrália, África do Sul e Japão (Magdesian et al., 2014). É onipresente nas populações equinas, havendo evidências de infecções de forma natural, incluindo a alta prevalência de anticorpos em equinos adultos (Bailey et al., 2013). É um patógeno ambiental comum em fazendas de reprodução, e caso seja identificado na microscopia eletrônica ou no teste de ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima) deve ser considerado como provável patógeno causador da diarreia (Fenger et al., 2000). O rotavírus equino causa diarreia apenas em potros, sendo considerado espécie-específico. Animais adultos não são clinicamente afetados nos casos de surtos, mas fêmeas podem eliminar o vírus de forma subclínica, apesar de maneira transitória e não ter grande significado para a diarreia em potros. Para a ocorrência de surtos deve-se considerar uma eliminação de vírus no ambiente por potros acometidos de 10^{11} partículas/g de fezes e sua capacidade de se manter viável no ambiente por até nove meses (Magdesian et al., 2014).

A transmissão ocorre de forma fecal-oral, através de fezes ou fômites contaminados (Parashar et al., 1998; Surendran, 2008; Bailey et al., 2013; Magdesian et al., 2014), e o período de incubação pode ser de 1-24 horas (MacLachlan e Dubovi, 2011). Se houver um suporte adequado, a diarreia por

rotavírus pode apresentar uma baixa mortalidade e uma alta morbidade na população (Magdesian et al., 2014).

2.2.4 Patogênese

O rotavírus é capaz de infectar enterócitos maduros (Parashar et al., 1998), e após sua entrada na célula é capaz de se multiplicar no ápice das vilosidades dos segmentos de duodeno e jejuno (Parashar et al., 1998; Magdesian et al., 2014), mas não infecta células das criptas (Bailey et al., 2013, Magdesian et al., 2014). O vírus se replica no citoplasma celular e é liberado através da lise do enterócito (Bailey et al., 2013), indo para o lúmen intestinal e se replicando nas porções distais de jejuno e íleo, sendo que a infecção se mantém restrita à mucosa (Parashar et al., 1998). A destruição dos enterócitos causa descamação da mucosa e encurtamento dos vilos, resultando numa diarreia por má-absorção. Nem sempre a severidade do quadro está relacionada às lesões histológicas (Bailey et al., 2013).

A enterotoxina NSP4 é capaz de induzir uma diarreia dose-dependente e idade-dependente em ratos neonatos sem apresentar alterações histológicas na mucosa (Kavanagh et al., 2010). Num estudo conduzido por Kavanagh et al.,(2010) purificou-se a proteína NSP4 derivada de rotavírus símio (SA11) e rotavírus suíno, que foram associadas às proteínas VP2 e VP6. Grupos com cinco ratos BALB/c foram imunizados de forma intranasal com cada antígeno durante duas semanas, três vezes por semana. Tanto a forma completa quanto a

forma clivada da proteína não estrutural NSP4 tem atividade como adjuvante na mucosa nasal, mesmo em sua forma atenuada. Diferente da toxina cólera (*Vibrio cholerae*), a NSP4 não induz à elevação detectável do cálcio intracelular, o qual se mostra necessário para toxinas bacterianas atuarem como adjuvantes na mucosa. O NSP4 também pode exercer efeito sobre as *tight junctions*, similar as toxinas de zona ocludente (ZOT), que também possuem função adjuvante (Marinero et al., 2003; Kavanagh et al., 2010). ZOTs foram inicialmente descritas como toxinas que aumentam a permeabilidade intestinal através da modulação das *tight junctions* e têm sido utilizadas como um sistema de transporte de drogas medicamentosas (Marinero et al., 2003). Por se utilizar das *tight junctions*, a NSP4 causa a diminuição da permeabilidade da membrana celular, assim como interrupções nas *tight junctions* podem causar alterações na permeabilidade da mucosa, integridade e também na função epitelial (Kavanagh et al., 2010).

2.2.5 Manifestações Clínicas

O rotavírus é uma causa importante de diarreia em potros, apresentando alta morbidade, e apesar da doença ser auto-limitante, a desidratação causada pode levar a morte (Tzipori e Walker, 1978; Bailey et al., 2013; Magdesian et al., 2014). Durante um episódio de surto de rotavírus, os potros com até dez dias podem apresentar diarreia severa, anorexia, febre e letargia. Os potros jovens são mais susceptíveis a diarreia devido sua habilidade limitada de regulação

hidroeletrolítica, levando à hipocloremia, hipocalcemia, hiponatremia e acidose (Magdesian et al., 2014).

As manifestações clínicas são relatadas em potros com três dias a cinco meses de idade (Bailey et al., 2013), sendo que os animais acometidos se apresentam deprimidos num primeiro estágio, evitando mamar e se mantendo em decúbito. A temperatura retal pode chegar até 41°C e a respiração se torna rápida e superficial. A diarreia aparece de 4-12 horas após o início da depressão (Tzipori e Walker, 1984). As fezes são volumosas, de pastosas a líquidas, e frequentemente apresentam grande quantidade de muco, e a diarreia pode se tornar severa devido a diminuição da produção de lactase causada pela infecção, levando a um desequilíbrio osmótico exacerbado (MacLachlan e Dubovi, 2011). Por haver falência da digestão e absorção normais do intestino, há uma quantidade exacerbada de partículas osmóticas na luz intestinal, resultando num fluxo de líquidos e eletrólitos para a luz (Fenger, 2000).

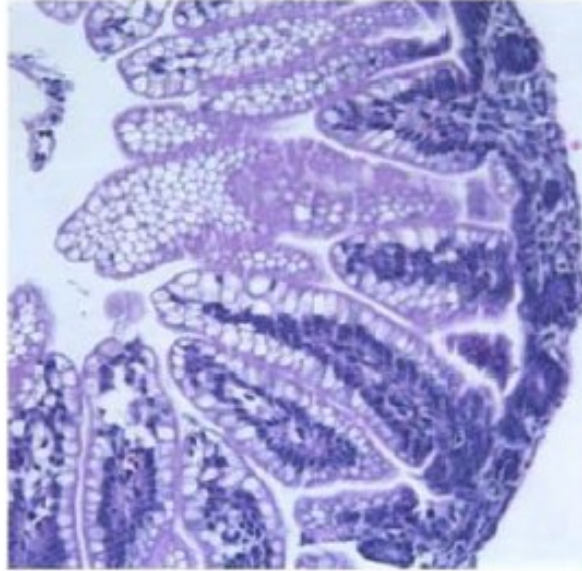
2.2.6 Patologia

Partículas virais podem ser encontradas no íleo três dias após infecção, e sua quantidade diminui entre quatro a nove dias, sendo que o comprimento das vilosidades tende a diminuir 72 horas após infecção. O rotavírus infecta principalmente os enterócitos das porções de jejuno e íleo, causando vacuolizações especialmente nas células que recobrem os vilos (Figura 5) (Suredran, 2008). Ocasionalmente pode infectar também as células caliciformes,

onde nos segmentos proximais de intestino (duodeno e jejuno), a perda das células de caliciformes ocorre primeiro (Boshuizen et al., 2005). A destruição do epitélio contribui para a diarreia por má-absorção (Suredran, 2008). Com a destruição dos enterócitos do topo das vilosidades, também há infiltrado de células inflamatórias mononucleares (MacLachlan e Dubovi, 2011; Bailey et al., 2013).

Em estudo conduzido por Boshuizen et al. (2005), observou-se que em ratos as células caliciformes sofrem uma migração diferente no epitélio da vilosidade, não se distribuindo pela vilosidade e tendendo a se acumular no topo do vilo. Durante o período de infecção, a mucina se torna mais ácida, e há diminuição da secreção de mucina sulfatada. A mucina intestinal de ratos infectados, aos quatro dias após infecção, apresentou uma menor capacidade de inibir a infecção do que a encontrada na mucina de ratos do grupo controle.

Figura 5: histopatologia de segmento de intestino delgado de rato 72 horas após a infecção. O intestino delgado corado com hematoxilina-eosina apresenta vacuolização severa nos enterócitos infectados por Rotavírus.



FONTE: Boshuizen et al.(2005)

2.2.7 Diagnóstico

Considerado como padrão ouro, a microscopia eletrônica é capaz de detectar partículas virais nas amostras de fezes, porém o seu custo elevado e a demora de alguns dias para o resultado implicam na sua não utilização rotineira, sendo que o limiar mais baixo para identificação é de 10^7 partículas virais por grama de fezes (MacLachlan e Dubovi, 2011; Bailey et al., 2013; Magdesian et al., 2014). O isolamento viral em cultura celular é uma técnica viável, sendo que os vírus isolados de lavados intestinais de bovinos e ovelha apresentam efeito citopático no cultivo celular. Para o rotavírus equino, esse efeito citopático pode

ser observado três dias após a inoculação em cultivo celular, porém a quantidade de vírus tende a diminuir conforme são feitas as passagens celulares (Imagawa et al., 1981). A adição de tripsina ou quimotripsina para abrir espaço no capsídeo entre VP4 facilita a entrada do vírus na célula (MacLachlan e Dubovi, 2011).

O diagnóstico comercial mais utilizado se baseia na detecção da proteína viral VP6, por ser a mais abundante e a que mais se mantém conservada (Gentsch et al., 2009; Magdesian et al., 2014). A técnica de detecção antigênica por imunoensaio enzimático (EIA) se utiliza da detecção de antígenos específicos (VP6) que se ligam à poços plásticos e sofrem uma reação colorimétrica quando utilizado um segundo anticorpo ligado à um detector enzimático. É uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, e que pode ser feita em grande quantidade quando utilizadas placas de 96 poços (Gentsch et al., 2009). Testes de aglutinação em látex também estão disponíveis para o diagnóstico, mas podem ser menos sensíveis que a EIA (Suredran, 2008; Magdesian et al., 2014).

A utilização da técnica de PCR e RT-PCR (transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase) se tornaram amplamente utilizadas para pesquisa de partículas virais nas fezes de potros e para caracterização genômica (Rodger et al., 1980; Garaicoechea et al., 2010; Elschner et al., 2011; Monini et al., 2011; Nemoto et al., 2011). É recomendada a utilização inicial de teste de aglutinação em látex ou de ELISA para a detecção em surtos, e após, pode-se fazer uso apenas da técnica de PCR para identificar potros eliminando o vírus de forma

subclínica (Magdesian et al., 2014).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser utilizada para a detecção de animais que apresentam a doença clínica, através de extração do RNA viral, e posteriormente da coloração do gel com nitrato de prata. A prata se liga a pequenas quantidades de ácido nucleico presentes no gel (Gentsch et al., 2009).

2.2.8 Tratamento e prevenção

A infecção por Rotavírus grupo A é auto-limitante e ocasionalmente fatal em equinos (Papp et al., 2013). A correção eletrolítica deve ser feita especialmente em potros desidratados (Magdesian et al., 2014), através da manutenção hídrica para a correção do equilíbrio ácido-básico, eletrolítico, redução de desconforto intestinal e prevenção de infecções secundárias. Potros que não deixaram de se alimentar não necessitam de tratamento (Fenger, 2000; Melo et al., 2007). Pode-se utilizar fluido intravenoso em animais que apresentem um quadro clínico grave, podendo ser adicionado bicarbonato de sódio, potássio ou glicose nos animais que se apresentam acidóticos e hiponatrêmicos, hipocalêmicos, e hipoglicêmicos, respectivamente (Melo et al., 2007). Se houver uma infecção bacteriana secundária, pode-se utilizar antibiótico de amplo espectro. O desenvolvimento de septicemia secundária é indicativo de um prognóstico ruim (Fenger, 2000)

A imunidade local no intestino delgado é mais importante do que a

imunidade sistêmica, por isso os anticorpos anti-rotavírus presentes no colostro e no leite são especialmente importantes para a imunidade do neonato (MacLachlan e Dubovi, 2011). A vacinação apresenta um bom custo-benefício se comparado ao tratamento e isolamento do animal (Papp et al., 2013). Vacinas utilizam como alvos as proteínas de capsídeo VP4 e VP7 (Gentsch et al., 2009). Vacinas vivas atenuadas de uso oral em neonatos podem potencializar uma resposta local de IgA, porém o equilíbrio adequado entre a atenuação da vacina e sua imunogenicidade é difícil de ser atingido (Bailey et al., 2013).

Contaminação ambiental pode ser considerada a maior rota de infecção por rotavírus (Bailey et al., 2013), e sua sobrevivência pode chegar à um mês no ambiente (Magdesian et al., 2014). A prevenção deve ser feita através da boa higienização das éguas em trabalho de parto e o isolamento de potros acometidos pelo rotavírus e que cheguem à propriedade, por duas a quatro semanas. Baias de potros acometidos devem ser desinfectadas com compostos fenólicos, peróxido de hidrogênio e peróxido de hidrogênio acelerado. Sugere-se testar novamente os potros que cessaram a diarreia através da técnica de PCR para comprovação de que este já não elimina partículas virais nas fezes (Fenger, 2000; Magdesian et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em conformidade com o Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (CEUA), processo número 32/2016.

3.1. COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de equinos com até cinco anos de idade entre novembro de 2015 e maio de 2016 na região oeste do estado do Paraná, compreendendo 15 propriedades nas cidades de Palotina, Iporã, Entre Rios do Oeste, Toledo e Marechal Cândido Rondon. As propriedades possuíam animais atletas, em constante trânsito pelo estado do Paraná, e potros que possuíam contato com estes animais, sendo que os potros mais velhos já estavam iniciados nas competições, portanto também transitavam pelo estado.

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal e armazenada em frascos plásticos esterelizados com tampa, próprios para este fim. O volume de 5ml de sangue foi coletado da veia jugular através do sistema Vaccuntine®¹. Após a coleta e identificação de cada amostra, foram armazenadas em caixas de isopor contendo gelo para o transporte até o Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina para serem processadas e armazenadas à -20°C até realização da PCR e a sorologia. No caso das amostras de sangue, chegando ao laboratório, foi separado o plasma das hemácias através da centrifugação, e armazenado apenas o soro à -20°C.

Junto da coleta das amostras, foram coletados dados dos animais como nome, idade, sexo, coloração de mucosas, frequências cardíaca e respiratória, presença de diarreia e em qual idade ocorreu. Também foram coletados dados sobre a propriedade e dados de identificação do proprietário (Anexo 1).

¹ Número de catalogo 364815 , BD Vaccuntiner, USA.

3.2 SOROLOGIA PARA *L. INTRACELLULARIS*

A sorologia foi realizada no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando a técnica de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC), padronizada por Guedes et al, (2002) para a detecção de anticorpos anti IgG em amostra de soro equino.

A técnica de IPMC consiste em fazer a diluição na titulação de 1:60, sendo 2µL de soro equino em 120µL de solução de leite em pó 5% e PBS Tween 0,05% (pH 7,2) em placa sorológica de 96 poços que contém uma monocamada de células previamente infectadas com cultura de *L. intracellularis*. Acrescenta-se 100µL de PBS 1x na placa sorológica que é incubada por 10 minutos em câmara úmida, e após esse tempo, joga-se a água fora e seca-se a placa completamente. Adicionava-se aos respectivos poços 100µL de soro já diluído e incubava-se novamente em câmara úmida à 37°C por 30 minutos. Após, a placa era lavada com PBS Tween 0,05% por quatro vezes com jatos fortes e secava-se a placa completamente. O volume de 2,5µL do anticorpo secundário anti-IgG² equino conjugado era diluído com 10mL de IPMC *buffer*, acrescentado 95µL em cada poço da placa e incubado em câmara úmida por 45 minutos a 37°C. Depois lava-se novamente a placa com PDB Tween 0,05% em jatos fortes e posteriormente seca-se a placa. Por fim acrescenta-se 100µL da solução AEC³ em cada poço da placa que é incubada em temperatura ambiente em câmara

2 Catalogo número A9292, Sigma- aldrich, St. Louis, MO 63103, USA.

3 Dako, Corporation, AEC SubstrateChromogen, cat n°. k3464, Invitrogen, Carpinteria, USA.

úmida por 20 minutos. A placa foi lavada com água destilada, seca e colocada por mais 20 minutos 37°C na estufa para a secagem.

A leitura da placa foi realizada em microscópio invertido. Os animais considerados positivos apresentam marcações E essas marcações de coloração vermelha ocorrem devido a placa ser inoculada com cultivo de *L. intracellularis*, e quando há a presença de anticorpo equino no soro adicionado ele se liga às bactérias presentes na placa, e a partir do momento que o anti-IgG equino é adicionado, ele se liga à esse IgG que já está ligado às bactérias, conferindo a coloração avermelhada à essa ligação. Para os animais considerados positivos, foram feitas as titulações de 1:60, 1:240, 1:480, 1:960, 1:1920 e 1:3860.

3.3 DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS

3.3.1 Extração e Eletroforese para Rotavírus

A extração do RNA é feita através da associação das técnicas fenol/clorofórmio-álcool isoamílico e sílica/ isotiocinato de guanidina. Para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida não é necessário realizar a amplificação. A extração seguiu o protocolo estabelecido por Alfieri et al, (2006). Resumidamente, são separadas as amostras de fezes, e nelas é adicionado Buffer pH 7,4 homogeneizado e centrifugado a 1500g por 10 minutos, seguido a coleta do sobrenadante. Cerca de 500ul do sobrenadante foram aliqüotados e tratados com SDS (sódio dodecil sulfato) 1% e incubados em banho maria a

56°C por 30 minutos. Posteriormente, o ácido nucleico extraído era tratado com um volume igual de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Esse material era homogeneizado, e incubado novamente em banho-maria a 56°C por 15 minutos, e centrifugado a 10,000g por 10 minutos. A fase aquosa era processada com sílica- isotiocinato de guanidina. O RNA era eluído em 30 µl de água ultrapura autoclavada. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 5%, e o gel revelado em solução de prata, como descrito por Herring et al, (1982).

4. RESULTADOS

Foram coletadas amostras de fezes e soro de 149 equinos. Destes, 80 (53,69%) eram fêmeas e 69 (46,31%) eram machos, com média de idade de 2 anos e 4 meses para ambos os sexos. Destes animais, apenas quatro (2,5%) animais apresentavam diarreia no momento da coleta, sendo estes os animais apresentados na tabela 2. Das 149 amostras coletadas, apenas 22 (14,76%) pertenciam a animais com até um ano de idade. Apenas o animal número 156 era proveniente de propriedade com histórico recente de diarreia em potros.

Nas propriedades em que foram diagnosticados animais positivos, observou-se a convivência e divisão de pastagens com outros equinos. Cães, gatos e aves também foram observados nas propriedades, apresentando um contato muito próximo dos equinos.

4.1 LAWSONIA INTRACELLULARIS

4.1.1 Sorologia

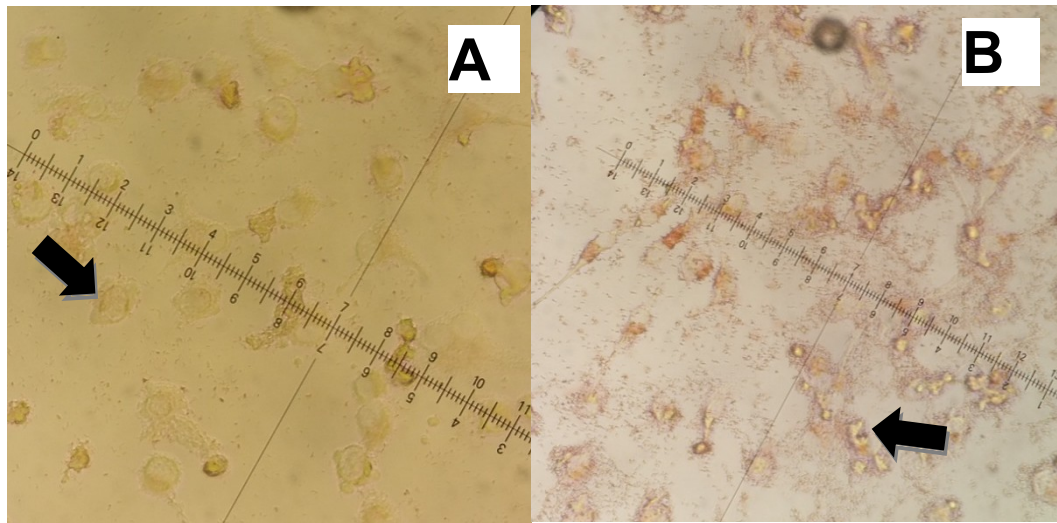
Das 149 amostras testadas pelo método de imunoperoxidase em monocamada (IPMC), sete (4,69%) animais apresentaram títulos de anticorpos contra *L. intracellularis* (Figura 6A e 6B). Destes, a idade mínima foi de 6 meses e a máxima de 5 anos, sendo esta a idade limite dos animais desta pesquisa. As propriedades que apresentaram animais positivos se localizavam nas cidades de Iporã (4 propriedades, com 2 animais positivos na propriedade F e 1 animal positivo na propriedade M, N e D), Palotina (propriedade B com 1 animal positivo), e Marechal Cândido Rondon (propriedade Q com 1 animal positivo) (Tabela 2).

Tabela 2: Equinos positivos para a técnica de imunoperoxidase em monocamada celular com respectivas titulações, organizados de acordo com o sexo, idade e propriedade.

| Animal | Sexo | Idade | Município | Propriedade | Titulação |
|---------------|-------------|----------------|------------------|--------------------|------------------|
| 72 | M | 3 anos 6 meses | Iporã | F | 1:60 |
| 75 | F | 2 anos 6 meses | Iporã | F | 1:480 |
| 110 | M | 6 meses | Iporã | M | 1:240 |
| 112 | F | 5 anos | Iporã | N | 1:240 |
| 127 | F | 2 anos 3 meses | Iporã | D | 1:240 |
| 137 | M | 3 anos | Palotina | B | 1:60 |
| 148 | M | 2 anos 2 meses | M. C. Rondon | Q | 1:60 |

FONTE: a autora (2017)

Figura 6: técnica de imunoperoxidase em monocamada celular em amostras de soro equino. Na imagem A nota-se a presença de células (seta) do cultivo celular, porém sem a presença do anticorpo. Na imagem B, observa-se a presença de anticorpo anti *L. intracellularis*, com marcações em vermelho (seta).



FONTE: a autora (2017)

Dos animais sorologicamente positivos, a menor titulação de anticorpos encontrada foi de 1:60 e a maior foi de 1:480. A média de idade dos animais positivos foi de 2 anos e 9 meses, sendo os animais divididos entre seis machos e três fêmeas. Destes, nenhum dos animais apresentou fezes diarreicas no momento da coleta. Dos nove animais positivos ao exame sorológico, apenas um apresentava menos de um ano de idade.

4.2 ROTAVÍRUS

Nas amostras coletadas para este experimento não foram encontrados animais eliminando partículas virais de rotavírus nas fezes através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

5. DISCUSSÃO

Nenhum dos animais positivos apresentavam manifestações clínicas compatíveis com EPE no momento da coleta e a identificação destes sinais por parte do proprietário muitas vezes era dificultada pelo fato do animal se encontrar a pasto, com outros animais e sem uma supervisão assídua dos possíveis sinais. Segundo Pusterla e Gebhart (2009), em propriedades onde foram diagnosticados animais com sinais clínicos, entre 10-65% dos potros que não apresentam manifestações clínicas e adultos são soropositivos para *L. intracellularis*.

Acredita-se que os quatro animais diarreicos observados nesse estudo estavam acometidos por outro(s) agente(s) causal(is). Além da *L.intracelullaris* e do rotavirus, o *S westeri*, a *Salmonella spp.* (Melo, et al., 2007), *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.*(Gomes et al., 2008) podem causar diarreia em equinos. Além disso todos os equinos diarreicos eram jovens. Sabe-se que indivíduos dessa faixa etária são mais predispostos a problemas entéricos e respiratórios devido a imaturidade do sistema imune (Peiró et al., 2002).

Devido ao fato da maioria dos animais no estudo serem utilizados em provas equestres ou conviverem com animais atletas, levanta-se a possibilidade dos animais contaminados atuarem como carreadores da *L. intracellularis* para ambientes externos, uma vez que as provas equestres podem ter duração de até três dias nos quais a proximidade entre animais de diferentes regiões do Estado, ou até mesmo do país, é muito grande. O trânsito destes animais por

diferentes propriedades do estado do Paraná pode ser um fator contributivo para a contaminação de animais sadios por *L. intracellularis*, carreando a bactéria para suas propriedades de origem, ou de suas propriedades para o ambiente de competição. Guimarães – Ladeira et al. (2009) identificaram animais soropositivos com idades superiores a 13 meses de idade numa propriedade no estado de Minas Gerais que não apresentavam sinais clínicos, sugerindo que estes achados podem indicar soropositividade a longo prazo e não infecção subclínica recente. Casos de animais positivos com idades acima de um ano também foram relatados por outros autores (Lavoie et al., 2000; Pusterla et al., 2009; Mayer et al., 2014). O fato de oito dos animais soropositivos deste estudo apresentarem idade acima de um ano pode estar relacionada a soropositividade a longo prazo sendo que a infecção pode ocorrer durante à movimentação destes animais entre propriedades para competições, resultando na contaminação pela ingestão acidental da bactéria presente no ambiente.

A contaminação por *L. intracellularis* também pode ocorrer através de outras fontes. Pusterela et al., (2013), foram capazes de demonstrar a via de infecção fecal-oral utilizando fezes de coelhos contaminados por *L. intracellularis* de origem equina para infectar potros. Isso implica na possibilidade de uma infecção acidental através da ingestão de fezes contaminadas por *L. intracellularis*, tanto de animais selvagens quanto de animais domésticos.

A presença de animais silvestres e pequenos roedores no mesmo ambiente dos equinos contaminados é um fator importante para a disseminação da doença. Viott et al., (2013), demonstraram a susceptibilidade de quatro

diferentes espécies de camundongos (Swiss, BALB/c, C-57 e DB-A) para *L. intracellularis*, com diferentes intensidades de lesões apresentadas em cada espécie. No mesmo experimento foram inoculadas culturas puras de *L. intracellularis* em pardais, os quais não apresentaram lesões histológicas e nem eliminação da bactéria através das fezes. Havia apenas ligeiras marcações em lâmina própria, porém sem apresentar o formato da bactéria, indicando apenas a presença de fragmentos antigênicos de *L. intracellularis*. Já Collins et al., (2011) demonstraram a presença de *L. intracellularis* nas fezes de roedores em laboratório e selvagens, sendo sua presença detectável através do PCR das fezes e sorologia por até 21 dias pós-infecção. É de conhecimento que em haras e centros equestres existe a presença constante de ratos devido ao armazenamento de grãos e ração para a alimentação da tropa, podendo estes serem vetores da doença.

McOrist et al., (2011) identificaram em fazendas de criação de suínos que algumas espécies de moscas pertencentes à ordem Diptera podem ser positivas no PCR para *L. intracellularis*, sendo que a mosca doméstica foi a qual apresentou maior número de exemplares positivos. A presença de moscas também é comum nos ambientes equestres, especialmente nos meses de maiores temperaturas, podendo elas também serem vetores para a contaminação de animais sadios por *L. intracellularis*.

Dentre os estábulos e haras visitados pode-se observar a presença de outros animais convivendo concomitantemente ou em proximidade com o alojamento e pastagens dos equinos. Cães e gatos foram os mais observados,

mas verificou-se a presença de galinhas, bovinos, coelhos e esporadicamente, macacos, sendo que encontram-se relatos na literatura da ocorrência de infecções em cães (Tomanová et al., 2003; Silva et al., 2015), galinhas (McOrist et al., 2003), macacos Rhesus (Klein et al., 1999), coelhos (Peixoto et al., 2008; Schauer et al., 1998), e felinos selvagens (Pusterla et al., 2012). A presença destes animais nas proximidades dos criatórios implica na possibilidade de transmissão da *L. intracellularis*. Silva et al. (2015) relatou a detecção de *L. intracellularis* em fezes de cães no estado de Minas Gerais, em três cães com aproximadamente 3 meses de idade através de nested-PCR, sugerindo a *L. intracellularis* como causadora de diarreia também em cães, animais muito comuns de serem encontrados transitando em ambientes equestres. Husnik et al. (2003) também relataram a ocorrência de diarreia em cães causada por *L. intracellularis* na República Tcheca.

Segundo Collins et al. (2000) a sobrevivência da *L. intracellularis* no ambiente de granjas de suínos é de 7 a 15 dias, em temperaturas que variam de 5°C a 15°C, apesar de apresentarem infectividade reduzida. Frazer (2008) e Pusterla e Gebhart (2009) relatam a sazonalidade da ocorrência dos surtos nas propriedades, sendo ela mais predominante entre os meses de agosto a janeiro no hemisfério norte, coincidindo com as baixas temperaturas necessárias para a bactéria se manter viável no ambiente. No presente estudo as coletas foram realizadas entre os meses de novembro de 2015 e maio de 2016, onde segundo o INPE, a temperatura média dos meses de janeiro a maio de 2016 foram entre mínima de 21°C a máxima de 32°C, não favorecendo uma viabilidade

prolongada para as bactérias presentes no ambiente e nas fezes dos equinos. Esse dado levanta a hipótese dos animais soropositivos terem se contaminado num período pregresso às coletas realizadas.

A queda na imunidade adquirida nos potros possibilita a explicação para a infecção de animais jovens, porém anticorpos IgG adquiridos não apresentam efeito significativo na ocorrência da enterite proliferativa equina devido sua curta vida. Fêmeas no período pós-parto podem ser soropositivas (Page et al., 2014). A técnica sorológica (imunoperoxidase em mono camada - IPMC) utilizada para a detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis* foi padronizada por Guedes et al. (2002) e tem uma sensibilidade semelhantes ao teste de imunofluorescência indireta, também utilizado para a detecção de rotina da *L. intracellularis*. A sensibilidade do teste de IPMC é de 89% e sua especificidade chega a 100%. Isso garante uma alta confiabilidade para os resultados obtidos neste experimento.

Para suínos, uma dose vacinal modesta ou primoinfecção podem induzir a níveis detectáveis de IgG específico para *L. intracellularis* em raspados de mucosa. Já altas doses podem induzir níveis detectáveis de IgG após 14 dias (Nogueira et. al, 2013). Em equinos, não se sabe a dose necessária numa infecção natural para a indução da enteropatia proliferativa. Especula-se que possa ser uma alta dose devido ao seu tamanho físico, grande volume intestinal e diferenças no ambiente gastrointestinal, assim como pode ser devido a repetidas exposições a baixas doses do antígeno (Page et al., 2011). Neste experimento, três animais apresentaram soroconversão de 1:60, três de 1:240 e

um animal 1:480, sendo que nenhum dos animais se apresentava clinicamente acometido. A baixa quantidade de animais positivos pode ser devido ao momento da coleta coincidir com os estágios iniciais da doença, quando a resposta imune humoral ainda é indetectável (Gabardo et al., 2015). A sorologia positiva caracteriza a exposição do animal à *L. intracellularis*. Equinos clinicamente afetados podem exibir títulos de anticorpos quatro vezes maiores do que os apresentados por suínos em teste sorológico de IPMC, e a eliminação de bactérias pelas fezes varia de sete a doze dias. Em suínos essa eliminação nas fezes pode ser de até 12 semanas (Vannucci e Gebhart, 2014). A baixa titulação encontrada nos animais estudados provavelmente se deve a casos de infecção subclínica. Pusterla et al. (2009) avaliou sorologicamente 68 fêmeas adultas de uma fazenda endêmica para EPE através do teste de IPMC, onde não houveram casos clínicos durante o estudo. Os animais soropositivos apresentavam títulos de anticorpos entre 60 e 240, o que está de acordo com o encontrado neste experimento.

Guimarães-Ladeira et al. (2009) avaliou a presença subclínica de *L. intracellularis* em 14 fazendas de criação de equinos no estado de Minas Gerais. Dos 223 animais pesquisados, 21 deles (9,4%) apresentavam sorologia positiva (IPMC) para a presença de imunoglobulinas G, em títulos de 1:60, sendo 14 fêmeas (66%) e 6 machos (28%) com idades entre 5 e 12 meses, e um macho e quatro fêmeas sendo considerados adultos. Gabardo et al. (2015) Avaliou a presença de *L. intracellularis* numa propriedade brasileira na região oeste do país, onde num rebanho de 300 equinos, 39 potros apresentavam idades entre

alguns dias a 21 meses, e sinais clínicos evidentes. Um dos animais foi a óbito, e onze animais pertencentes ao mesmo grupo foram testados para *L. intracellularis*, e deles, três (27,27%) apresentaram sorologia (IPMC) positiva apesar de não apresentarem diarreia. Estes animais não foram separados entre machos e fêmeas, e ao exame de PCR nenhum animal dentre os onze foram positivos. Pusterla et al. (2009) avaliou sorologicamente e por PCR em tempo real fêmeas e potros residentes numa fazenda de criação de cavalos Puros-Sangue endêmica para enteropatia proliferativa equina, no sul da Califórnia. Das 68 fêmeas avaliadas, 37 (54,4%) apresentaram títulos de anticorpos igual ou superior a 60. Dos 68 potros provenientes destas fêmeas, quando testados antes da transferência de colostro, nenhum apresentou títulos de anticorpos. Quando testados após a ingestão de colostro, 37 potros apresentaram títulos entre 60 e 240, sendo vinte e cinco animais provenientes de fêmeas que possuíam anticorpos anti *L. intracellularis* e doze nascidos de fêmeas nas quais não foram detectados anticorpos, sendo que nenhum dos potros desenvolveu sinais clínicos no decorrer do experimento. Steinman et al. (2013) determinou a existência de *L. intracellularis* na Palestina e em Israel. De um grupo de 220 equinos com animais variando entre 3 meses de idade e 30 anos, 67 (30,5%) foram apresentaram sorologia positiva para o teste de ELISA.

Quando comparados aos dados obtidos neste experimento com relação à sorologia para *L. intracellularis*, nota-se que a frequência obtida para o estado do Paraná (4,69%) é semelhante a encontrada por Guimarães-Ladeira et al. (2009) (9,4%). Já a quantidade de machos e fêmeas acometidos neste estudo e no

realizado por Guimarães-Ladeira et al. (2009) apresenta grandes diferenças, pois para o estado do Paraná foram identificados apenas 3 (2,01%) machos soropositivos e 4 (2,68%) fêmeas, enquanto em Minas Gerais foram encontrados 66% de fêmeas positivas e 28% dos machos. Já com relação ao estudo de Gabardo et al. (2015), a frequência de 27,7% de animais positivos é superior a encontrada para o estado do Paraná. Isso pode ter ocorrido devido ao grupo de equinos estudados apresentarem diarreia, o que não ocorreu com os animais no Paraná. A frequência encontrada tanto por Pusterla et al. (2009) no estado da Califórnia (Estados Unidos) e por Steinman et al. (2013) para Palestina e Israel é alta quando comparados aos dados obtidos neste estudo, sendo de 54,4% e 30,5% respectivamente. Apesar de Steinman et al. (2013) ter coletado amostras de animais adultos e potros, tanto sadios quanto com diarreia, a frequência obtida para a Palestina e Israel é cinco vezes maior do que a obtida no estado do Paraná.

Das 149 amostras coletadas, apenas 22 pertenciam a animais com até um ano de idade. Tzipori e Walker (1978), identificaram um surto de diarreia em potros em duas propriedades situadas no estado de Victoria, na Austrália. Dos 16 potros que apresentaram diarreia, em cinco deles foram identificadas a presença de rotavírus, sendo que os potros mais velhos apresentavam até 35 dias de idade. Monini et al., (2011), identificaram um surto de diarreia por rotavírus em 47 animais de uma fazenda na Itália, durante três anos, em animais com idades entre 10 dias e dois meses. Em nosso experimento, apenas dez animais apresentavam idade inferior à três meses, sendo que apenas um havia

se recuperado de um quadro diarreico na semana anterior à coleta. Na literatura a rotavirose é relatada como um problema em potros recém-nascidos (Magdesian et al., 2014), faixa etária não contemplada nesse estudo. Levando em consideração a faixa etária dos animais pesquisados, apenas nove potros tinham idades até três meses e que poderiam apresentar contaminação e eliminação de partículas virais nas fezes durante o período de viremia. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida é amplamente utilizada para a detecção de rotavírus, sendo sua especificidade considerada de 100% (Pacini et al., 1988). Apesar de sua sensibilidade ser comparada ao imunoensaio enzimático (Pereira et al., 1983), a baixa eliminação de partículas virais nas fezes são determinantes para obter resultados falso-negativos.

A ausência de sinais clínicos nos animais avaliados também corrobora com o resultado negativo para as amostras avaliadas. Trabalhos que detectaram animais positivos coletaram suas amostras exclusivamente de animais que apresentaram quadros de diarreia de leve a acentuada (Tzipori e Walker, 1978; Elschener et al, 2005; Ntafis et al 2010; Monini et al., 2011). Já Browning et al., 1991, coletou amostras de animais sadios e animais com quadro diarreico, além de amostras de leite de fêmeas lactantes. Observou-se que o título de anticorpos no leite variou entre 7 e 70 dias, podendo atenuar a transmissão da gastroenterite por rotavírus.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste experimento conclui-se que existe a presença de *L. intracellularis* nos plantéis equinos do oeste do estado do Paraná, devido a frequência de animais soropositivos encontrados ser de 4,69% dos animais estudados. Apesar de diagnosticada em sua grande maioria em equinos adultos, não deve ser totalmente descartada nos casos de diarreias em potros, uma vez que estes muitas vezes permanecem em contato com animais adultos. Portanto pode ser incluída como diagnóstico diferencial para casos de diarreia. A ausência de animais eliminando partículas virais de Rotavírus nas fezes não exclui a possibilidade de infecções por Rotavírus no estado do Paraná.

Este experimento teve como fatores diagnósticos limitantes as técnicas utilizadas, além da idade dos animais coletados, levando a possíveis resultados falso-negativos.

Referências

Alfieri, A.A.; Parazzi, M.E.; Takiuchi, E.; Médici, K.C.; Alfieri, A.F.. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 198-2002. **Tropical Animal Health Production**. v.38, p. 521-526, 2006.

Al-Gahmdj, G.M.; Gebhart, C.J.; Hayden, D.W.; Ames, T.R.. Documentation of proliferative enteropathy in foals. **Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)**. v.7, n. 2, p. 147-153, 2006.

Al-Ghamdi, G.M.; Guedes, R.M.C.; Sage, A.M.; Hayden, D.W.; Neubauer, A.; Ames, T.R.. Reproduction of proliferative enteropathy in foals using porcine intestinal mucosal homogenate. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**. v.15, n. 4, p.273-282, 2012

Allen, K.J.; Pearson, G.R.; Fews, D.; McOrist, S.; Brazil, T.J.. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weaning foal, with a tentative histological diagnosis of lymphocytic plasmatic enteritis. **Equine Veterinary Education**. v.21, n.8, p. 411-414, 2009.

Atherton, R.P.; McKenzie III, H.C.. Alternative antimicrobial agents in the treatment of proliferative enteropathy in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.26, n.11, p. 535-541, 2006.

Bae, J.K.; Wieland, B.; Sait, M.; Longbottom, D.; Smith, D.G.E; Alarcon, P. Wheelhouse, N.. Risk factors associated with *Lawsonia intracellularis* in English pig farms. **The Veterinary Journal**. v.197, p. 707-711, 2013.

Bailey, K. E.; Gilkerson, J.R.; Browning, G.F. Equine Rotavirus – Current understanding and counting challenges. **Veterinary Microbiology**. v.167, p. 135-144, 2013.

Boshuizen, J.A.; Reimerink, J.H.J.; Korteland-van Male, A.M.; van Ham, V.J.J.; Bouma, J.; Gerwig, G.J.; Koopmans, M.P.G.; Buller, H.A.; Dekker, J.; Einerhand, A.W.C.. Homeostasis and function of goblet cells during rotavirus infection in mice. **Virology**. v. 337, p. 210-221, 2005.

Boutrup, T.S.; Boesen, H.T.; Boye, M.; Agerholm, J.S.; Jensen, T.K.. Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Comparative Pathology**. v.143, n. 2-3, p.101-109, 2010.

Browning, G.F.; Chalmers, R.M.; Sale, C.S.H.; Fitzgerald, T.A.; Snodgrass, D.R.. Homotypic and heterotypic serum and milk antibody to rotavirus in normal, infected and vaccinated horses. **Veterinary Microbiology**. v.27, p.231-244, 1991a.

Browning, G.F.; Chalmers, R.M.; Snodgrass, D.R.; Batt, R.M.; Hart, C.A.; Ormarod, S.E.; Leadon, D.; Stoneham, S.J.; Rossdale, P.D.. The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic Thoroughbred foals in Britain and Ireland. **Equine Veterinary Journal**. v.23, n.6, p. 405-409, 1991b.

Collins, A.M.; Fell, S.; Pearson, H. Toribio, J.-A.; Colonisation and shedding of *Lawsonia intracellularis* in experimentally inoculated rodents and in wild rodents on pig farms. **Veterinary Microbiology**. v.150., p.384-388, 2011.

Collins, A.; Love, R.J.; Pozo, J.; Smith, S.H.; McOrist, S.. Studies on the ex vivo survival of *Lawsonia intracellularis*. **Swine Health and Production**. v.8, n.5, p. 211-215, 2000.

Cooper, D.M.; Swanson, D.I.; Barns, S.M.; Gebhart, C.J.. Comparasion of the 16S ribosomal DNA sequences from the intracellular Agents of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.47, n.3, p. 635-639, 1997a.

Cooper, D.M.; Swanson, D.L.; Gebhart, C.J.. Diagnosis of proliferative enteritis in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from a hamster, horse, deer and ostrich using a *Lawsonia intracellularis*-specific multiplex PCR assay. **Veterinary Microbiology**. v. 54, p. 47-62, 1997b.

Deprez, P.; Chies, K.; Gebhart, C.J.; Ducatelle, R.; Lefere, L.; Vanschandevijl, K.; van Loon, G. *Lawsonia intracellularis* infection in a 12-month-old colt in Belgium. **The Veterinary Record**. v.157, p. 774-776, 2005.

Dors, A.; Pomorska-Mól, M.; Czyzewska, D.; Wasyl, D.; Pejsak, Z.. Prevalence and risk factors for *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira Hyodysenteriae*, and *Salmonella* spp. in finishing pigs in Polish farrow-to-finish swine herds. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v.18, n.4, p. 825-831, 2015.

Duhamel, G.E.; Wheeldon, E.B.. Intestinal Adenomatosis in a foal. **Veterinary Pathology**. v.19, p447-450, 1982.

Elschener, M.; Schrader, C.; Hotzel, H.; Prudlo, J.; Sachse, K.; Eichhorn, W.; Herbst, W.; Otto, P.. Isolation and Molecular characterisation of equine rotaviruses from Germany. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.123 – 129, 2005.

Endara, P.; Trueba, G.; Solberg, O.D.; Bates, S.J.; Ponce, K.; Cevallos, W.; Matthijnssens, J.; Eisenberg, J.N.S.. Symptomatic and Subclinical Infection with rotavirus P[8]G9, Rural Ecuador. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, n.4, p.574-580, 2007.

Fenger, C.K.. Doenças de Potros. In: Reed, S.M.; Bayly, W.M.. **Medicina Interna Equina**. Guanabara Coogan, Rio de Janeiro, p. 803-829, 2000.

Frazer, M;L.. *Lawsonia intracellularis* infection in horses: 2005-2007. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.22, p.1243-1248, 2008.

Gabardo, M.P.; Sato, J.P.H.; Resende, T.P.; Guedes, R.M.C.. Equine proliferative enteropathy on a Brazilian farm. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.35, p.443-447, 2015.

Garaicoechea, L.; Miño, S.; Ciaret, M.; Fernández, F.; Barrandegui, M.; Parreño, V.. Molecular characterization of equine rotaviruses circulating in Argentinean foals during a 17-years surveillance period (1992- 2008). **Veterinary Microbiology**. v.148, p.150 – 160, 2011.

Gentsch, J.; Gray, J.; Iturriza-Gómara, M.; Klena, J.; Kirkwood, C.; Armah, G.; Page, N.A.. Manual of rotavirus detection and characterization methods. **World Health Organization**. 2009.

Guedes, R.C.M.; Gebhart, C.J.; Winkelman, N:L.; Mackie-Nuss, R.A.C.;Marsteller, T.A.; Deen, J.. Comparasion of different methods for diagnosis of porcine prolifereative enteropathy. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 66, p.99-107, 2002.

Guedes, R.M.C.; Gebhart, C.J.; Deen, J.; Winkelman, N.L.. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. **Journal of Veterinary 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 Investigation**. v.15, n.5, p.438-446, 2003 b.

Guedes, R.M.C.. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. **Journal Swine Health and Production**. v.12, p.134-138, 2004.

Guimarães-Ladeira, C.V.; Palhares, M.S.; Oliveira, J.S.V.; Ramirez, M.A.; Guedes, R.M.C.. Fecal shedding and serological cross-sectional study of *Lawsonia intracellularis* in horses in the state of Minas Gerais, Brasil. **Equine Veterinary Journal**. v.41, p.593-596, 2009.

Herring, A.J.; Inglis, N.F.; Ojeh, C.K.; Snodgrass, D.R.; Menzies, J.D.. Rapid

diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrilamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**. v.16, n.3, p. 473-477, 1982.

Husnik, R.; Klimes, J.; Tomanová, K.; Smola, J.; Halouzka, R.; Tichy, F.; Brazdil, J.. *Lawsonia intracellularis*, in a dog with inflammatory bowel disease. **Veterinarni Medicina**. v.48, n.5, p. 141-145, 2003.

Imagawa, H.; Ando, Y.; Sugiura, T.; Wasa, R.; Hirasawa, K.; Akiyama, Y.. Isolation of foal rotavirus in MA-104 cells. **Bulletin of Equine Research Institute**. v.18, p. 119-128, 1981.

Imagawa, H.; Wada, R.; Hirasawa, K.; Akiyama, Y.; Oda, T.. Isolation of equine rotavirus in cell cultures from foals with diarrhoea. **Japanese Journal of Veterinary Science**. v.46, n.1, p. 1-9, 1984.

Jensen, T.K.; Boesen, H.T.; Vigre, H.; Boye, M.. Detection of *Lawsonia intracellularis* in formalin-fixed porcine intestinal tissue samples: comparison of immunofluorescence and *in-situ* hybridization, and evaluation of the effects of controlled autolysis. **Journal of Comparative Pathology**. v.142, p. 1-8, 2010.

Jones, G.F.; Ward, G.E.; Murtaugh, M.P.; Rose, R.; Gebhart, C.J.. Relationship between Ileal Symbiont Intracellularis and porcine proliferative enteropathy. **Infection and Immunity**. p. 5237-5244, 1993a.

Jones, G.F.; Ward, G.E.; Murtaugh, M.P.; Rose, R.; Gebhart, C.J.. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis in feces by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 2611-2615, 1993b.

Kavanagh, O.V.; Ajami, N.J.; Cheng, E.; Ciarlet, M.; Guerrero, R.A.; Zeng, C.Q.-Y.. Rotavirus enterotoxin NSP4 has mucosal adjuvant properties. **Vaccine**. v.28, p. 3106-3111, 2010.

Klein, E.C.; Gebhart, C.J.; Duhamel, G.E. Fatal outbreaks of porcine proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaque. **Journal of Medical Primatology**. v.28, p.11-18, 1999.

Kroll, J.J.; Roff, M.B.; Hoffman, L.J.; Dickson, J.S.; Harris, D.L.H.. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. **Animal Health Research Reviews**. v.6, n.2, p.173-197, 2005.

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

Lavoie, J.P.; Drolet, R.; Parson, D.; Leguillette, R.; Sauvageau, R.; Shapiro, J.; Houle, L.; Halle, G.; Gebhart, C.J.. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada. **Equine Veterinary Journal**. v. 32, n.5, p. 418-425, 2000.

Lawson, G.H.K; McOrist, S.. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. **Journal of Comparative Pathology**. v.108, p. 41-46, 1993.

Lawson, G.H.; Gebhart, C.J.. Proliferative Enteropathy. **Journal of Comparative Pathology**. v.122, p.77-100, 2000.

Macêdo, N.R., Al-Ghamdi, G.; Gebhart, C.J.; Guedes, R.M.C.. Enteropatia proliferativa em equinos. **Ciência Rural**. v.38, n.3, p. 889-897, 2008.

MacIntyre, N.; Smith, D.G.E.; Shaw, D.J.; Thomson, J.R.; Rhind, S.M.. Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. **Veterinary Pathology**. v.40, p.421-432, 2003.

Magdesian, K.G.; Neonatal Foal Diarrhea. **Veterinary Clinics Equine Practice**. v. 21, p. 295-312, 2005.

Magdesian, K.G.; Dwyer, R.M.; Arguedas, M.G. Viral Diarrhea. In: Sellon, D.C. **Equine Infectious Diseases**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2014, p. 198-201.

Magtoto, R.L.; Vegi, A.; Wang, C.; Johnson, J.K.; Ramamoorthy, S.. Evaluation and use of a serological assay for the detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in swine. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**. v.2, p.109-113, 2014.

Marinaro, M.; Fasano, A.; Magistris, M.T.. Zonula occludens toxin acts as an adjuvant through different mucosal routes and induces protective immune response. **Infection and Immunity**. v.71, n.4, p. 1897-1902, 2003.

Mayer, J.R.; Felding, C.L.; Pusterla, N.; Magdesian, K.G.; Higgins, J.C.. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a 3.5-years-old miniature horse. **Equine Veterinary Journal**. v. 26, n.12, p. 619-621, 2014.

MacLachlan, N.J.; Dubovi, E.J.. Reoviridae. In: Fenner's Veterinary Virology. Elsevier. 5^a Ed. San Diego, CA, 2011. p. 313-315.

McClintock, S.A.; Collins, A.M.. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal in Australia. **Australian Veterinary Journal**, 2004, v.82, p.750-752.

McGurrin, M.K.J.; Vengust, M.; Arroyo, L.G.; Baird, J.D.. An outbreak of *Lawsonia*

intracellularis infection in a standardbred herd in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**. v.48, p.927-930, 2007.

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. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.45, n.4, p.820-825, 1995.

McOrist, S.; Keller, L.; McOrist, A.L.. Search for *Lawsonia intracellularis* and *Bilophila wadsworthia* in malabsorption-diseases chickens. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.67, p. 232-234, 2003.

McOrist, S.; Gebhart, C.J.. The discovery of *Lawsonia intracellularis*. **European Enterisol® Ileitis Symposium**. October 13-15, 2005, Barcelona.

McOrist, S.; Blunt, R.; Gebhart, C.J.. Pig-associated *Lawsonia intracellularis* in various on-farm dipterous fly strage. **Journal of Swine Healthand Production**. v.19, n.5, p. 277-283, 2011.

McOrist, S.; Gebhart, C.J.. Proliferative Enteropathy. In: Zimmerman, J.J.; Karriker, L.A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J.; Stevenson, G.W. (Wiley-Blackwell). **Diseases of Swines**. Ames, Iowa, 2012. p. 811-820.

Melo, U.P.; Ferreira, C.; Palhares, M.S.. Doenças gastrintestinais em potros: etiologia e tratamento. **Ciência Animal Brasileira**. v.8, n.4, p.733-744, 2007.

Monini, M.; Biasin, A.; Valentini, S.; Cattoli, G.; Ruggeri, F.M.. Recurrent rotavirus diarrhoea in a stud farm, in Italy. **Veterinary Microbiology**. v.149, p.248-253, 2011.

Nemoto, M.; Tsunemitsu, H.; Imagawa, H.; Hata, H.; Higuchi, T.; Sato, S.; Orita, Y.; Sugita, S.; Bannai, H.; Tsujimura, K.; Yamanaka, T.; Kondo, T.; Matsumura, T.. Molecular characterization and analisis of equine rotavírus circulating in Japan from 2003 to 2008. **Veterinary Microbiology**. v.152, p. 67-73, 2011.

Nogueira, M.G.; Collins, A.M.; Donahoo, M.; Emery, D.. Immunological responses to vaccination following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. **Veterinary Microbiology**. v.164, p.131-138, 2013.

Ntasis, V.; Fragkiadaki, E.; Xylouri, E.; Omirou, A.; Lavazza, A.; Martella, V.. Rotavirus-associated diarrhoea in foals in Greece. **Veterinary Microbiology**. v. 144, p. 461-465, 2010.

Oliveira, L.G.; Oliveira, M.F.E., Franciscato, D.A.; Nociti, R.P.; Mechler, M.L.; Almeida, H.M.D.S.. *Lawsonia intracellularis*: a constant challenge to modern swine production. **Journal of Veterinary Advances**. v.5, n.6, p. 952-956, 2015.

Page, A.E.; Loynachan, A.T.; Bryant, U.; Stills Jr., H.F.; Adams, A.A.; Beghart, C.J.; Pusterla, N.; Horohov, D.W.. Characterization of the interferon gamma response to *Lawsonia intracellularis* using an equine proliferative enteropathy challenge (EPE) model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.143, p. 55-65, 2011.

Page, A.E.; Slovis, N.M.; Horohov, D.W.. *Lawsonia intracellularis* and equine proliferative enteropathy. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. p.1-18, 2014.

Papp, H.; Matthijnssens, J.; Martella, V.; Ciarlet, M.; Banyai, K.. Global distribution of group A rotavirus strains in horses: a systematic review. **Vaccine**. v.31, p. 5627-5633, 2013.

Parashar, U.D.; Bresee, J. S.; Gentsch, J.R.; Glass, R.I.. **Rotavirus Emerging Infectious Diseases**. v.4, p.561-570, 1998.

Peiró, J.R.; Mendes, L.C.N.; Borges, A.S.; Feitosa, F.L.F.; Cnola, J.C.; Alessi, A.C.. Pneumonia em potros causada pelo *Rhodococcus equi*. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária**. v.5, n.1, p. 73-86, 2002.

Pereira, H.G.; Azeredo, R.S.; Leite, J.P.G.; Barth, O.M.; Sutomoller, F.; de Farias, V.; Vidal, M.N.P.. Comparison of polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE), Immuno-electron Microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v.78, n.4, p.483-490, 1983.

Pereira, C.E.R.; Vannucci, F.A.; Silva, J.P.C.; Guedes, R.M.C.. Patogênese da enteropatia proliferativa suína – revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**. v.20, p.93-99, 2013

Peixoto, P.V.; França, T.N.; Ribeiro, C.T.; Bezerra Jr., P.S.; Driemeier, D.. Proliferative enteropathy (*Lawsonia intracellularis*) outbreak in rabbits in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28, n.10, p. 447-451, 2008.

Pusterla, N.; Jackson, R.; Wilson, R.; Collier, J.; Mapes, S.; Gebhart, C.J.. Temporal detection of *Lawsonia intracellularis* using serology and real-time PCR in Thoroughbred horses residing on a farm endemic for equine proliferative enteropathy. **Veterinary Microbiology**. v.136, p. 173-176, 2009.

Pusterla, N.; Gebhart, C.J.. Equine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. **Equine Veterinary Education**. v.8, p. 415-419, 2009.

Pusterla, N., Wattanaphansak, S., Mapes, S., Collier, J., Hill, J., DiFrancesco, M., Gebhart, C.. Oral infection of weanling foals with an equine isolate of *Lawsonia*

intracellularis, agent of equine proliferative entero-pathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v.24, p. 622–627, 2010.

Pusterla, N.; Mapes, S.; Gebhart, C.J.. Further investigation of exposure to *Lawsonia intracellularis* in wild and feral animals captured on horseproperties with equine proliferative enteropathy. **The Veterinary Journal.** v. 194. p. 253-255, 2012.

Pusterla, N.; Vannucci, F.A.; Mapes, S.M.; Nogradi, N.; Collier, J.R.; Hill, J.A.; DiFrancesco, M.; White, A.M.; Akana, N.K.; Simonek, G.; Gebhart, C.J..Efficacy of an avirulent live vaccine against *Lawsonia intracellularis* in the prevention of proliferative enteropathy in experimentally infected weanling foals. **American Journal of Veterinary Research.**, v.73, n.5, p.741-746, 2012.

Pusterla, N.; Guzman, D.S-M.; Vannucci, F.A.; White, A.; DiFrancesco, M.; Gebhart, C.J.. Transmission of *Lawsonia intracellularis* to weanling foals using feces from experimentally infected rabbits. **The Veterinary Journal.** v. 195, p. 241-243, 2013a

Pusterla, N.; Gebhart, C.J.. Equine proliferative enteropathy – a review of recente developments. **Equine Veterinary Journal.** v. 45, p. 403-409, 2013b.

Ramig, R.F.. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavírus Infection. **Journal of Virology.** v.78, p.10213 – 10220, 2004.

Rizzoni, L. B.; Miyauchi, T. A. Principais doenças dos neonatos equinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.1, p.9-16, 2012.

Rodger, S.M.; Holmes, I.H.; Studdert, M.J.. Characteristics of the genomes of equine rotaviruses. **Veterinary Microbiology.** v.5, p. 243-248, 1980.

Sampieri, F.; Allen, A.L.; Pisterla, N.; Vannucci, F.A.; Antonopoulos, A.J.; Ball, K.R.; Thompson, J.; Dowling, P.M.; Hamilton, D.L.; Gebhart, C.J.. The rabbit as an nfection model for equine proliferative enteropathy. **The Canadian Journal of Veterinary Research.** v.77, p.110-119, 2013.

Sampieri, F.; Vannucci, F.A.; Allen, A.L.; Pusterla, N.; Antonopoulos, A.J.; Ball, K.R.; Tthompson, J.; Dowling, P.M.; Hamilton, D.L.; Gebhart, C.J.. Species-specificity of equine and porcine *Lawsonia intracellularis* isolates in laboratory animals. **The Canadian Journal of Veterinary Research.** v.77, p. 261-272, 2013.

Schauer, D.B.; McCathey, S.N.; Daft, B.M.; Jha, S.S.; Tatterso, L.E.; Taylor, N.S.; Fox, J.G. Proliferative enterocolitis associated with dual infection with enteropathogenic *Escherichia coli* and *Lawsonia intracellularis* in rabbits. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 36, p. 1700-1703, 1998.

Silva, R.O.S.; Gabardo, M.P.; Oliveira, J.S.V.; Lobato, F.C.F.; Guedes, R.M.C.. Detection of *Lawsonia intracellularis* fecal shedding in dogs in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**. v.45,n.9, p. 1619-1621, 2015.

Slovis, N.M. Gastrointestinal failure. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v.2, n.1, p. 79-86, 2003.

Slovis, N.M.. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in foals. **American Association of Equine Practitioners**. p. 80-85, 2014.

Smith, D.G.E.; Lawson, G.H.K.. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. **Veterinary Microbiology**. v.82, p.331-345, 2001.

Steinman, A.; Aharonson-Raz, K.; Blum, S.E.; Shnaiderman, A.; Klement, E.; Lensky, I.M.; Horohov, D.W.; Page, A.E.. Demographic and environmental Risk factors for exposure to *Lawsonia intracellularis* in horses in Israel. **Journal of Equine Veterinary Science**. p. 1-6, 2013.

Surendran, S.. Rotavirus infection: molecular changes and pathophysiology. **EXCLI Journal**. v.7, p.154 – 162, 2008.

Tzipori, S.; Walker, M.. Isolation of rotavirus from foals with diarrhoea. **AJEBAK**. v.56, n.4, p. 453-457, 1978.

Tomanová, K.; Klimes, J.; Smola, J.; Husnik, R.. Detection of *Lawsonia intracellularis* in a dog with inflammatory bowel disease using nested PCR and serology. **Veterinarni Medicina**. v. 48, n.4, p. 108-112, 2003.

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

Vannucci, F.A.; Gebhart, C.J.. Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. **Veterinary Pathology**. v.51, n.2, p. 465-477, 2014.

Viott, A.M.; França, S.A.; Vannucci, F.A.; Cruz jr., E.C.C.; Costa, M.C.; Gebhart, C.J.; Guedes, R.M.C.. Infection of sparrows (*Passer domesticus*) and different mice strains with *Lawsonia intracellularis*. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**. v.33, n.3, p. 372-378, 2013.

Wattanaphansak, S.; Singer, R.S.; Gebhart, C.J.. *In vitro* antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates. **Veterinary Microbiology**. v.134, p.305-310, 2009.

Wattanaphansak, S.; Singer, R.S.; Gebhart, C.J.. Evaluation of in vivo bactericidal activity of commercial disinfectants against *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Swine Health and Production**. v.18, n.1, p.11-17, 2010.

Wollenberg, L.; Butler, C.M.; Houwers, D.J.; Groot, M.W.; Panhuijzen, H.; van Maaner, C.; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.. *Lawsonia intracellularis*-associated proliferative enteritis in weaning foals in the Netherlands. **Tijdschr Diergeneeskd**. v 136, p. 565-570, 2011.

Wuersch, K.; Huessy, D.; Koch, C.; Oevermann, A.. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a filly. **Journal of Veterinary Medicine**. v.53, p. 17-21, 2006.

