

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Soroprevalência de *Lawsonia intracellularis* em equinos na região sul do Rio
Grande do Sul, Brasil**

Rafaela Pinto de Souza

Pelotas, 2024

Rafaela Pinto de Souza

Soroprevalência de *Lawsonia intracellularis* em equinos na região Sul do Rio Grande do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências (área de concentração: Clínica Médica Veterinária)

Orientador: Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S719s Souza, Rafaela Pinto de

Soroprevalência de *Lawsonia intracellularis* em equinos na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil [recurso eletrônico] / Rafaela Pinto de Souza ; Carlos Eduardo Wayne Nogueira, orientador. — Pelotas, 2024.
48 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. EPE. 2. Potros sobreano. 3. Diarreia. 4. Sorologia. 5. IPMA. I. Nogueira, Carlos Eduardo Wayne, orient. II. Título.

CDD 616.10896342

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Rafaela Pinto de Souza

Soroprevalência de *Lawsonia intracellularis* em equinos na região Sul do Rio Grande
do Sul

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/03/2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Juliana Felipetto Cargnelutti
Doutor em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Federal de
Santa Maria

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
PhD Veterinary Sciences pela University of Wisconsin- Madison

Agradecimentos

Aos meus pais, Antônio Cezar e Lia e aos meus irmãos Mateus e Julia por me apoiarem em todas as decisões e caminhos por mim tomados

Ao meu companheiro Gabriel, por me incentivar e me apoiar em todas as minhas escolhas

Aos meus sogros, que me acolheram em Pelotas e me deram todo o apoio e suporte como família

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira, que me oportunizou participar do Grupo Clineq e me aperfeiçoar durante esses anos, por todo o conhecimento compartilhado e amizade.

A minha coorientadora Prof^a. Dr. Bruna Curcio, pelo conhecimento compartilhado e pela atenção em sempre orientar.

As grandes amigas que conquistei, Mariana Mousquer e Vitória Müller. Sou muito grata pela cumplicidade e parceria que compartilhamos durante esses anos.

Aos colegas do grupo ClinEq pela acolhida e parceria.

Aos Haras de criação de PSI e aos Médicos Veterinários que permitiram a realização de coleta de dados e cederam seu tempo para contribuir com o experimento, tornando possível a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que auxiliaram nessa caminhada e contribuíram para a finalização deste ciclo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

“Quem deseja ver o arco-íris, precisa aprender a gostar da chuva”
Paulo Coelho

Resumo

De Souza, Rafaela Pinto. **Soroprevalência de *Lawsonia intracellularis* em equinos na região Sul do Rio Grande do Sul**. 2024. 49f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

A *Lawsonia intracellularis* é uma bactéria causadora de uma doença denominada enteropatia proliferativa equina (EPE) e que tem se tornado emergente na criação de equinos nos últimos anos. O interesse voltado a pesquisa clínica com *L. intracellularis* tem aumentado nos últimos anos, principalmente associado ao impacto negativo na criação, desenvolvimento e preço de venda de potros positivos para *L. intracellularis*. Os testes sorológicos não confirmam a presença da doença, mas identificam o status sanitário de animais vacinados e rastreiam a circulação do agente nos locais estudados. O objetivo desta tese é apresentar dois artigos, o primeiro artigo focado na descrição da soroprevalência de *L. intracellularis* em equinos de 6 haras de criação de PSI na região sul do Rio Grande do Sul. Foram utilizados 686 equinos, divididos de acordo com a faixa etária e as amostras de soro foram avaliadas por IPMA para detecção de anticorpos anti- *L. intracellularis*. A taxa de soroprevalência geral foi de 51,02%, onde as éguas reprodutoras tiveram maior percentual de detecção. O segundo artigo teve como objetivo a descrição do desenvolvimento e padronização de um teste de ELISA para diagnóstico de IgG contra *L. intracellularis* em equinos. Amostras de soro de 100 éguas reprodutoras foram utilizadas neste estudo. O teste de IPMA foi utilizado como padrão ouro. O teste de *Western blot* também foi realizado para confirmar a expressão da proteína de *L. intracellularis* alvo nos soros comprovadamente positivos e negativos e descartar reatividade cruzada com epítomos homólogos. A média dos valores de ELISA dos soros negativos foi de $0,209 \pm 0,048$ e o ponto de corte foi de 0,354. A sensibilidade e especificidade do teste de ELISA foi de 45,12% e 85,71%, respectivamente. O teste de ELISA desenvolvido neste estudo para identificação de Ac IgG anti- *L. intracellularis* apresentou potencial para ser utilizado como teste de triagem para diagnóstico sorológico de *L. intracellularis* em equinos, contudo, mais pesquisas devem ser realizadas para melhorar a acurácia deste teste e fornecer um diagnóstico mais preciso em equinos.

Palavras-chave: EPE; potros sobreano; diarreia; sorologia; IPMA

Abstract

De Souza, Rafaela Pinto. **Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in horses in Southern region of Rio Grande do Sul**. 2024. 49f. Thesis (Doctor degree in Sciences) – Programa de Pós- Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Lawsonia intracellularis is a bacterium that causes the disease Equine Proliferative Enteropathy (EPE) and which has become emerging in horse farming in recent years. Interest in clinical research with *L. intracellularis* has increased in recent years, mainly associated with the negative impact on the breeding, development and sales price of foals positive for *L. intracellularis*. Serological tests do not confirm the presence of the disease, but they identify the health status of vaccinated animals and track the circulation of the agent in the locations studied. The objective of this thesis is to present two articles, the first article focused on the description of the seroprevalence of *L. intracellularis* in horses from 6 PSI breeding studs in the southern region of Rio Grande do Sul. 686 horses were used, divided according to the range age and serum samples were evaluated by IPMA for detection of anti-*L. intracellularis* antibodies. The overall seroprevalence rate was 51.02%, where broodmares had the highest percentage of detection. The second article aimed to describe the development and standardization of an ELISA test for the diagnosis of IgG against *L. intracellularis* in horses. Serum samples from 100 broodmares were used in this study. The IPMA test was used as the gold standard. The Western blot test was also performed to confirm the expression of the target *L. intracellularis* protein in the proven positive and negative sera and to rule out cross-reactivity with homologous epitopes. The ELISA value mean of negative sera was 0.209 ± 0.048 and the cutoff point was 0.354. The sensitivity and specificity of the ELISA test were 45.12% and 85.71%, respectively. The ELISA test developed in this study to identify anti-*L. intracellularis* IgG Ab had the potential to be used as a screening test for the serological diagnosis of *L. intracellularis* in horses, however, more research must be carried out to improve the accuracy of this test and provide a more accurate diagnosis in horses.

Keywords: EPE; yearling foals; diarrhea; serology; IPMA

Lista de Figuras

- Figura 1 *Western Blot* de *L. intracellularis*. (A) O marcador molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-rad Laboratories) foi utilizado para indicar o peso molecular da proteína. Seta amarela: indica a massa molecular predita para *L. intracellularis* positiva no IPMA e ELISA. (B) Seta vermelha: indica a massa molecular predita para *L. intracellularis* positiva no ELISA e negativa no IPMA. (C) amostra negativa no IPMA e ELISA. (D) amostra negativa no ELISA e positiva no IPMA..... 12
- Figura 2 *Western Blot* de *L. intracellularis*. O marcador molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-rad Laboratories) foi utilizado para indicar o peso molecular da proteína. Seta amarela: indica a massa molecular predita para *L. intracellularis*. Seta vermelha: Amostra sem marcação para a proteína da *E. coli* C41..... 13

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resultado do ELISA para diagnóstico sorológico de <i>L. intracellularis</i> em equinos.....	30
----------	---	----

Sumário

1 Introdução.....	11
3 Artigos.....	15
3.1 Artigo 1.....	15
3.2 Artigo 2.....	27
4 Considerações Finais.....	39
Referências.....	40
Anexos.....	45

1 Introdução

Lawsonia intracellularis é o uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, que invade o citoplasma apical das células da cripta intestinal de indivíduos infectados. A bactéria tem tropismo por células com alto potencial mitótico, como células imaturas e indiferenciadas, levando a proliferação e hiperplasia de células epiteliais imaturas, resultando em diarreia por má absorção (SMITH; LAWSON, 2001; Wong, 2009; Pusterla, 2009). A doença é difundida mundialmente em criações de suínos (LAWSON & GEBHART, 2000; MACEDÔ et al., 2008) e nos últimos anos tornou-se uma doença emergente em equinos. O primeiro relato de diarreia por *L. intracellularis* em potro foi descrito no início da década 80 (DUHAMEL & WHEELDON, 1982), e posteriormente, foi denominada Enteropatia Proliferativa Equina (EPE) (WILLIAMS et al., 1996; PUSTERLA & GEBHART 2013). Desde então, foram descritos vários relatos na América do Norte (SCHUMACHER et al., 2000; BIHR, 2003; SAMPIERI et al., 2006; LAVOIE et al., 2000) Austrália (McCLINTOCK & COLLINS, 2004) e Europa (DEPREZ et al., 2005; WUERSCH et al., 2006). No Brasil, a primeira evidência de circulação do agente em equinos foi descrita por Guimarães-Ladeira et al. (2009) em potros assintomáticos com histórico de diarreia no estado de Minas Gerais. Posteriormente, a EPE foi descrita na região Sudeste e Centro Oeste (GUTTMANN et al., 2014; GABARDO et al., 2015).

O interesse voltado a pesquisa clínica com *L. intracellularis* tem aumentado, especialmente associado a criação de equinos sobreano. Estudos norte-americanos descrevem a diminuição significativa no preço de venda de potros sobreano positivos para *L. intracellularis*, em decorrência do impacto negativo no crescimento e desenvolvimento (FRAZER, 2008).

A EPE pode se manifestar em potros de 3 à 11 meses de idade, com um pico de incidência durante ou logo após o desmame (LAVOIE et al., 2000; BARRELET, 2011). A rota de contaminação de equinos, assim como em outras espécies, é fecal-oral e animais domésticos e selvagens podem atuar como reservatórios e disseminadores da doença (LAVOIE et al., 2000; LAWSON & GEBHART, 2000).

Embora a diarreia seja comumente observada em potros afetados e possa variar de fezes pastosa a aquosa, alguns potros podem não apresentar anormalidades nas fezes (PUSTERLA & GEBHART, 2013). A doença cursa com sinais clínicos como letargia, febre, edema periférico, cólica, diarreia e espessamento da parede do intestino delgado (PUSTERLA et al., 2013). Os achados clínico patológicos mais comuns são hipoproteinemia, hipoalbuminemia, leucocitose e hiperfibrinogenemia (FRAZER, 2008). É descrito que 10 a 65% dos cavalos adultos assintomáticos são soropositivos. Além disso, semelhante aos suínos, a doença pode se apresentar de forma subclínica em potros, sendo observada uma diminuição autolimitada e transitória da concentração de proteína sérica total associada a diminuição de ganho de peso diário em comparação com potros saudáveis (PUSTERLA et al., 2010b).

O diagnóstico antemortem é baseado na detecção do agente nas fezes por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sorologia. Os testes sorológicos de Imunofluorescência indireta, Imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA) e ensaios imunoenzimáticos (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*- ELISA) não confirmam a presença da doença, mas identificam o status sanitário de animais vacinados e rastreiam a circulação do agente nos locais estudados (PUSTERLA et al., 2010; MACEDÔ et al., 2008). A técnica de IPMA é o teste sorológico padrão ouro, contudo exige cultivo bacteriano em linhagens celulares e avaliadores treinados (PUSTERLA et al., 2010).

Na necropsia, as lesões macroscópicas frequentemente observadas são caracterizadas pelo espessamento difuso da mucosa do intestino delgado e redução do lúmen intestinal, atribuído a hiperplasia das criptas e edema transmural. Na análise histológica é observado o marcante encurtamento das vilosidades intestinais, hiperplasia dos enterócitos das criptas e enterócitos colunares imaturos (WUERSCH et al., 2006; GABARDO et al., 2015). O diagnóstico definitivo *post-mortem* pode ser realizado durante o exame histopatológico pela detecção da bactéria na parte apical do citoplasma do enterócito por coloração de prata, entretanto, esta coloração não é específica para *L. intracellularis* (WUERSCH et al., 2006). A utilização de Imunohistoquímica (IHQ) é considerado “padrão ouro” para detecção de *L. intracellularis* através da marcação de antígeno no ápice citoplasmático dos enterócitos e macrófagos em amostras de tecido intestinal (SCHUMACHER et al., 2000). Além disso, os tecidos intestinais também podem ser testados quanto a

presença do agente por meio de PCR, utilizando porções da mucosa ou conteúdo intestinal (WILSON & GEBHART, 2008).

O objetivo desta tese foi apresentar os dados de soroprevalência de *L. intracellularis* em equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI) na região Sul do Rio Grande do Sul e descrever o desenvolvimento e padronização de um teste de ELISA para detecção de anticorpo IgG contra *L. intracellularis* em equinos.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

High seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in thoroughbred farms in Southern Brazil

Rafaela Pinto de Souza, Mariana Andrade Mousquer, Vitória Müller, Jéssica Carolina Reis Barbosa, Fábio Pereira Leivas Leite, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Bruna da Rosa Curcio, Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Aceito para publicação na revista Journal of Equine Veterinary Science

High seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in thoroughbred farms in Southern Brazil

Abstract

The aim of the present study was to carry out a serological survey to identify the seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in six Thoroughbred farms in the Southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. During 2019 and 2020, blood samples from 686 Thoroughbred horses were obtained. The animals came from 6 different breeding farms in the South of Rio Grande do Sul, Brazil. The horses were divided into groups according to age: (1) broodmares (>5 years), (2) two year old foals, (3) yearlings, and (4) 0-6 month-old foals. Blood samples were collected by venipuncture of the external jugular vein. The detection of antibodies (IgG) against *L. intracellularis* was performed by Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA). The detection of specific antibodies (IgG) against *L. intracellularis* in the evaluated population was 51.02%. The highest detection (86.8%) of IgG was in the broodmares category, while the lowest (5.2%) was in foals of 0-6 months of age. Regarding the farms, the Farm 1 had the highest (67.4%) prevalence of seropositivity against *L. intracellularis*, while Farm 4 had the lowest (30.6%). There was no record of clinical manifestation of Equine Proliferative Enteropathy in the sampled animals. The results of this study show the high seroprevalence of *L. intracellularis* in Thoroughbred farms in the Southern of Rio Grande do Sul, suggesting a large and continuous exposure to the agent.

Key words: Equine proliferative enteropathy; diarrhea, equine, Immunoperoxidase Monolayer Assay, antibodies.

Introduction

Lawsonia intracellularis (*L. intracellularis*) is an obligate intracellular Gram-negative bacterium that break into the enterocytes of infected individuals. The proliferation of these cells results in hyperplasia of the mucosa of the small intestine, and eventually of the large intestine, causing the disease know as Equine Proliferative Enteropathy (EPE) (SMITH & LAWSON, 2001).

EPE affect foals from 3 to 11 months of age, with the peak incidence occurring during or shortly after weaning (LAVOIE et al., 2000; BARRELET, 2011). Stress factors such as separation from the mare, change of environment or feeding are proposed as possible risk factors for the occurrence of the disease at this age (LAVOIE et al., 2000). Clinical signs vary and are characterized by lethargy, fever, peripheral edema, colic, diarrhea and edematous thickening of the small intestine wall (PUSTERLA & GEBHART, 2013). Chronic weight loss can occur and is one of the reasons why the disease may have a negative impact on properties intended for the sale of yearling foals (FRAZER et al., 2009; PUSTERLA & GEBHART, 2013). The most common findings on blood count are hypoproteinemia, as a result of hypoalbuminemia, hemoconcentration, leukocytosis, and hyperfibrinogenemia (FRAZER, 2008).

The disease is worldwide distributed in pig farms (LAWSON & GEBHART, 2000; MACÊDO et al., 2008) and in recent years it has become emerging in equine husbandry systems. In Brazil, the circulation of the agent in asymptomatic horses was reported in Minas Gerais and Paraná (GUIMARÃES-LADEIRA et al., 2009; CALEFFO et al., 2021) and there are two other reports of EPE in the Southeast and Midwest regions of Brazil (GUTTMANN et al., 2014; GABARDO et al., 2015). However, in the authors' knowledge there is no description of the agent circulating in horse population in Rio Grande do Sul, Brazil.

On a breeding farm in Southern Brazil, in 2019, a 8-month-old foal had clinical signs suggestive of EPE, and tested positive for the presence of anti-*Lawsonia intracellularis* antibodies, but no DNA of the agent was detected on fecal sample by PCR (unpublished data). It is important to point out that although the definitive diagnosis of EPE has not been achieved, it was the first time that antibodies against *L. intracellularis* were detected in horses in the region. Therefore, this study aimed to carry out a serological survey to identify the seroprevalence of *L. intracellularis* in Thoroughbred farms in the Southern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Material and Methods

Animals

During the years of 2019- 2020, blood samples from 686 Thoroughbred horses were obtained on six different breeding farms on the south of Rio Grande do Sul, Brazil (31°19'53"South and 54°06'25"West). Horses were divided into groups according to age: (1) broodmares (>5 years), (2) two year old foals, (3) yearlings, and (4) 0-6 month-old foals. No signs of enteric disease were present at the time of blood sampling, although all farms had previous history of the occurrence of diarrhea without a definitive diagnosis.

All farms had transient flow of horses and provided equine hosting and rearing services for outside owners. In addition, none of the farms raised pigs, so the horses had no direct or indirect contact with these animals. However, free-living animals such as skunks, jackrabbits, rodents, among others, were identified in the region.

Sampling

Blood samples were collected by venipuncture of the external jugular vein with a vacutainer system in red top tubes without anticoagulant. Samples were centrifuged and the serum was stored in 2 ml microtubes at -20°C until analysis. All samples were sent to the Veterinary Diagnostic Laboratory of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) for detection of antibodies (IgG) against *L. intracellularis* using the Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) and the dilution of 1:60 was considered the cut-off point for seropositivity as described by Guedes et al., (2002) and Guimarães-Ladeira et al. (2009).

All procedures carried out in this study were approved by Ethical Committee for Animal Experimentation at the Universidade Federal de Pelotas (CEEAA-UFPe), under protocol 34959-2019.

Results

The results of the IPMA analysis are described in Table 1. The percentage of detection of *L. intracellularis* specific serum antibodies (IgG) in the evaluated population was 51.02%. Broodmares showed the highest percentage of detection (86.8%) while, foals of 0-6 months of age had the lowest (5.2%). Regarding the farms, the highest prevalence of antibodies against *L. intracellularis* was found in Farm 1 (67.4%) and the lowest on Farm 4 (30.6%). There was no record of clinical manifestation of EPE in the sampled animals.

Table 1. Seroprevalence of *L. intracellularis* in horses of different age groups from 6 Thoroughbred stud farms in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil.

	Broodmares	Two year old foals	Yearlings	0-6 months old foals	Farm total
	+ /n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)	+/n (%)
Farm 1	54/54 (100%)	3/7 (42,8%)	-	1/25 (4%)	58/86 (67,4%)
Farm 2	54/56 (96,4 %)	1/18 (5,5%)	2/43 (4,6%)	1/13 (7,6%)	58/130 (44,6%)
Farm 3	101/114 (87,7 %)	1/8 (12,5%)	7/85 (9,4%)	-	109/207 (52,6%)
Farm 4	34/55 (61,8%)	0/10 (0%)	1/35 (2,7%)	-	35/100 (30,6%)
Farm 5	21/26 (80,7%)	10/28 (35,7%)	1/6 (16,6%)	-	32/60 (34,7%)
Farm 6	46/46 (100%)	5/30 (16,6%)	7/27 (25,9%)	-	58/103 (56,3%)
Group total	310/351 (86,8%)	20/101 (19,8%)	18/196 (9,6%)	2/38 (5,2%)	Total
					350/686(51,02%)

Results expressed as frequency (+/n) and percentage (%).

Discussion

In the present study, none of the tested animals showed clinical disease or had a definitive diagnosis of EPE during the sampling period. However, 51.02% of these were considered seropositive. To the authors' knowledge this is the first study demonstrating the presence of seropositive horses for *L. intracellularis* in the Rio Grande do Sul, Brazil.

These results indicate that the pathogen has a higher prevalence in the South region when compared to other regions of the country where it has also been identified (Guimarães-ladeira et al., 2009; Gutmann et al., 2014; Gabardo et al., 2015; Caleffo et al., 2021). In the authors' opinion, the high percentage of positive horses can be

related to the large circulation of these animals between farms for reproductive purposes, as well as animals from other states and even from other countries, given that the region is considered the largest breeding center of racing thoroughbred in the state. On the other hand, although none of the farms has joint pig farming, several free-living animals are identified in the region, which may contribute to *L. intracellularis* dissemination and further contamination of horses, as already demonstrated in other studies (Pusterla et al., 2008; Hwang, Seo & Yeh, 2017).

There are two studies evaluating the seroprevalence of this pathogen in Brazil. The first one identified that 9.42% of 223 horses in the state of Minas Gerais were seropositive for *L. intracellularis* (Guimarães ladeira et al., 2009). And more recently, Caleffo et al. (2021) found a total of 5.55% of seropositive horses in three different regions of the Paraná state, demonstrating a lower prevalence of the bacteria than in the other regions of Brazil.

In other countries, the seroprevalence of *L. intracellularis* varies (LOUBLIER et al., 2020; PUSTERLA et al., 2008b; PAGE et al., 2011; OH, HOSSAIN & CHO et al., 2017). In a study carried out in Germany, Breuer et al. (2011) demonstrated that 100% of the broodmares evaluated were seropositive. Another study carried out in Belgium also identified a high prevalence of seropositive adult horses (98.8%) (Loublier et al. 2020). Similarly to the present study, seropositivity was higher in broodmares than in other categories. In addition, five of the six evaluated farms had seroprevalence above 80%, and in two farms of these farms all broodmares tested positive. It is important to emphasize that the results mentioned above were obtained by an Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), unlike our study, in which the IPMA technique was performed.

EPE affects mainly weaning or younger animals, and in adults it usually has an additional underlying disease process (PAGE et al., 2014). Likewise, the disease may be presented in a subclinical form in foals, with a self-limited and transient decrease in total serum protein concentration associated with a decrease in daily weight gain (PUSTERLA et al., 2010). In this study, despite the evaluated properties had a history of animals with enteric clinical signs, other agents had been identified as a cause. Only in one previous case, antibodies against *L. intracellularis* were detected in a foal with enteric disease on one of these farms (unpublished data). At the time of blood sampling, none of the foals evaluated had a history compatible with the EPE. However, the presence of positive animals in all evaluated categories may indicate constant exposure to the agent, the persistent concentration of antibodies or the presence of subclinical infection (Guimarães-ladeira et al., 2009).

Although all foals aged 0 to 6 months were born from seropositive mothers, only 5.2% of them tested positive. Interestingly, the two seropositive foals were two months old. The low seropositivity in this category may be related to the short half-life of specific maternal antibodies, the low level of antibodies ingested or absorbed through colostrum, or the low rate of reinfection in these animals (Pusterla et al., 2010). According to Pusterla et al. (2010) the duration of maternal antibodies against *L. intracellularis* was one month in most animals, and a maximum of three months. Likewise, Guimarães -Ladeira et al., (2009) tested foals from 1.5 to 5 months old and did not find any positive.

Conclusion

The results of this study showed a high seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in Thoroughbred stud farms in the Southern of Rio Grande do Sul, suggesting a large and continuous exposure to the agent. Although the diagnosis of

clinical disease is not based solely on serology, our results demonstrate the circulation of the agent and, therefore, EPE should be included in the differential diagnosis of enteropathies in young horses in the region. To expand the knowledge of the prevalence of the pathogen in the state, it would be interesting to test other breeds and other locations in the state of Rio Grande do Sul.

References

Barrelet, A., 2011. How to diagnose: Lawsonia. *Proceedings of the 50th British Equine Veterinary Association Congress* - Liverpool, United Kingdom.

Breuer, J., Schmoll, F., Uhlig, A., Schusser, G.F., 2011. A follow up study on antibodies against *Lawsonia intracellularis* in mares and foals from two breeding farms in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 124(7-8), 337–42.

Caleffo, T., Dahn, V., Dos Santos, J.G., Cheng, A.C., Faccin, M., De Mattos, M.R., Cavasin, J.P., Gabardo, M.P., Guedes, R.M.C., Viott, A.M., 2021. Occurrence of *Lawsonia intracellularis* in horses raised in three regions of the state of Paraná, Brazil. *Ocorrência de Lawsonia intracellularis em equinos criados em três regiões do estado do Paraná, Brasil. Semina: Ciências Agrárias*, 42(5), 2867-2876.

Frazer, M. L., 2008. *Lawsonia intracellularis* infection in horses: 2005–2007. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), 1243-1248.

FRAZER, M.L., 2009. Sale price and race performance in horses previously diagnosed with *Lawsonia intracellularis* infection. In: *Proceedings of the 55th Annual Convention*

of the American Association of Equine Practitioners, Las Vegas, Nevada, USA, 5-9 December. p. 35.

Gabardo, M.P., Sato, J.P.H., Resende, T.P. & Guedes, R.M.C., 2015. Equine proliferative enteropathy on a Brazilian farm. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(5), 443-447.

Guedes R.M.C., Gebhart C.J., Deen J. & Winkelman N.L., 2002. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14(6):528-530.

Guimarães-Ladeira, C.V., Palhares, M.S., Oliveira, J.S.V., Ramirez, M.A. & Guedes, R.M.C., 2009. Faecal shedding and serological cross-sectional study of *Lawsonia intracellularis* in horses in the state of Minas Gerais, Brazil. *Equine Veterinary Journal*, 41(6), 593-596.

Guttmann, P.M., Viscardi, V., Barroso, D.A. & Guedes, R.M.C., 2014. Equine Proliferative Enteropathy Caused by *Lawsonia intracellularis* in a Foal in Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(5), 701-703

Hwang, J.M., Seo, M.J., Yeh, J.Y., 2017. *Lawsonia intracellularis* in the feces of wild rodents and stray cats captured around equine farms. *BMC veterinary research*, v. 13, n. 1, p. 1-10.

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

Lawson, G.H.K. & Gebhart, C.J., 2000. Proliferative enteropathy. *Journal of Comparative Pathology*, 122(2-3), 77-100.

Loublier, C. Cerri, S., Gryspeerdt, A., Amory, H., Bauwens, C., Cesarini, C., 2020. High Seroprevalence Against *Lawsonia intracellularis* Among Adult Horses in Belgium. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 95, p. 103304.

Macêdo, N.R., Al-Ghamdi, G., Gebhart, C.J. & Guedes, R.M.C., 2008. Enteropatia proliferativa em equinos. *Ciência Rural*, 38(3), 889-897.

Oh, Y., Hossain, M.M., Cho, H.S., 2017. Seroprevalence and molecular detection of *Lawsonia intracellularis* from asymptomatic horses in Korea. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, v. 47, n. 4, p. 543-549.

Page, A.E. Stills, H.F., Chander, Y., Gebhart, C.J., Horohov, D.W., 2011. Adaptation and validation of a bacteria-specific enzyme-linked immunosorbent assay for determination of farm-specific *Lawsonia intracellularis* seroprevalence in central Kentucky Thoroughbreds. *Equine Veterinary Journal*, v. 43, p. 25-31.

1 Pusterla, N., Mapes, S., Rejmanek, D., & Gebhart, C., 2008. Detection of *Lawsonia*
2 *intracellularis* by real-time PCR in the feces of free-living animals from equine farms
3 with documented occurrence of equine proliferative enteropathy. *Journal of Wildlife*
4 *Diseases*, v. 44, n. 4, p. 992-998, 2008a.

5
6 Pusterla, N., Higgins, J. C., Smith, P., Mapes, S., & Gebhart, C., 2008b.
7 Epidemiological survey on farms with documented occurrence of equine proliferative
8 enteropathy due to *Lawsonia intracellularis*. *The Veterinary Record*, v. 163, n. 5, p.
9 156.

10
11 Pusterla, N., Jackson, R., Mapes, S. M., Noland, J., Stenbom, R. M., & Gebhart, C.,
12 2010. *Lawsonia intracellularis*: Humoral immune response and fecal shedding in
13 weanling foals following intra-rectal administration of frozen-thawed or lyophilized
14 avirulent live vaccine. *The Veterinary Journal*, v. 186, n. 1, p. 110-112, 2010.

15
16 Pusterla, N., Gebhart, C., 2013. *Lawsonia intracellularis* infection and proliferative
17 enteropathy in foals. *Veterinary Microbiology*, v. 167, n. 1-2, p. 34-41.

18 Smith, D.E. & Lawson, G.K., 2001. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the
19 pathogenesis of proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology*, 82, 331- 345.

3.2 Artigo 2

Desenvolvimento e padronização de um ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- *Lawsonia intracellularis* em equinos

Rafaela Pinto de Souza, Vitória Müller, Mariana Andrade Mousquer, Neida Lucia Conrad, Fábio Pereira Leivas Leite, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Bruna da Rosa Curcio, Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Artigo que será submetido a revista Journal of Equine Veterinary Science

Desenvolvimento e padronização de um ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- *Lawsonia intracellularis* em equinos

Resumo

O objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento e a padronização de um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG específicos contra *Lawsonia intracellularis* no soro de equinos. Foram incluídas neste estudo 100 éguas reprodutoras da raça Puro Sangue Inglês (PSI), com idade entre 5 e 20 anos, provenientes de 5 haras de criação de equinos. As amostras foram previamente testadas para presença de anticorpo contra *L. intracellularis* por IPMA e os resultados foram utilizados como controle neste estudo. Para o ELISA, as placas foram sensibilizadas com uma vacina contendo a bactéria viva avirulenta de *L. intracellularis*, a qual foi utilizada como antígeno. As amostras foram diluídas na concentração de 1:60 e 1:40. O Western blot foi realizado com a vacina viva avirulenta de *L. intracellularis* e com uma linhagem de *Escherichia coli* C41 a fim de testar a expressão da proteína de *L. intracellularis* alvo nos soros comprovadamente positivos e negativos e descartar reatividade cruzada com epítomos homólogos. O ponto de corte foi calculado com base na média dos valores de ELISA de 21 amostras de soro negativas, de valores obtidos em 3 placas diferentes. A média dos valores de ELISA dos soros negativos foi de $0,209 \pm 0,048$ e o ponto de corte (Cut-off) foi de 0,354. A sensibilidade e especificidade do teste de ELISA foi de 45,12% e 85,71%, respectivamente. Os coeficientes de variação observados no inter-ensaio variaram de 3,4% a 24,8% com uma média de 12,0%. O ELISA desenvolvido neste estudo para identificação de anticorpos IgG anti- *L. intracellularis* apresentou potencial para ser utilizado no diagnóstico sorológico de *L. intracellularis* em equinos. Mais pesquisas

devem ser realizadas para melhorar a acurácia deste teste e fornecer um diagnóstico mais preciso em cavalos.

Palavras- chave: EPE; potros sobreano; diarreia; sorologia; *Western blot*.

Abstract

The objective of this work was to describe the development and standardization of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific IgG antibodies against *Lawsonia intracellularis* in equine serum. This study included 100 Thoroughbred English (PSI) breeding mares, aged between 5 and 20 years, from 5 horse breeding studs. The samples were previously tested for the presence of antibodies against *L. intracellularis* by IPMA and the results were used as a control in this study. For ELISA, the plates were sensitized with a vaccine containing the live avirulent bacteria of *L. intracellularis*, which was used as antigen. The samples were diluted at a concentration of 1:60 and 1:40. *Western blot* was performed with the live avirulent *L. intracellularis* vaccine and with a strain of *Escherichia coli* C41 in order to test the expression of the target *L. intracellularis* protein in proven positive and negative sera and rule out cross-reactivity with homologous epitopes. The cutoff point was calculated based on the average ELISA values of 21 negative serum samples, from values obtained on 3 different plates. The mean ELISA values of negative sera were 0.209 ± 0.048 and the cut-off point was 0.354. The sensitivity and specificity of the ELISA test were 45.12% and 85.71%, respectively. The coefficients of variation observed in the inter-assay ranged from 3.4% to 24.8% with an average of 12.0%. The ELISA developed in this study to identify anti-*L. intracellularis* IgG antibodies showed the potential to be used in the serological diagnosis of *L. intracellularis* in horses. More

research must be carried out to improve the accuracy of this test and provide a more accurate diagnosis in horses.

Keywords: EPE; yearling foals; diarrhea; serology; Western blot.

Introdução

Lawsonia intracellularis é o uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, que invade o citoplasma apical das células da cripta intestinal de indivíduos infectados. A bactéria tem tropismo por células com alto potencial mitótico, como células imaturas e indiferenciadas, levando a proliferação e hiperplasia de células epiteliais imaturas, resultando em diarreia por má absorção (SMITH; LAWSON, 2001; WONG, 2009; PUSTERLA, 2009). A doença é difundida mundialmente em criações de suínos (LAWSON & GEBHART, 2000; MACEDÔ et al., 2008) e nos últimos anos tornou-se uma doença emergente em equinos. O primeiro relato de diarreia por *L. intracellularis* em potro foi descrito no início da década 80 (DUHAMEL & WHEELDON, 1982), e posteriormente, foi denominada enteropatia proliferativa equina (EPE) (WILLIAMS et al., 1996; PUSTERLA & GEBHART 2013). Desde então, foram descritos vários relatos na América do Norte (SCHUMACHER et al., 2000; BIHR, 2003; SAMPIERI et al., 2006; LAVOIE et al., 2000) Austrália (McCLINTOCK & COLLINS, 2004) e Europa (DEPREZ et al., 2005; WUERSCH et al., 2006). No Brasil, a primeira evidência de circulação do agente em equinos foi descrita por Guimarães-Ladeira et al. (2009) em potros assintomáticos com histórico de diarreia no estado de Minas Gerais. Posteriormente, a EPE foi descrita na região Sudeste e Centro Oeste (GUTTMANN et al., 2014; GABARDO et al., 2015).

1 A EPE pode se manifestar em potros de 3 à 11 meses de idade, com um pico
2 de incidência durante ou logo após o desmame (LAVOIE et al., 2000; BARRELET,
3 2011). A rota de contaminação de equinos, assim como em outras espécies, é fecal-
4 oral e animais domésticos e selvagens podem atuar como reservatórios e
5 disseminadores da doença (LAVOIE et al., 2000; LAWSON & GEBHART, 2000).

6 A doença cursa com sinais clínicos como letargia, febre, edema periférico,
7 cólica, diarreia e espessamento da parede do intestino delgado (PUSTERLA et al.,
8 2013). Estudos epidemiológicos indicam que de 10 a 65% dos cavalos adultos,
9 mesmo que nunca tenham manifestado a doença, são soropositivos, e ainda,
10 semelhante aos suínos, a doença pode se apresentar de forma subclínica em potros,
11 sendo observada uma diminuição autolimitante e transitória da concentração de
12 proteína sérica total associada a diminuição de ganho de peso diário (PUSTERLA et
13 al., 2010).

14 O diagnóstico antemortem é baseado na detecção do agente nas fezes por
15 PCR e sorologia. Os testes sorológicos de Imunofluorescência indireta,
16 Imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA) e ensaios imunoenzimáticos
17 (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*- ELISA) não confirmam a presença da
18 doença, mas identificam o status sanitário de animais vacinados e rastreiam a
19 circulação do agente nos locais estudados (PUSTERLA et al., 2010; MACEDÔ et al.,
20 2008). A técnica de IPMA é o teste sorológico padrão ouro, contudo exige cultivo
21 bacteriano em linhagens celulares e avaliadores treinados. Posto isso, o objetivo deste
22 trabalho foi descrever o desenvolvimento e a padronização de um ensaio
23 imunoenzimático indireto (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG específicos
24 contra *L. intracellularis* no soro de equinos.

1 **Materiais e Métodos**

3 *Animais*

4 Foram incluídas neste estudo 100 éguas reprodutoras da raça Puro Sangue
5 Inglês, com idade entre 5 e 20 anos, provenientes de 5 haras de criação da região Sul
6 do Rio Grande do Sul, Brazil (31°19'53"Sul and 54°06'25"Leste). Nenhuma das éguas
7 incluídas neste estudo apresentou sinais clínicos de doença entérica durante o
8 período de coleta das amostras. As amostras de soro foram colhidas através da
9 venopunção da veia jugular externa com sistema vacutainer. Após a retração do
10 coágulo, as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos e as alíquotas de
11 soro foram armazenadas a -20 °C até a análise laboratorial. Todas as amostras de
12 soro foram testadas pelo método de IPMA (padrão ouro) e ELISA.

14 *Imunoperoxidase em monocamada (IPMA)*

15 As amostras de soro foram encaminhadas para o Laboratório de Diagnóstico
16 Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para detecção de
17 anticorpos (IgG) contra *L. intracellularis* através da técnica de Imunoperoxidase em
18 monocamada (IPMA), considerada a técnica padrão ouro para diagnóstico sorológico.
19 A Diluição de 1:60 foi considerada o ponto de corte para soropositividade, como
20 previamente descrito por Guedes et al., (2002) e Guimarães- Ladeira et al., (2009).

22 *Ensaio Imunoenzimático (ELISA)*

23 As placas de poliestireno 96 poços (Olen modelo K30-6096, Kasvi) foram
24 sensibilizadas com a vacina contendo a bactéria viva avirulenta de *L. intracellularis*
25 que foi utilizada como antígeno (Enterisol leitis, Boehringer Ingelheim), na

concentração ≥ 10.4 TCID₅₀, incubadas a 4°C por 18 horas. Posteriormente as placas foram bloqueadas com leite desnatado em pó 5% por 60 minutos. Foram realizadas as diluições de 1:60 e 1:40. Os soros testados foram adicionados em duplicata e incubados por 60 minutos a 37°C. O soro conjugado *anti-equine* (Sigma-Aldrich) foi utilizado na diluição 1:4,000 e incubado durante 60 minutos a 37°C. Entre as etapas, foram realizadas sucessivas lavagens com PBS-T. A revelação da reação foi realizada adicionando 0,004g de OPD (Orto-Fenileno-Diamina) em tampão citrato-fosfato (TPS) contendo substrato (H₂O₂) e incubando a placa por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução H₂SO₄ 3%. As absorbâncias foram mensuradas no leitor de placas TP-Reader (Thermo Plate), utilizando comprimento de onda de 492nm.

Western Blot

A vacina viva avirulenta de *L. intracellularis* foi preparada com tampão redutor e desnaturada para a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Posteriormente o gel foi utilizado para a realização da técnica de *Western blot*, na qual a banda referente a bactéria *L. intracellularis* foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protan™ 0,45 µm, Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com leite desnatado em pó 3%, diluído em PBS-T por 60 minutos (PBS + 0,05% de Tween 20). Como anticorpo primário foi adicionado o soro policlonal obtido das éguas em uma diluição de 1:60 em PBS-T. Posteriormente a membrana foi incubada com anticorpo secundário IgG anti- equine conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) por 60 minutos, na diluição de 1:4,000 em PBS-T. Para revelar a reação foi utilizado 0,006 mg de DAB (3,3'-Diaminobenzidina) em solução de Tris HCl 50Mm, contendo 0,3% de sulfato de níquel e 15µl peróxido de hidrogênio.

Uma linhagem de *E. coli* C41 foi preparada com tampão redutor e desnaturada para a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, seguida da realização da técnica de *Western blot* para descartar reatividade cruzada com epítomos homólogos com outros microorganismos.

Validação do teste

O ponto de corte (*cut-off*) do teste foi calculado utilizando a média de amostras negativas de soros sabidamente negativos incluídos no ensaio, acrescidas de três vezes o desvio padrão (PEREIRA FILHO, 2023). Para validação foram calculadas a sensibilidade, especificidade. A repetibilidade do teste foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação com base em seis amostras com resultados positivos e negativos no teste de IPMA, selecionadas para repetibilidade entre as placas de ELISA ($CV = DP / \text{média} \times 100\%$) (SALIMETRICS, 2015).

Resultados

Os resultados obtidos de soros testados na diluição de 1:60 foram mais similares quando comparados ao teste de IPMA (controle). O ponto de corte foi calculado com base na média da densidade óptica (DO) de 21 amostras de soro negativas, de valores obtidos em 3 placas diferentes (PEREIRA FILHO, 2023). A DO média dos soros negativos foi de $0,209 \pm 0,048$ e o ponto de corte (Cut-off) foi de 0,354. A sensibilidade e especificidade do teste de ELISA foi de 45,12% e 85,71%, respectivamente (Tabela 1). Os coeficientes de variação observado no inter-ensaio variaram de 3,4% a 24,8% com uma média de 12,0%.

Tabela 1. Resultado do ELISA para diagnóstico sorológico de *L. intracellularis* em equinos.

Resultado do ELISA	Resultado do IPMA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	37	4	41
Negativo	45	24	69
Total	82	28	110

Os dados resultantes do ELISA foram confirmados por *Western blot*, onde foi possível detectar o antígeno de *L. intracellularis* de soros comprovadamente positivos, bem como a ausência de marcação de amostras de soro comprovadamente negativos. Todas as amostras testadas também foram negativas quanto a presença de anticorpos contra proteínas de *E. coli* C41 (Figura 1).

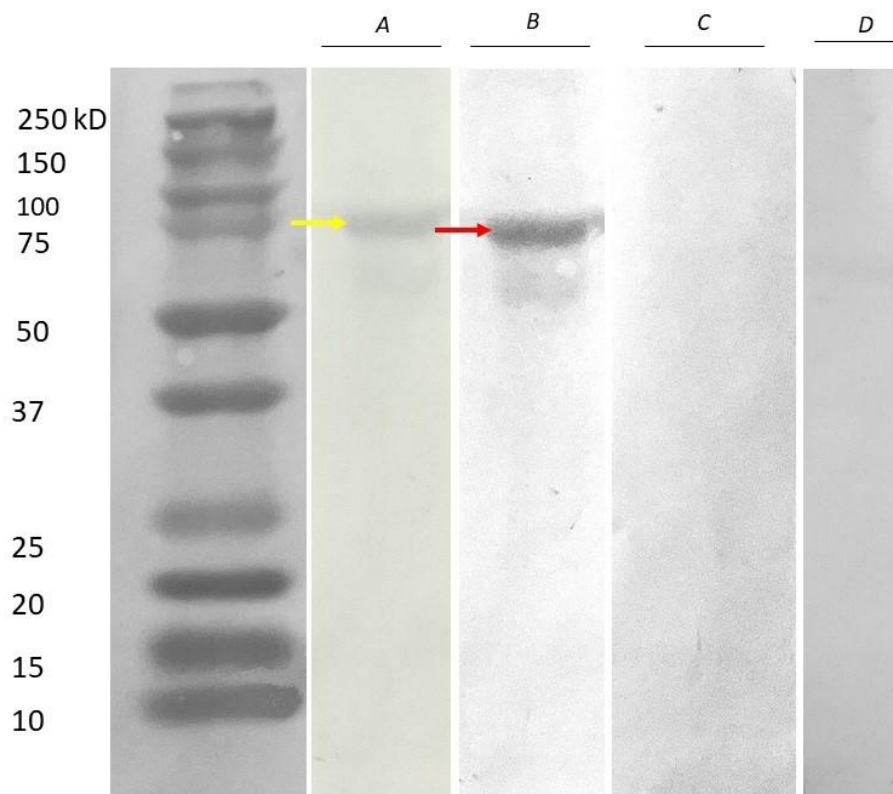
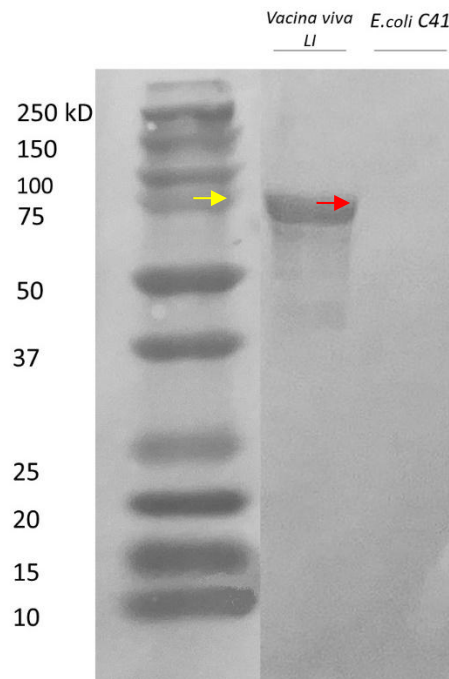


Figura 1. *Western Blot* de *L. intracellularis*. (A) O marcador molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-rad Laboratories) foi utilizado para indicar o peso molecular da proteína. Seta amarela: indica a massa molecular predita para *L. intracellularis* positiva no IPMA e ELISA. (B) Seta vermelha: indica a massa molecular predita para *L. intracellularis* positiva no ELISA e negativa no IPMA. (C) amostra negativa no IPMA e ELISA. (D) amostra negativa no ELISA e positiva no IPMA

1



2

3 Figura 2. *Western Blot* de *L. intracellularis*. O marcador molecular Precision Plus
 4 Protein Standard (Bio-rad Laboratories) foi utilizado para indicar o peso molecular da
 5 proteína. Seta amarela: indica a massa molecular predita para *L. intracellularis*. Seta
 6 vermelha: Amostra sem marcação para a proteína da *E. coli* C41.

7

8 Discussão

9

10 Neste estudo descrevemos o desenvolvimento de um teste de ELISA para
 11 detecção de anticorpos IgG específicos contra *L. intracellularis* em equinos, no qual a
 12 sensibilidade e especificidade do teste de ELISA foram de 45,12% e 85,71%,
 13 respectivamente. Os coeficientes de variação observados no inter-ensaio variaram de
 14 3,4% a 24,8% com uma média de 12,0%, o que está dentro do critério de repetibilidade
 15 padrão. Atualmente, um ELISA comercial encontra-se disponível, com sensibilidade
 16 de 72% e especificidade de até 93% (JACOBSON et al., 2011).

17

18 Na criação de equinos, o interesse voltado a pesquisa clínica com *L.*
intracellularis tem aumentado, especialmente associado a criação de equinos

sobreano. Estudos norte-americanos descrevem a diminuição significativa no preço de venda de potros sobreano positivos para *L. intracellularis*, em decorrência do impacto negativo no crescimento e desenvolvimento (FRAZER, 2008). Observa-se que a taxa de exposição a *L. intracellularis* é maior que a taxa de doença clínica, onde potros com titulação por IPMA ≥ 60 são considerados soropositivos e titulações mais altas são compatíveis com doença clínica (PUSTERLA et al., 2010). Os animais utilizados neste estudo não apresentaram sinais de diarreia ou outros sinais compatíveis com doença entérica. Em animais soropositivos, a média dos valores de ELISA foi de $0,531 \pm 0,14$ (Max. 0,937; Min. 0,379) e em animais soronegativos foi de $0,214 \pm 0,07$ (Max. 0,353; Min. 0,084). Fazendas sem histórico de EPE podem apresentar menor carga ambiental da bactéria, resultando em menor exposição dos animais e menor estimulação antigênica por exposição (PAGE et al., 2011).

Estudos moleculares de *L. intracellularis* isolada de diferentes espécies animais, incluindo o cavalo, mostraram 98% de similaridade do gene 16S-rDNA com isolados de suínos (LAVOIE et al., 2009; PUSTERLA et al., 2009; GEBHART, 2006). Em nosso estudo, uma vacina viva avirulenta de *L. intracellularis* para suínos foi utilizada como antígeno para a sensibilização das placas de ELISA, viabilizando a realização do diagnóstico na ausência de manutenção de cultivos celulares.

Uma das potenciais fontes para erro em ensaios imunoenzimáticos está associado a possibilidade de reação cruzada com outros microorganismos. Estudos filogenéticos descrevem que a *L. intracellularis* compartilha semelhança com algumas famílias de riquetsias (SCHMITZ-ESSER et al., 2008). Neste estudo não foi detectado reação cruzada entre *L. intracellularis* e espécies bacterianas de *E. coli* C41 nas amostras testadas por *Western blot*, contudo, cepas de outras bactérias não foram testadas quanto a potencial reatividade cruzada.

Mais estudos devem ser realizados para melhorar a acurácia deste teste e fornecer um diagnóstico mais preciso em cavalos.

Conclusão

O teste de ELISA desenvolvido neste estudo para identificação de Ac IgG anti-*L. intracellularis* apresentou potencial para ser utilizado como teste de diagnóstico sorológico de *L. intracellularis* em equinos.

Referências

BARRELET, A., 2011. How to diagnose: Lawsonia. Proceedings of the 50th British Equine Veterinary Association Congress - Liverpool, United Kingdom.

BIHR, T.P., 2003. Protein-losing enteropathy caused by Lawsonia intracellularis in a weanling foal. *The Canadian Veterinary Journal*, 44.

CAMPILLO, M. et al., 2021. Review of methods for the detection of Lawsonia intracellularis infection in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(4), 621-631.

DAUVILLIER, J. et al., 2006. Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in 2 foals. *The Canadian Veterinary Journal*, 47(7), 689.

DE SOUZA, R.P. et al., 2023. High Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in Thoroughbred Farms in Southern Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 128, 104890.

1 DEPREZ, P. et al., 2005. *Lawsonia intracellularis* infection in a 12-monthold
2 colt in Belgium. *The Veterinary Record*, 157(24), 774.

3
4 DUHAMEL, G.E.; WHEELSON, E.B., 1982. Intestinal adenomatosis in a
5 foal. *Veterinary Pathology*, 19(4), 447-450.

6
7 FRAZER, M.L., 2008. *Lawsonia intracellularis* infection in horses: 2005–2007. *Journal*
8 *of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), 1243-1248.

9
10 GUEDES, R.M.C. & GEBHART, C.J., 2003. Onset and duration of fecal shedding, cell-
11 mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic
12 isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary*
13 *Microbiology*. 91, 135–145.

14
15 GEBHART, C.J., 2006. *Lawsonia intracellularis* infections. Proceedings of the 19th
16 IPVS Congress, Copenhagen, Denmark.

17
18 GUIMARÃES-LADEIRA, C.V., et al., 2009. Fecal shedding and serological cross-
19 sectional study of *Lawsonia intracellularis* in horses in the state of Minas Gerais,
20 Brazil. *Equine Veterinary Journal*. 2009; 41(6): 593-596.

21
22 JACOBSON, M., et al., 2011. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of
23 antibodies against *Lawsonia intracellularis* in pig sera. *Scandinavica*; 53, 1-6.

KELLER, C. et al., 2004. A blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis*. I. Plenary Session.

LAVOIE, J.P. et al., 2000. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada. *Equine Veterinary Journal*, 32(5): 418-425.

LAWSON, G.H.K, GEBHART, C.J., 2000. Proliferative enteropathy. **Journal of Comparative Pathology**; 122(2-3): 77-100.

LEITE, F.L., et al., 2019b. The effects of *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and co-infection on IL-8 and TNF α expression in IPEC-J2 cells. **Veterinary Microbiology**; 231, 76-79.

MACÊDO, N.R, et al; 2008. Enteropatia proliferativa em equinos. **Ciência Rural**; 38(3): 889-897

MCCLINTOCK, S.A. & COLLINS, A.M; 2004. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal in Australia. **Australian Veterinary Journal**; 82(12), 750-752.

NOGUEIRA, M.G, et al., 2013. Immunological responses to vaccination following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. **Veterinary Microbiology**; 164:131–138.

PEREIRA FILHO, A.A., 2023. **ELISA: definição, variações e protocolos práticos**.
Ampla Editora.

PUSTERLA, N. & GEBHART, C.J., 2009. Equine proliferative enteropathy caused by
Lawsonia intracellularis, Clinical Commentary. **Equine Veterinary Education**; 21 (8)
415-419.

PUSTERLA, N., et al., 2010. *Lawsonia intracellularis*: Humoral immune response and
fecal shedding in weanling foals following intra-rectal administration of frozen–thawed
or lyophilized avirulent live vaccine. **The Veterinary Journal**; 186(1): 110-112.

PUSTERLA, N. & GEBHART, C., 2013. *Lawsonia intracellularis* infection and
proliferative enteropathy in foals. **Veterinary Microbiology**; 167(1-2): 34-41.

SAMPIERI, F., HINCHCLIFF, K.W & TORIBIO, R.E., 2006. Tetracycline therapy of
Lawsonia intracellularis enteropathy in foals. **Equine Veterinary Journal**, 38(1), 89-
92.

SALIMETRICS, L., 2021. Calculating inter-and intra-assay coefficients of variability.

SCHUMACHER, J., 2000. Surgical and medical treatment of an Arabian filly with
proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Veterinary
Internal Medicine**; 14(6), 630-632.

SMITH, D.G.E. & LAWSON, G.H.K., 2001. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the
pathogenesis of proliferative enteropathy. **Veterinary Microbiology**; 82(4), 331-345.

- 1 WILLIAMS, N.M; HARRISON, L.R & GEBHARDT, C.J., 1996. Proliferative enteropathy
2 in a foal caused by Lawsonia intracellularis-like bacterium. **Journal of Veterinary**
3 **Diagnostic Investigation**; 8(2), 254-256.
- 4
- 5 WÜRSCH, K., et al., 2006. Lawsonia intracellularis proliferative enteropathy in a
6 filly. **Journal of Veterinary Medicine Series A**; 53(1), 17-21.

4 Considerações Finais

O interesse voltado a pesquisa clínica com *L. intracellularis* tem aumentado no Brasil, especialmente associado a criação de equinos sobreano, tendo em vista o grande impacto nesta faixa etária. Além disso, é descrito uma diminuição significativa no preço de venda de potros sobreano positivos para *L. intracellularis*, em decorrência do impacto negativo no crescimento e desenvolvimento desses animais. Estudos de soroprevalência não confirmam a presença da doença, mas identificam o status sanitário de animais vacinados e rastreiam a circulação do agente nos locais estudados. O mapeamento epidemiológico de *L. intracellularis* auxilia nas medidas profiláticas e no planejamento de manejo desses animais.

O teste de ELISA desenvolvido neste estudo para identificação de Ac IgG anti-*L. intracellularis* apresentou potencial para ser utilizado como teste de triagem para diagnóstico sorológico de *L. intracellularis* em equinos. Mais pesquisas devem ser realizadas para melhorar a acurácia deste teste e fornecer um diagnóstico mais preciso em cavalos.

Referências

BARRELET A. How to diagnose: Lawsonia. **Proceedings of the 50th British Equine Veterinary Association Congress - Liverpool**, United Kingdom, 2011.

BIHR, T. P. Protein-losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weanling foal. **The Canadian Veterinary Journal**, 44, 2003.

BREUER, J.; SCHMOLL, F.; UHLIG, A.; SCHUSSER, G.F. A follow up study on antibodies against *Lawsonia intracellularis* in mares and foals from two breeding farms in Germany. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**. 124(7-8), 337–42, 2011.

CALEFFO, T., et al. Occurrence of *Lawsonia intracellularis* in horses raised in three regions of the state of Paraná, Brazil Ocorrência de *Lawsonia intracellularis* em equinos criados em três regiões do estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, 42(5), 2867-2876, 2021.

CAMPILLO, M., et al. Review of methods for the detection of *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 33(4) 621-631, 2021.

DAUVILLIER, J., et al. Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in 2 foals. **The Canadian Veterinary Journal**, 47(7), 689, 2006.

DE SOUZA, R.P., et al. High Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in Thoroughbred Farms in Southern Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, 128, 104890, 2023
DEPREZ, P., et al. *Lawsonia intracellularis* infection in a 12-month old colt in Belgium. **The Veterinary Record**, 157(24), 774, 2005.

DUHAMEL, G. E.; WHEELSON, E. B. Intestinal adenomatosis in a foal. **Veterinary Pathology**, 19(4) 447-450, 1982.

FRAZER, M. L. *Lawsonia intracellularis* infection in horses: 2005–2007. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 22 (5) 1243-1248, 2008.

FRAZER, M.L. Sale price and race performance in horses previously diagnosed with *Lawsonia intracellularis* infection. In: **Proceedings of the 55th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Las Vegas, Nevada, USA, 5-9 December**, 2009.

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

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**. 91: 135–145, 2003.

GEBHART C.J. *Lawsonia intracellularis* infections. **Proceedings of the 19th IPVS Congress**, Copenhagen, Denmark, Vol 1, 2006.

GUIMARÃES - LADEIRA CV., et al. Fecal shedding and serological cross-sectional study of *Lawsonia intracellularis* in horses in the state of Minas Gerais, Brazil. **Equine Veterinary Journal**. 41(6): 593-596, 2009.

GUTTMANN, P.M.; VISCARDI, V.; BARROSO, D.A.; GUEDES, R.M.C. Equine Proliferative Enteropathy Caused by *Lawsonia intracellularis* in a Foal in Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, 34(5), 701-703, 2014.

JACOBSON M., et al. Evaluation of a blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in pig sera. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 53; 23–29, 2011.&

HWANG, J.M; SEO, M.J.; YEH, J.Y. *Lawsonia intracellularis* in the feces of wild rodents and stray cats captured around equine farms. **BMC Veterinary Research**; 13(1), 1-10, 2017.

KELLER, C., et al. A blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis*. **I. Plenary Session**, 2004.

LAVOIE J.P., et al. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada. **Equine Veterinary Journal**. 32(5): 418-425, 2000.

LAWSON, G.H.K. & GEBHART C.J. Proliferative enteropathy. **Journal of Comparative Pathology**.122(2-3): 77-100, 2000.

LEITE, F.L., et al. The effects of *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and co-infection on IL-8 and TNF α expression in IPEC-J2 cells. **Veterinary Microbiology**. 231: 76-79, 2019b.

LOUBLIER, C., et al. High Seroprevalence Against *Lawsonia intracellularis* Among Adult Horses in Belgium. **Journal of Equine Veterinary Science**. 95: 103304, 2020.

MACÊDO, N.R.; AL-GHAMDI, G.; GEBHART, C.J.; GUEDES, R.M.C. Enteropatia proliferativa em equinos. **Ciência Rural**. 38(3): 889-897, 2008.

MCCLINTOCK, S.A & COLLINS, A.M. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal in Australia. **Australian Veterinary Journal**, 82(12), 750-752, 2004.

NOGUEIRA M.G., et al. Immunological responses to vaccination following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. **Veterinary Microbiology**, 164, 131–138, 2013.

OH, Y.; HOSSAIN, M.M.; CHO, H.S. Seroprevalence and molecular detection of *Lawsonia intracellularis* from asymptomatic horses in Korea. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**; 47(4), 543-549, 2017

PAGE, A.E., et al. Adaptation and validation of a bacteria-specific enzyme-linked immunosorbent assay for determination of farm-specific *Lawsonia intracellularis* seroprevalence in central Kentucky Thoroughbreds. **Equine Veterinary Journal**; 43; 25-31, 2011.

PEREIRA FILHO, A.A. ELISA: definição, variações e protocolos práticos. Amplla Editora, 2023.

PUSTERLA N. & GEBHART, C.J. Equine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*, Clinical Commentary. **Equine Veterinary Education**; 21(8), 415-419, 2009.

PUSTERLA, N.; JACKSON, R.; MAPES, S.M; NOLAND J.; STENBOM R.M.; GEBHART, C. *Lawsonia intracellularis*: Humoral immune response and fecal shedding in weanling foals following intra-rectal administration of frozen-thawed or lyophilized avirulent live vaccine. **The Veterinary Journal**; 186(1): 110-112, 2010.

PUSTERLA, N. & GEBHART C. *Lawsonia intracellularis* infection and proliferative enteropathy in foals. **Veterinary Microbiology**; 167(1-2): 34-41, 2013.

SAMPIERI, F., HINCHCLIFF, K. W., & TORIBIO, R. E. Tetracycline therapy of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in foals. **Equine Veterinary Journal**, 38(1), 89-92, 2006.

SALIMETRICS, L. Calculating inter-and intra-assay coefficients of variability. 2021.

SCHUMACHER, J.; SCHUMACHER, J.; ROLSMA, M.; BROCK, K. V. & GEBHART, C. J. Surgical and medical treatment of an Arabian filly with proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 14(6), 630-632, 2000.

SMITH, D.G.E. & LAWSON, G.H.K. *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. **Veterinary Microbiology**; 82(4); 331-345, 2001.

WILLIAMS, N.M.; HARRISON, L.R.; GEBHART, C.J. Proliferative enteropathy in a foal caused by *Lawsonia intracellularis*-like bacterium. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**; 8(2); 254-256, 1996.

WÜRSCH, K., et al. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a filly. **Journal of Veterinary Medicine Series A**; 53(1); 17-21, 2006.

Anexos

Anexo A - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

09/03/2020

SEI/UFPel - 0893252 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
21/2020/CEEA/REITORIA
23110.034959/2019-15

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Prevalência e caracterização dos enteropatógenos presentes em potros sem diarreia e potros com diarreia do nascimento ao oitavo mês de vida e determinação dos potenciais fatores de risco**”, registrada com o nº 23110.034959/2019-15, sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Wayne Nogueira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 17/12/2019.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/11/2019 a 01/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Equina/PSI
Nº de animais	76
Idade	38 de 0-7 meses e 38 de 2 a 15 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Fazenda localizada em Rodovia BR 153 Km 156, Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil

Código para cadastro nº CEEA 34959-2019

https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1024049&infra_sist... 1/2

09/03/2020

SEI/UFPel - 0893252 - Parecer

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, Médico Veterinário, em 09/03/2020, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_documento=1024049&infra_sist... informando o código verificador 0893252 e o código CRC D50BA88A.