

Associação à positividade da *Lawsonia intracellularis* com a expressão clínico-patológica da infecção em suínos da região metropolitana de Bucaramanga (Santander, Colômbia)

[Association to positivity of *Lawsonia intracellularis* with the clinical and pathologic expression of infection in swine from the metropolitan area of Bucaramanga (Santander, Colombia)]

A.P. Jiménez, L.Z. Duarte, L.S. Cortez, M. Granados, C. Florez,
A. Villamizar, J.A. Parra-Martin

Universidad Cooperativa de Colombia – UCC – Bucaramanga, CO

RESUMO

Porções de íleo terminal foram coletados de 100 suínos com sinais de doença gastrointestinal na área metropolitana de Bucaramanga, a fim de se estudar a eficiência do diagnóstico de enteropatia proliferativa suína (PPE) pela técnica de PCR aninha (PCRa) empregando sequências específicas (*primers*) para *L. intracellularis*: 16S ARN região (270pb) e sua correlação com achados clínicos e patológicos. Todas as amostras foram processadas para se determinar a associação entre positividade por PCR, os sinais clínicos, os achados de necropsia e as lesões histológicas. Cinquenta e seis por cento das amostras foram positivas para *L. intracellularis* pela PCRa. Só 2% exibiram resultados positivos pela técnica Warthin-Starry. Trinta e um de 100 animais com sinais de anorexia resultaram positivos para PCRa ($P>0,05$). Não houve associação ($P<0,05$) entre diarreia e queda no crescimento, bem como associação ($P<0,05$) entre achados anatomopatológicos e histológicos com PCRa positivas.

Palavras-chave: ileíte suína, PCR, Warthin-Starry

ABSTRACT

Fragments of terminal ileum were collected from 100 pigs at slaughter from Bucaramanga Metropolitan Area (Santander, Colombia), to study the efficacy of the diagnosis of porcine proliferative enteropathy (PPE) through the technique of nested polymerase chain reaction (PCRa), employing specific sequences (*primers*) for *L. intracellularis*: 16S ARN region (270pb) and his correlation with clinic and pathological findings. All samples were processed by standard histological methods and stained with a Warthin-Starry technique. All samples were processed to determinate the association between positive PCRa results, clinical signs and necropsy findings. 56% of the 100 samples were positive for *L. intracellularis* through PCRa technic. Only 2% exhibited positive results through Warthin-Starry technique. A total of 31 (100) animals with anorexic symptoms were associated with positive results from PCRa ($P>,05$). No associations ($P<0.05$) were observed between diarrhea and delayed growth. No associations ($P<0.05$) were observed between anatomopathological and histological findings with positive PCRa.

Keywords: porcine proliferative enteropathy, PCR, Warthin-Starry

INTRODUÇÃO

A enteropatia proliferativa suína (EPS) é uma doença infecciosa bacteriana que tem origem na bactéria Gram (-) *Lawsonia intracellularis*, caracterizada pela proliferação de células do

epitélio, espessamento da parede do intestino delgado e às vezes na porção superior do cólon. A incidência da infecção pela *L. intracellularis* em suínos tem aumentado no mundo; países como México, Estados Unidos e Espanha reportam positivities de 30-40% (Escatel *et al.*, 2005).

Recebido em 7 de setembro de 2016

Aceito em 25 de novembro de 2016

E-mail: angela.jimenez@campusucc.edu.co

O impacto econômico gerado pelos espécimes intestinais do tipo ileíte suína pode ser de grande relevância em países como Brasil, Chile, Argentina, México e Colômbia, por estes serem os maiores produtores de carne suína na região (Boari *et al.*, 2014; Varela, 2014). Na Colômbia, foram encontradas prevalências de 20-87%, principalmente nos estados de Antioquia e Cundinamarca (Barbosa *et al.*, 2005).

No estado de Santander, não existe informação que permita ter um panorama atual sobre a situação da infecção na indústria suína. Assim, esta pesquisa teve como objetivo determinar, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) aninhada, a presença de *L. intracellularis* em suínos da região metropolitana de Bucaramanga, no estado de Santander (Colômbia), e sua associação positiva com os achados clínico-patológicos para o estabelecimento da linha-base, que permitam determinar a situação epidemiológica da *L. intracellularis*.

MATERIAL E MÉTODOS

De granjas suinocultoras da região metropolitana de Bucaramanga, foram coletadas 100 amostras de porções terminais de íleos de suínos mortos que apresentaram sintomas relacionados com a doença intestinal, tais como anorexia, perda de peso, diarreia e baixa conversão. As variáveis idade e sexo foram desconsideradas. Foram registrados, para cada animal, os sinais clínicos, além dos achados de necropsia (colite, espessamento da parede intestinal, enterite, enterite hemorrágica e enterite necrótica).

Na amostragem, a porção de íleo foi dividida em duas: a primeira foi armazenada em solução buffer TE 0,1X (Tris HCl 1M; EDTA 0,5M; pH 8,0), sendo conservada sob ultracongelamento (-60°C) para extração de ácido desoxirribonucleico (ADN) e PCR; a outra porção foi submersa em formol a 10%, armazenada e mantida em temperatura ambiente para análise histopatológica.

Para cada uma das 100 amostras, foi extraído ADN cromossomal usando-se *kit* de extração Purelink Genomic DNA Mini kit Invitrogen®, segundo metodologia descrita por Martínez e Silva (2013).

Terminado o processo de extração, as amostras de ADN foram quantificadas por fluorímetro Qubit Fluorometer® (Invitrogen S.A.). Cada um dos ADN foi diluído à concentração de $10\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ em água estéril e armazenado a -60°C. Para constatar a qualidade dos extratos de ADN obtidos, foi feita uma eletroforese em gel de agarose (Merck®) a 1,5%, por uma hora, a 74V, utilizando-se um padrão de peso molecular de 100pb Promega® e corante AZ Vision Amresco®.

Para cada um dos ADN quantificados e diluídos, foi feita uma PCR aninhada para amplificar o gene 16S ARN de *L. intracellularis* de 270pb. Realizou-se uma primeira amplificação da porção de 319pb do gene 16S ARN com *primers* externos: 5'-TAT GGC TGT CAA ACA CTC CG-3' e 5'-TGA AGG TAT TGG TAT TCT CC-3'; o produto dessa primeira amplificação foi usado de molde para uma segunda reação que amplificou uma porção interna de 270pb do gene 16S RNA de *L. intracellularis*, utilizando-se os *primers* internos específicos: 5'-TTA CAG GTG AAG TTA TTG GG-3' e 5'-CTT TCT CAT GTC CCA TAA GC-3 (Jones *et al.*, 1993; Jacobson *et al.*, 2004). As condições das PCRs e a obtenção de controles positivos de microrganismos inteiros da vacina Enterisol® Ileítis (Boheringer Ingelheim) foram padronizadas (Martínez e Silva, 2013).

Para cada reação de PCR, foi incluída como controle negativo água, substituindo o ADN molde, e mistura de reagentes sem água nem ADN molde.

As condições ótimas para as PCR, tanto para aquelas com *primers* internos quanto para as outras com *primers* externos, incluíram: 2,5mm de MgCl_2 ; 0,15MM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (DNTP); 1X de buffer de reação; 0,8 μm de cada *primer*; y 2,5U da enzima ADN Taq polimerase. As temperaturas ótimas de anelamento para a PCR simples e aninhada foram de 50 e 55°C, respectivamente.

Os produtos de ambas as PCRs foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, misturando-se 7 μL de amplificado com 3 μL de corante EZ-Vision DNA Dye - AMRESCO (Solon, OH, EUA), em solução buffer TAE 1X a 74V, por uma hora. Empregou-

Associação à positividade...

se padrão de peso molecular de 100pb de Promega®. Os géis foram visualizados em transiluminador UV (Biotec-fischer®).

As amostras de íleo foram conservadas em formol a 10%. Foi feita montagem dos tecidos nas lâminas de vidro no Laboratório de Patologia da Universidade Industrial de Santander. Foram então enviadas ao Departamento de Patologia da Universidade de Antioquia para o procedimento de coloração de Warthin-Starry (Warthin e Chronister, 1920) As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz (Olympus CX21®) na Universidade Cooperativa de o Departamento Colômbia - Bucaramanga. As lâminas foram, então, analisadas em microscópio óptico de luz (Olympus CX21®). Foram registrados os achados histopatológicos relacionados com a infecção (hiperplasia de células das criptas intestinais, atrofia das vilosidades), assim como a presença do microrganismo.

A análise dos dados incluiu sua descrição (%) no intuito de determinar as associações entre a positividade por PCR, os sinais clínicos (anorexia, diarreia e déficit de crescimento) e os achados de necropsia (colite, espessamento da parede intestinal, enterite, enterite hemorrágica e enterite necrótica). Utilizou-se o teste qui-quadrado para ver o ajuste dos dados. Os resultados de PCR foram comparados com os dados de histopatologia por meio do teste de Fisher.

RESULTADOS

De todas as 100 amostras de tecido, foi obtido ADN cromossomal de enterócitos (Fig. 1). As concentrações foram desde $20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ até $800\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

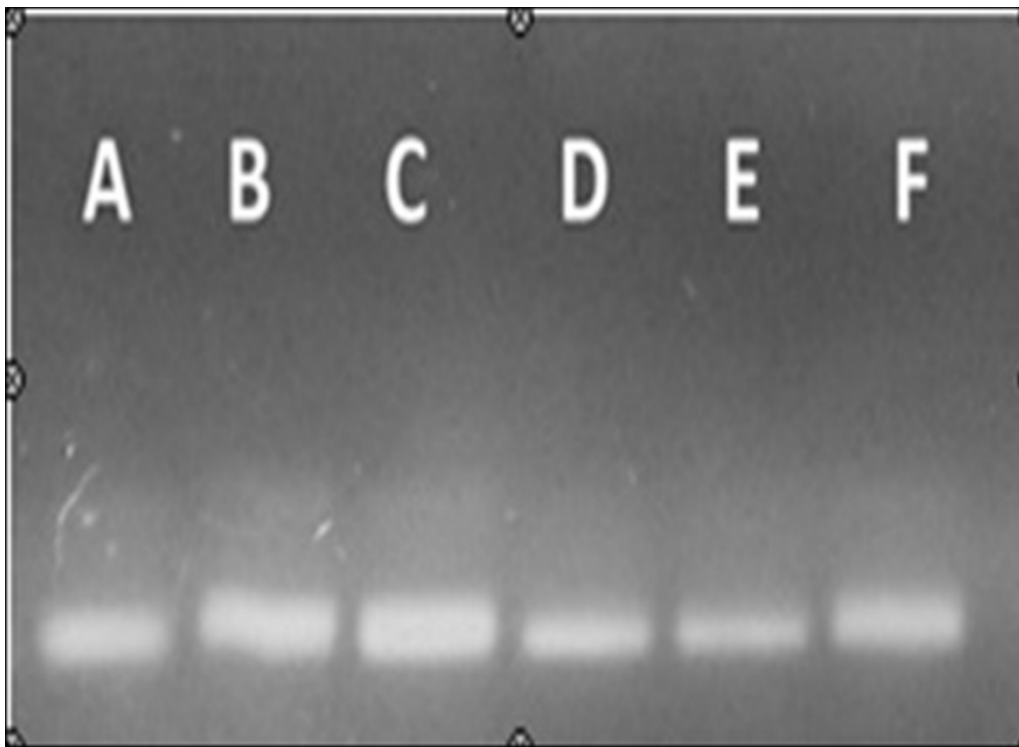


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. A-F: ADN cromossomal extraído de íleo suíno (Purelink Genomic DNA Mini kit Invitrogen®).

Cinquenta e seis por cento das amostras avaliadas pela PCR aninhada resultaram positivas para *L. intracellularis*. A Fig. 2 apresenta as bandas obtidas nas amostras

correspondentes à amplificação da porção de 270pb do gene ácido ribonucleico ribossômico (ARNr), bandas que coincidem com o controle positivo (ADN obtido de microrganismos

inteiros purificados: vacina Enterisol® Ileítis (Boheringer Ingelheim). Para cada uma das reações de PCR realizadas, tanto os controles

positivos quanto os negativos comportaram-se como esperado.

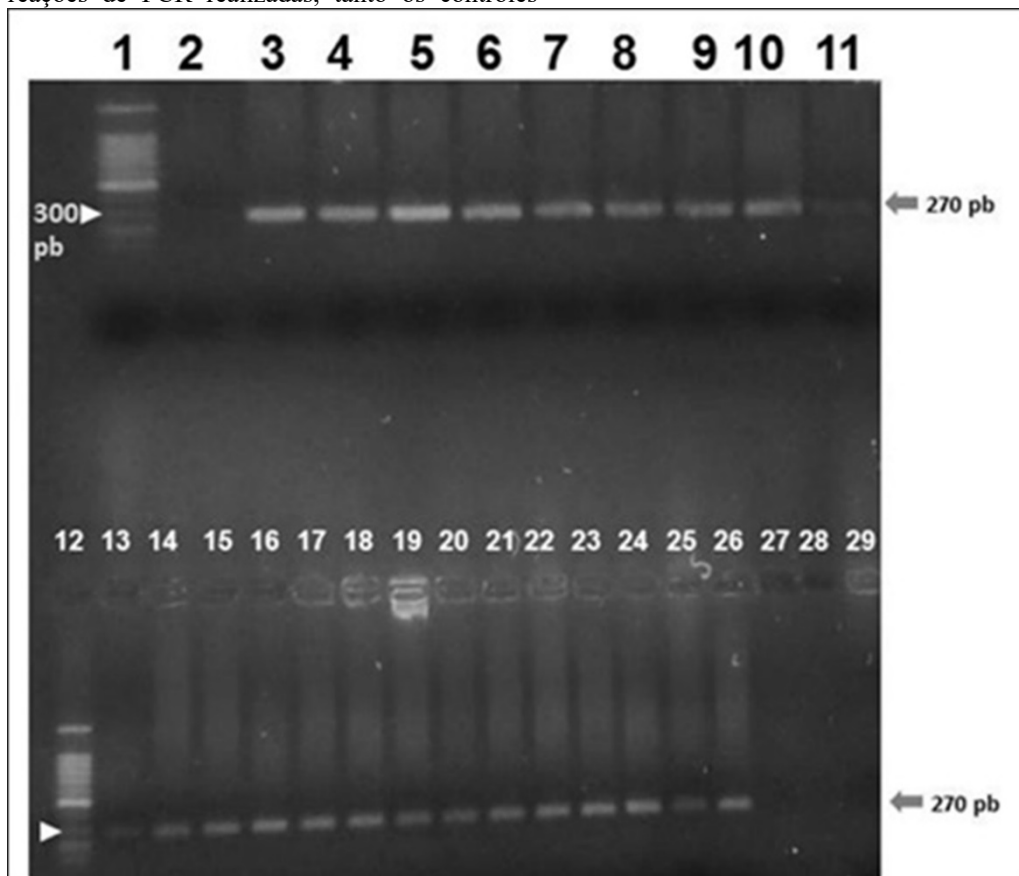


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produtos da amplificação da porção de 270pb do gene 16S ARNr de *Lawsonia intracellularis*. 1 e 12: padrão de peso molecular de 100pb Promega®; 2 e 13: controle positivo; 3 - 26: amostras positivas; 27-29: controle negativos.

Em 2% dos tecidos analisados com corante de Warthin-Starry, detectou-se hiperplasia leve das criptas intestinais, sem a presença da bactéria. Na mucosidade intestinal, identificou-se atrofia severa de vilosidades com descamação difusa de enterócitos. O percentual de tecidos que não apresentou hiperplasia de criptas intestinais foi de 2%. Detectou-se a presença da bactéria com morfologia espiral, invadindo a porção apical citoplasmática em enterócitos da cripta intestinal (Fig. 3.). Só duas amostras resultaram positivas por PCR, além de sê-lo também por corante.

Os animais apresentaram anorexia em 31% dos casos, sendo 23 positivos por PCR, havendo, então, uma associação significativa ($P < 0,05$) entre a apresentação de anorexia e a positividade

por PCR. Não houve associação significativa ($P > 0,05$) ao serem comparados os resultados de PCR aninhada com apresentação de diarreia ou retardamento no crescimento nem entre os achados anatomopatológicos da necropsia (colite, espessamento da parede intestinal, enterite, enterite hemorrágica e enterite necrótica) e a positividade por PCR.

Os achados histológicos como hiperplasia de criptas intestinais e atrofia de vilosidades não apresentaram associação significativa ($P > 0,05$) com a positividade por PCR. Ao ser feita a análise estatística dos resultados pelo teste de Fisher, encontrou-se que não há associação entre a positividade por corante Warthin-Starry e a positividade por PCR aninhada.

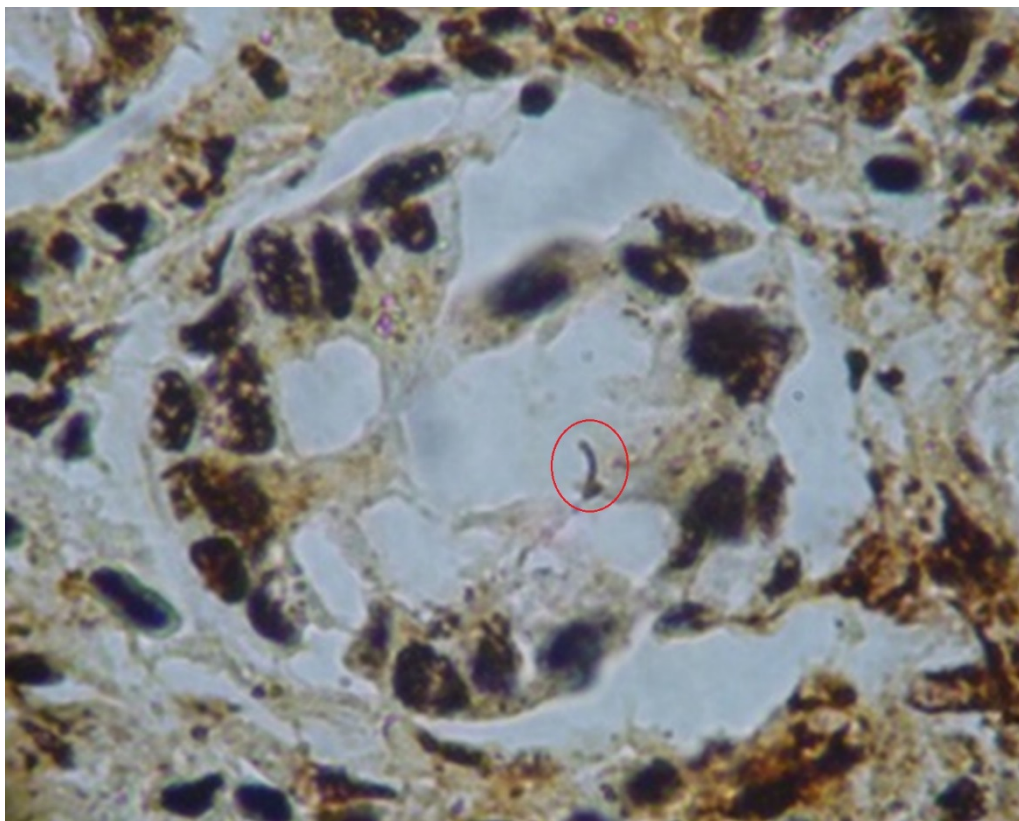


Figura 3. Microfotografia do tecido intestinal suíno (cripta). Histopatologia pela técnica de coloração de Warthin-Starry. Observa-se presença de *Lawsonia intracellularis* no citoplasma. 100x.

DISCUSSÃO

O presente estudo confirmou a presença de *L. intracellularis* em granjas suinocultoras da região metropolitana de Bucaramanga, por meio da técnica de PCR aninhada e histopatologia por corante Warthin-Starry. Cinquenta e seis por cento dos animais foram positivos para infecção por PCR. Só 2% resultaram positivos por corante Warthin-Starry. Achados de Plawinska *et al.* (2004) foram concordantes: esses autores empregaram PCR aninhada e detectaram ADN de *L. intracellularis* em 53,3% (194/364) dos casos estudados.

Na Colômbia, a EPS tem sido diagnosticada com base nas lesões reportadas em necropsia e no diagnóstico histológico, embora se observado ao microscópio com corante Warthin-Starry permite observar a bactéria, o mesmo não é específico para *L. intracellularis* devido ao fato de outros microrganismos morfológicamente similares existirem e de haver limitações quando se aplica a amostras necróticas ou autolisadas. Por isso,

em animais em fase necrótica da doença, o diagnóstico por histopatologia para identificação do agente é complexo, pois as lesões necróticas severas em vilosidades intestinais dificultam a detecção da bactéria, sendo, então, de grande relevância as técnicas moleculares, como a PCR, para identificação do agente em fases necróticas da doença. Esse fato é corroborado nesta pesquisa, já que só 2% dos casos resultaram positivos por corante, sendo, em um dos casos, a estrutura bacteriana difusa em razão das mudanças morfológicas pela necrose ocasionada pelo curso da doença.

O único sinal clínico que apresentou associação significativa com a positividade por PCR foi anorexia; outros autores reportam percentuais baixos (8%) de animais com sinais como diarreia e perda da condição corporal (Calle *et al.*, 2006)

Nenhum dos achados de necropsia foi associado significativamente à positividade por PCR, o que poderia estar relacionado com a observação de bactérias extracelulares

(cocobacilares) nos tecidos avaliados com características morfológicas diferentes de *L. intracellularis*, as quais poderiam estar relacionadas com as lesões encontradas, mas sem ser consequência da *L. intracellularis*, fato que também foi reportado por Rodríguez *et al.* (2009).

Os resultados histológicos deste estudo são similares aos achados do Barbosa *et al.* (2005), autores que, baseados num estudo retrospectivo (1998-2004) dos casos diagnosticados pelo Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), reportaram que só 11% dos casos estudados com corante Warthin-Starry apresentaram hiperplasia leve das células epiteliais com diminuição das células calciformes. Os autores no detectaram a presença da bactéria nos tecidos.

A *L. intracellularis* tem sido estudada em alguns estados da Colômbia (Rodríguez *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2005) empregando-se o método do corante de Warthin-Starry ou a imunohistoquímica para detecção da bactéria, sendo Antioquia, Cundinamarca e Valle del Cauca os estados que apresentam maior número de casos da doença. Muitos outros estados, entretanto, não têm sido estudados, sendo, então, esta pesquisa o primeiro reporte de detecção molecular da bactéria *L. intracellularis* em granjas suinocultoras do estado de Santander, o que representa o primeiro elo para determinar a situação epidemiológica da doença e o desenvolvimento de programas de prevenção e controle pelo estado.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, A.; GIL, A.; RUIZ, S.; RINCÓN, M. *et al.* Detección de *Lawsonia intracellularis* en cerdos por medio de las técnicas de tinción de plata e inmunohistoquímica. *Rev. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.12-23, 2005.
- BOARI, R.; CHUARD, N.; FERNÁNDEZ, V.; POUILLER, P. Mercado de ganados y carnes proyecciones 2023 OCDE-FAO, 2014. Disponible en : <<http://www.agroindustria.gob.ar/site/ganaderia/bovinos/05=Mercados/04=Carnes/archivos/000003=Mercao%20internacional%20de%20carnes/000001-Proyecci%C3%B3n%20OCDE%20FAO%20carnes%202014-2023.pdf>>. Consultado en: 10 fev. 2016.
- CALLE, S.; CHAVERA, A.; SANDOVAL, N. *et al.* Detección de ileítis necrótica causada por *Lawsonia intracellularis* en porcinos de granjas tecnificadas de la zona de Lima. *Rev. Inv. Vet.*, v.17, p.67-72, 2006.
- ESCATTEL, G.S.; VARGAS, F.D.; CARRERA, E. *et al.* Determinación de la frecuencia de piaras infectadas con *Lawsonia intracellularis* en México mediante la técnica de PCR. *Tec. Pecu. Mex.*, v.2, p.211-218, 2005.
- JACOBSON, M.; ASPAN, A.; KÖNIGSSON, M.H. *et al.* Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. *Vet. Microbiol.*, v.102, p.189-201, 2004.
- JONES, G.F.; WARD, G.E.; MURTAUGH, M.P. *et al.* Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.2611-2615, 1993.
- MARTINEZ, M.; SILVA, Y. Estandarización de una PCR anidada para la detección de *Lawsonia intracellularis* en tejidos porcinos (Fase I proyecto CONADI: prevalencia de *Lawsonia intracellularis* en explotaciones porcinas de la zona metropolitana de Bucaramanga), 2013. Monografía (Proyecto de graduación) - Escola de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Col.
- PLAWINSKA, J.; JAKUBOWSKI, T.; RZEWUSKA, M.; BINEK, M. Occurrence of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* spp. infection in swine suffering from diarrhoea. In: CONGRESS PROCEEDINGS OF THE International Pig Veterinary Society, 18., 2004, Hamburg. *Proceedings...* Hamburg: [s.n.], 2004. p.287.
- RODRÍGUEZ, B.; ARANZAZU, D.; GIRALDO, G. *et al.* Prevalencia de enteropatía proliferativa porcina y caracterización histopatológica de las lesiones asociadas en cerdos sacrificados en el Matadero Municipal de Medellín., *Rev. Col. Cienc. Pecu.*, v.17, p.11-19, 2009.
- VARELA, D.B. Producción de carne en America Latina. PORCIAMERICAS CONGRESO NACIONAL, ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE PORCICULTORES, 17., 2014. Disponible en: <<http://www.porcicol.org.co/porcicultores/images/prueba/3DIEGOBranProdCarneLAPorciamericas2014.pdf>>. Consultado en: 18 fev. 2016.
- WARTHIN, A.; CHRONISTER, A. A more rapid and improved method of demonstrating spirochetes in tissues (Warthin and Starry's cover-glass method). *Am. J. Syphilis*, v.4, p.97-103, 1920.