UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola De Veterinária
Programa De Pós-Graduação Em Ciência Animal

Ricardo Pereira Laub

RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM SUINOS IMUNIZADOS COM A VACINA INATIVADA PORCILIS® ILEITIS E DESAFIADOS COM *Lawsonia intracellularis*

Belo Horizonte
2023

Ricardo Pereira Laub

RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM SUINOS IMUNIZADOS COM A VACINA INATIVADA PORCILIS® ILEITIS E DESAFIADOS COM *Lawsonia intracellularis*

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Coorientadores: Prof. Andrey Pereira Lage
Prof. Fabio Augusto Vannucci

Belo Horizonte
2023

Laub, Ricardo Pereira,1989 -

L366r Resposta imune celular e humoral em suínos imunizados com a vacina inativa Porcilis® Ileitis e desafiados com *Lawsonia intracellularis* / Ricardo Pereira Laub. – 2023.

77f: il

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes

Coorientadores: Andrey Pereira Lage

Fábio Augusto Vannucci

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Bibliografias: f. 67 a 77.

1- Suínos - Teses – 2. Diarreia em animais – Teses – 3. Veterinária – Teses - I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho – II. Lage, Andrey Pereira - III. Vannucci, Fábio Augusto – IV.Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.4

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE TESE - RICARDO PEREIRA LAUB

Às 08:30 horas do dia 24 de fevereiro de 2023, reuniu-se, na Escola de Veterinária UFMG a Comissão Examinadora de Tese, para julgar em exame final, a defesa da tese intitulada:

"RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM SUÍNOS IMUNIZADOS COM A VACINA PORCILIS® ILEITIS E DESAFIADOS COM LAWSONIA INTRACELLULARIS"

como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em Patologia Animal.

Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Roberto Mauricio Carvalho Guedes**, após informar aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da Tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Roberto Mauricio Carvalho Guedes	x	
Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes	x	
Roselene Ecco	x	
Carlos Eduardo Real Pereira	x	
Talita Pilar Resende	x	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	x	Reprovado(a)	

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da Tese, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de aceite de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado do Curso. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2023.

Assinatura dos membros da banca:

Documento assinado eletronicamente por **Roberto Mauricio Carvalho Guedes, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Roselene Ecco, Professora do Magistério Superior**, em 26/02/2023, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Talita Pilar Resende, Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 08:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Eduardo Real Pereira, Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior**, em 06/03/2023, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2088368** e o código CRC **9891A1D0**.

Criado por lmg2019, versão 4 por gaedes em 24/02/2023 13:57:08.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Professor Marcos de Almeida Souza da UFMT, que foi a partir das nossas conversas que me despertou o interesse pelo estudo da sanidade e patologia suína.

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

Aos professores Andrey Lage, Renato de Lima Santos e Fábio Vannucci por participarem do comitê de orientação e pela disposição em avaliar este trabalho e contribuir enormemente para a conclusão desta tese.

À doutora Caroline Junqueira da FIOCRUZ, pela ajuda na otimização da técnica ELISPOT fundamental na execução deste trabalho.

Aos doutores Carlos Eduardo Real Pereira e Amanda Gabrielle de Souza Daniel pelos ensinamentos e ajuda durante todo o período que estivemos juntos no laboratório.

A todos os amigos que eu fiz durante esses 6 anos em Belo Horizonte, pelo convívio diário, pelas aulas juntos, pelas conversas na cantina, pelas risadas, por pegarem no meu pé e por me mostrarem que toda conquista é uma vitória conjunta, nada se consegue se a caminhada é individual.

Agradeço as agências de fomento a pesquisa CNPq, Capes e Fapemig.

RESUMO

Lawsonia intracellularis é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta as células imaturas da cripta intestinal e causa uma doença conhecida como Enteropatia Proliferativa Suína (EPS). A resposta imune protetora contra *L. intracellularis* em suínos está comumente associada à produção de anticorpos IgG e IgA no soro e na mucosa intestinal. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho e a proteção de suínos vacinados com a Porcilis® Ileitis. Foram utilizados 72 suínos de 3 semanas de um rebanho sem histórico de PE. Os animais foram subdivididos em diferentes grupos: Vacinado/Desafiado (VAC/DES), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Controle (CONT). Os animais foram pesados durante o experimento e o consumo de ração anotado para avaliação de desempenho. Amostras de soro foram coletadas de todos os animais para detectar IgG sérica específica, bem como lavado ileal para dectar IgA específica contra *L. intracellularis*. Amostras de sangue total foram coletadas de animais dos 4 grupos e testadas pela técnica ELISPOT para detectar células produtoras de IFN-γ que respondem especificamente ao antígeno de *L. intracellularis*. Avaliação clínica e anátomo-patologicas também foram realizadas. Do dia 28 ao dia 49 pós-vacinação, observou-se redução significativa de GPD e consumo de ração no grupo DES comparado com os demais grupos. A detecção de anticorpos anti-*L intracellularis* produzidos por vacinação pode ser detectada no dia 14 pós-vacinação (pv) nos grupos VAC e VAC/DES. O pico de detecção de anticorpos IgG anti-*L intracellularis* no soro ocorreu no dia 28 pv. No dia 49 pv, IgG sérica específica para *L. intracellularis* foi detectada em todos os animais dos grupos VAC e VAC/DES e em 4 animais do grupo DES. Quanto a indução de resposta celular específica, foi detectado diferença significativa entre os grupos VAC/DES e CONT no dia 49 pv. Para os resultados da avaliação de lesões macroscópicas foi detectado diferença significativa entre o grupo DES e os demais grupos. Com base nos resultados das técnicas de IPMA e ELISPOT, a vacina Porcilis® Ileitis provou ser eficiente na indução de respostas humorais e celulares específicas.

Palavras-chave: vacinação; diarreia; resposta imune; ileíte; ELISPOT.

ABSTRACT

Lawsonia intracellularis is an obligatory intracellular bacterium that infects enterocytes causing the disease known as Proliferative Enteropathy (PE). Protective immune response against *L. intracellularis* in pigs are commonly associated with the production of IgG and IgA antibodies in the serum and intestinal mucosa, respectively. The objective of the present study was to evaluate the performance and protection of pigs vaccinated with Porcilis® Ileitis. Seventy-two 3-week-old pigs from a herd with no history of PE were used. Animals were divided in four different groups: Vaccinated/Challenged (VAC/CHAL), Vaccinated (VAC), Challenged (CHAL) and Control (CONT). All animals were weighed during the experiment and feed intake data was recorded for performance evaluation. Serum samples were collected from all animals and examined by IPMA to detect specific serum IgG and also ileal washes for the detection of IgA against *L. intracellularis*. Whole blood samples were collected from animals in the 4 groups and examined by the ELISPOT technique to detect IFN-γ producing cells that respond specifically to *L. intracellularis* antigens. Clinical and anatomopathological evaluations were also performed. From day 28 to day 49, for ADG and FC, a significant reduction was observed betweem the CHAL and the other groups. The detection of anti-*L intracellularis* antibodies produced after vaccination could be detected on day 14 post-vaccination (pv). The peak of detection of IgG anti-*L intracellularis* antibodies in serum occurred on day 28pv. On day 49pv, IgG specific for *L. intracellularis* was detected in all animals in the VAC and VAC/CHAL groups and in four animals in DES group. For the induction of specific cellular immune response, significant difference was detected between the VAC/DES and CONT groups on day 49 pv. For the results of the anatomic-pathological evaluation, a significant difference was detected between the DES group and the others, only for the macroscopic evaluation. Based on the results of Imunoperoxidase Monolayer Cell Assay and ELISPOT, the Porcilis® Ileitis vaccine proved to be efficient in inducing specific humoral and cellular responses.

Keywords: vaccination; diarrhea; immune response; ileitis; ELISPOT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia eletrônica de *Lawsonia intracellularis* em sobrenadante de cultivo celular 19

Figura 2 - Leitões de creche experimentalmente inoculados com *L. intracellularis*. A) Quadro clínico de diarreia causada por *Lawsonia intracellularis*; B) Quadro crônico de EPS, mostrando variação de peso entre os animais e baixo desempenho 22

Figura 3 - Suíno com Enteropatia proliferativa suína. Forma crônica (arquivo pessoal). A) Porção de intestino delgado apresentando edema de mesentério próximo à inserção com as alças intestinais lesadas e serosa intestinal com aspecto cerebroide devido a proliferação da mucosa. B) Corte longitudinal de porção de intestino delgado apresentando hiperemia e edema e hiperemia no mesentério próximo à inserção com as alças intestinais, com parede intestinal e mucosas espessadas e necrose multifocal, hiperemia e hemorragia discretas 22

Figura 4 - Intestinos de marrã com PHE. Corrugação e hiperemia de serosa de intestino delgado, espessamento de parede intestinal de jejuno, coágulos e fibrina no lúmen e evidenciação de pregas da mucosa. Conteúdo vermelho escuro no intestino grosso 23

Figura 5 - Secção de intestino delgado apresentando discreto infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário multifocal na lâmina própria (cabeça da seta), evidente hiperplasia do epitélio das criptas intestinais associado a redução marcante de células caliciformes (setas) e abcessos de cripta multifocais (círculo) 24

Figura 6 - Linha do tempo com resumo experimental indicando as três datas de coleta, de vacinação, inoculação e necropsia 50

Figura 7 - Fotomicrografias em menor aumento de secções de íleo coradas com hematoxilina e eosina e submetidas a avaliação por imuno-histoquímica para *L. intracellularis* (aumento 4x). (A) Corte transversal de íleo de animal com grau 0 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (B) Corte transversal de íleo com grau 0 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis.* (C) Corte transversal de íleo de animal com grau 1 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (D) Corte transversal de íleo com grau 1 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis*. (E) Corte transversal de íleo de animal com grau 2 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (F) Corte transversal de íleo com grau 2 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis*. (G) Corte transversal de íleo de animal com grau 3 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (H) Corte transversal de íleo com grau 3 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis*. (I) Corte transversal de íleo de animal com grau 4 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (J) Corte transversal de íleo com grau 3 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis* 53

Figura 8 - Fotomicrografia de placa de IPMA para *L. intracellularis* (Aumento de 40x). (A) Soro de suíno com marcação positiva para presença de anticorpos anti-*L. intracellularis.* (B) Soro de suíno com marcação negativa para presença de anticorpos anti-*L. intracellularis* 55

Figura 9 - Mediana do escore de diarreia no período entre os dias 0-28 e 29-49 contados a partir do início do experimento. (0-28) Escore de diarreia total dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) no período entre os dias 0 e 28 após vacinação. (29-49) Escore de diarreia total dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) no período entre os dias 29 e 49 após vacinação 57

Figura 10 - Escore de lesões macroscópicas de *L. intracellularis* dos grupos Controle, Vacinado, Desafiado e Vacinado/Desafiado (Vac/Des) nos dias 28 e 49 pós vacinado. Composite score de lesões macroscópicas 59

Figura 11 - Escore de lesões histológicas de *L. intracellularis* dos grupos Controle, Vacinado, Desafiado e Vacinado/Desafiado (Vac/Des) nos dias 28 e 49 pós vacinado. Total dos escores de hiperplasia de cripta de intestino delgado e grosso na avaliação histopatológica 59

Figura 12 - Escore de marcação para *L. intracellularis* na técnica de IHQ dos grupos Controle, Vacinado, Desafiado e Vacinado/Desafiado (Vac/Des) nos dias 28 e 49 pós vacinado. Total dos escores de marcação positiva na IHQ 60

Figura 13 - Quantificação por qPCR de *L. intracellularis* nas fezes dos animais dos grupos Controle, Vacinado, Desafiado e Vacinado/Desafiado (VAC/DES). Os dados são referentes aos dias 0, 28 e 49 após a vacinação e a quantidade é dada em Log_{10} microrganismos de *Lawsonia intracellularis* pela técnica de qPCR 60

Figura 14 - Títulos individuais de anticorpos anti-*L. intracellularis* dos animais dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) pela técnica de IPMA. (0) Título encontrado de IgG em soro no dia 0 pós vacinação. (14) Título encontrado de IgG em soro no dia 14 pós vacinação. (28) Título encontrado de IgG em soro no dia 28 pós vacinação. (49) Título encontrados de IgG em soro no dia 49 pós vacinação 61

Figura 15 - Mediana dos títulos de anticorpos anti-*L. intracellularis* dos animais dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES). (0) Título encontrado de IgG em soro no dia 0 pós vacinação. (14) Título encontrado de IgG em soro no dia 14 pós vacinação. (28) Título encontrado de IgG em soro no dia 28 pós vacinação. (49) Título encontrados de IgG em soro no dia 49 pós vacinação 62

Figura 16 - Título de anticorpos (IgA) em lavado ileal dos 8 animais positivos do grupo Vacinado e Desafiado (VAC/DES) no dia 49 63

Figura 17 - Detecção de resposta imune celular específica para *L. intracellularis* dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) pela técnica de ELISPOT. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais. (0) Mediana da contagem de spots no dia 0 pós vacinação. (14) Mediana da contagem de spots no dia 14 pós vacinação. (28) Mediana da contagem de spots no dia 28 pós vacinação. (49) Mediana da contagem de spots no dia 49 pós vacinação 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das doenças que acometem suínos passíveis de imunização ativa artificial, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal em 2018 35

Tabela 2 - Descrição dos tipos de vacinas, apresentação antigênica, tipos de adjuvantes, vias de administração e protocolo de imunizações dos principais produtos disponíveis para comercialização no mercado brasileiro contra doenças entéricas (*E. coli*, *C. perfringens* tipo B e C e Rotavírus) em suínos disponíveis no mercado brasileiro 38

Tabela 3 - Descrição dos tipos de vacinas, baseado na sequência listada na tabela 3, com relação ao intervalo de administração, duração da imunidade e reforço vacinal 43

Tabela 4 - Resumo do desenho experimental considerando os grupos vacinado e desafiado (VAC/DES), vacinado (VAC), desafiado (DES) e controle (CONT) 49

Tabela 5 - Consumo de ração, em gramas por dia, dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) 58

Tabela 6 - Ganho de peso diário, em gramas, e conversão alimentar dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES), nos períodos dos dias 0-28 e 28-49 após a vacinação com Porcilis® Ileitis 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

˚C	Graus Celsius
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
AEC	3-amino-9-ethyl-carbazole
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/Nitro blue tetrazoluim
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Conversão alimentar
CD4+	Cluster of differentiation 4+
CD8+	Cluster of differentiation 8+
Células NK	Células Natural Killer
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CONT	Grupo controle
DES	Grupo desafiado
DIVA	Differenciating infected and vaccinated animals
DNA	Ácido desoxirribonuceico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot
EPS	Enteropatia proliferativa suína
EUA	Estados Unidos da América
GPD	Ganho de pedo diário
H&E	Coloração de hematoxilina-eosina
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IPEC-J2	Cultivo de células de enterócitos suínos
IPMA	Imunoperoxidase em monocamada de células

L. intracellularis	*Lawsonia intracellularis*
Lat-2	Proteína antigênica de *L. intracellularis*
LfliC	Flagelina de *L. intracellularis*
Lhly	Hemolisina de *L. intracellularis*
Log10	Logaritmo na base 10
MPL	Monophosphoryl lipid A
MUC2	Mucina 2
ng	Nanograma
O2	Gás oxigênio
PAS	Coloração pelo Ácido periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com Tween
PHA	Fitohemaglutinina
PHE	Enteropatia proliferativa hemorrágica
PVDF	Polyvinilide fluoride
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
rFliC	Proteína de flagelina recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de Roswell Park Memorial Institute
TgD	Glicoproteína D
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
Th0	Célula T auxiliar não diferenciada
Th1	Célula T auxiliar 1
Th2	Célula T auxiliar 2
TLR5	Toll-like receptor 5
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VAC	Grupo vacinado
VAC/DES	Grupo vacinado e posteriormente desafiado
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

2. OBJETIVO 17

3. REVISÃO DE LITERATURA 18

3.1 Enteropatia proliferativa suína **18**

3.1.1 Etiologia **18**

3.1.2 Isolamento e cultivo **18**

3.1.3 Epidemiologia **19**

3.1.4 Sinais clínicos **20**

3.1.5 Patologia **21**

3.1.6 Diagnóstico **24**

3.1.7 Prevenção e controle **25**

3.1.7.1 Uso de antimicrobianos no controle da EPS **25**

3.2 Vacinas **26**

3.2.1 Histórico **26**

3.2.2 Tipos de vacina **28**

3.2.2.1 Vacina viva atenuada **28**

3.2.2.2 Vacinas não-vivas **29**

3.2.3 Adjuvantes **30**

3.2.4 Rotas de vacinação **31**

3.2.5 Infecção experimental **31**

3.2.6 Proteção vacinal **32**

3.3 Vacinação contra enteropatógenos **35**

3.3.1 Resposta imune e vacinação contra EPS **37**

4. MATERIAL E MÉTODOS 48

4.1 Infecção experimental de suínos com *L. intracellularis.* **49**

4.2 Coleta de amostras **50**

4.3 Sinais clínicos e lesões **51**

4.4 Desempenho dos animais **53**

4.5 PCR quantitativo **54**

4.6 Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMA) **54**

4.7 Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) **55**

4.8 Análise estatística **56**

5. RESULTADOS 57
5.1 Desempenho dos animais **57**
5.2 Achados anátomo-patológicos **58**
5.3 Eliminação de *L. intracellularis* nas fezes **60**
5.4 Produção de anticorpos específicos contra *L. intracellularis* **61**
5.1 Indução de resposta imune celular específica **62**
6. DISCUSSÃO 63
7. CONCLUSÃO 67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

1. INTRODUÇÃO

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

A Enteropatia Proliferativa Suína (EPS), também chamada de ileíte (GUEDES et al., 2009), é uma doença entérica de distribuição mundial (FRANÇA, S. A.; GUEDES, 2008), com vários estudos tendo mostrado prevalência alta ao longo dos anos, entre 80 e 100% (AARESTRUP; OLIVER DURAN; BURCH, 2008; COLLINS, 2013; LARSEN et al., 2016; RESENDE et al., 2015). A doença é causada pela bactéria intracelular obrigatória *L. intracellularis* (MCORIST, 2000), víbrio Gram negativo, microaerófilo, com flagelo unipolar único, não formador de esporos (KROLL et al., 2005). A lesão característica à macroscopia é o espessamento da mucosa intestinal causado pela proliferação de células imaturas da cripta (VANNUCCI; GEBHART, 2014). À histologia, devido a proliferação dessas células intestinais, ocorre diminuição marcante de células caliciformes e presença da bactéria no citoplasma de células hiperplásicas (COLLINS, 2013).

A doença acomete principalmente leitões em crescimento e terminação (GUEDES et al., 2009), de 6 a 16 semanas de idade (MCORIST, 2000). Já foi descrita em outras espécies animais como os equinos, hamsters, coelhos, furões, raposas, cães, ratos, ovinos, cervos, emu, avestruz, primatas não humanos e cobaios (VANNUCCI; GEBHART, 2014). A persistência da infecção pode ocorrer por até 10 semanas com excreção de numerosos microrganismos nas fezes (MCORIST, 2000). Vários fatores estressantes como movimentação de animais, mudança de ração, variação extrema de temperatura e falta de higiene são predisponentes para a ocorrência da EPS (BANE et al., 2001). Os sinais clínicos observados na EPS são diarreia, variação de peso entre os animais (MCORIST, 2000), emaciação acompanhada de redução na conversão alimentar e no ganho de peso diário (LARSEN et al., 2016). Animais de terminação e reprodução podem ser afetados por enteropatia hemorrágica de curso agudo, onde pode

ocorrer perda de sangue nas fezes, em consequência de hemorragia intestinal (COLLINS, 2013).

A inclusão de medicamentos na ração ou na água, assim como o uso de vacinas têm sido utilizados para prevenção de surtos em fases de recria e terminação (NOGUEIRA et al., 2015). Além desses dois métodos, melhorias em limpeza e higienização também foram descritas como ferramentas importantes para redução da pressão de infecção, porém a vacinação é a medida profilática mais efetiva (PARK et al., 2013). Outra forma de efetiva de se prevenir a doença é através da vacinação, que se mostrou capaz de reduzir a infecção e a doença. Entretanto, as respostas imunológicas do hospedeiro frente a infecção pela bactéria ainda não foram completamente entendidas (CORDES et al., 2012; KROLL; ROOF; MCORIST, 2004).

Suínos imunizados com a vacina comercial oral contendo organismos vivos de *L. intracellularis* são geralmente protegidos contra EPS. Entretanto, toda medicação precisa ser removida por 3 dias antes e após a vacinação (HOLYOAKE et al., 2009). Uma nova vacina composta por antígeno inteiro inativado de *L. intracellularis* administrado pela via intramuscular, Porcilis® Ileitis (MSD, Rahway, NJ, EUA), tem demonstrado melhora no GPD em animais com enteropatia proliferativa, redução de colonização pela *L. intracellularis*, redução da duração e a quantidade de bactérias excretadas nas fezes e indução da produção de anticorpos séricos específicos contra *L. intracellularis*. Dessa forma, tem sido uma alternativa para controlar a EPS e reduzir o impacto dessa doença na performance dos suínos. Entretanto, não existem ainda informações sobre a indução de resposta celular específica contra a infecção, associada à proteção contra a doença, utilizando essa vacina.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar a indução da resposta imune humoral sistêmica e de mucosa, redução de intensidade de lesões e do nível de infecção, bem como a melhoria no desempenho de animais imunizados com a vacina Porcilis® Ileitis e desafiados com a *L. intracellularis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Enteropatia proliferativa suína

3.1.1 Etiologia

A primeira caracterização de lesões de casos de enteropatia proliferativa foi realizada por Biester e Schwarte (1930) nos EUA e denominadas como adenomatose intestinal. Na sequência essa alteração foi encontrada na maior parte de países produtores de suínos e, no ano de 1972, Rowland e Rowntree (1972) fizeram a primeira descrição do quadro de enteropatia hemorrágica associada com a adenomatose intestinal. Até aquele ano não havia sido encontrado nenhum agente etiológico e associação com as alterações. A visualização do agente etiológico só ocorreu no ano de 1974 através da técnica de imunofluorescência e por microscopia eletrônica (ROWLAND; LAWSON, 1975). Em 1991, Stills e colaboradores (1991) conseguiram isolar o agente causador da adenomatose intestinal a partir de hamsters inoculados experimentalmente, mas foi só em 1993 que Lawson e colaboradores (1993) obtiveram sucesso no isolamento do agente etiológico a partir do suíno. No mesmo ano, McOrist et al. (1993) conseguiram preencher os requisitos para o postulado de Koch e reproduziram a doença com sucesso e reisolaram a bactéria a partir das amostras coletadas desses animais.

A classificação do agente etiológico só aconteceu em 1993 por Gebhart e colaboradores (1993). Até aquele momento a bactéria era classificada como uma Proteobacteria da subdivisão delta. Classificação mais detalhada só pode ser realizada após o sequenciamento do DNA do agente. Foi possível verificar que a bactéria pertencia a uma nova espécie da família das desulfovibrionacieas, sendo denominada *Lawsonia intracellularis* (MCORIST et al., 1995). Algumas características morfológicas desse agente foram descritas por Kroll e colaboradores (2005). Foi descrito que *L. intracelulares* possui formato de bastonete curvo (vibrio), gram-negativo, microaerófilo, possui um flagelo unipolar único (Figura 1) e não formadores de esporo. Outras características morfológicas descritas foram de possuir um envelope externo trilaminar e medir 1,25 a 1,75 μm de comprimento por 0,25 a 0,43 μm de largura (VANNUCCI; GEBHART, 2014).

3.1.2 Isolamento e cultivo

O primeiro relato de isolamento da bactéria causadora da EPS só foi ocorrer décadas após a primeira descrição da doença e foi feito por Stills e colaboradores (1991) . Nesse trabalho

o organismo foi isolado a partir de intestinos de hamsters inoculados experimentalmente com conteúdo fecal de hamsters doentes. Dois anos depois, Lawson e colaboradores (1993) foram bem-sucedidos no isolamento e cultivo ‘in vitro’ da bactéria. Utilizando a linhagem de enterócitos de rato (IEC-18), ambiente de microaerofilia constituído de 88,2% de nitrogênio, 8,8% de CO_2 e 8,0% de O_2 foi possível isolar e propagar a bactéria a partir de intestinos de suínos doentes. Em 2012, Vannucci et al. (2012) fizeram a descrição de uma metodologia alternativa de cultivo ‘in vitro’ usando a linhagem de células McCoy em bolsas plásticas, descartando necessidade de utilização de jarras de anaerobiose ou de estufas trigás.

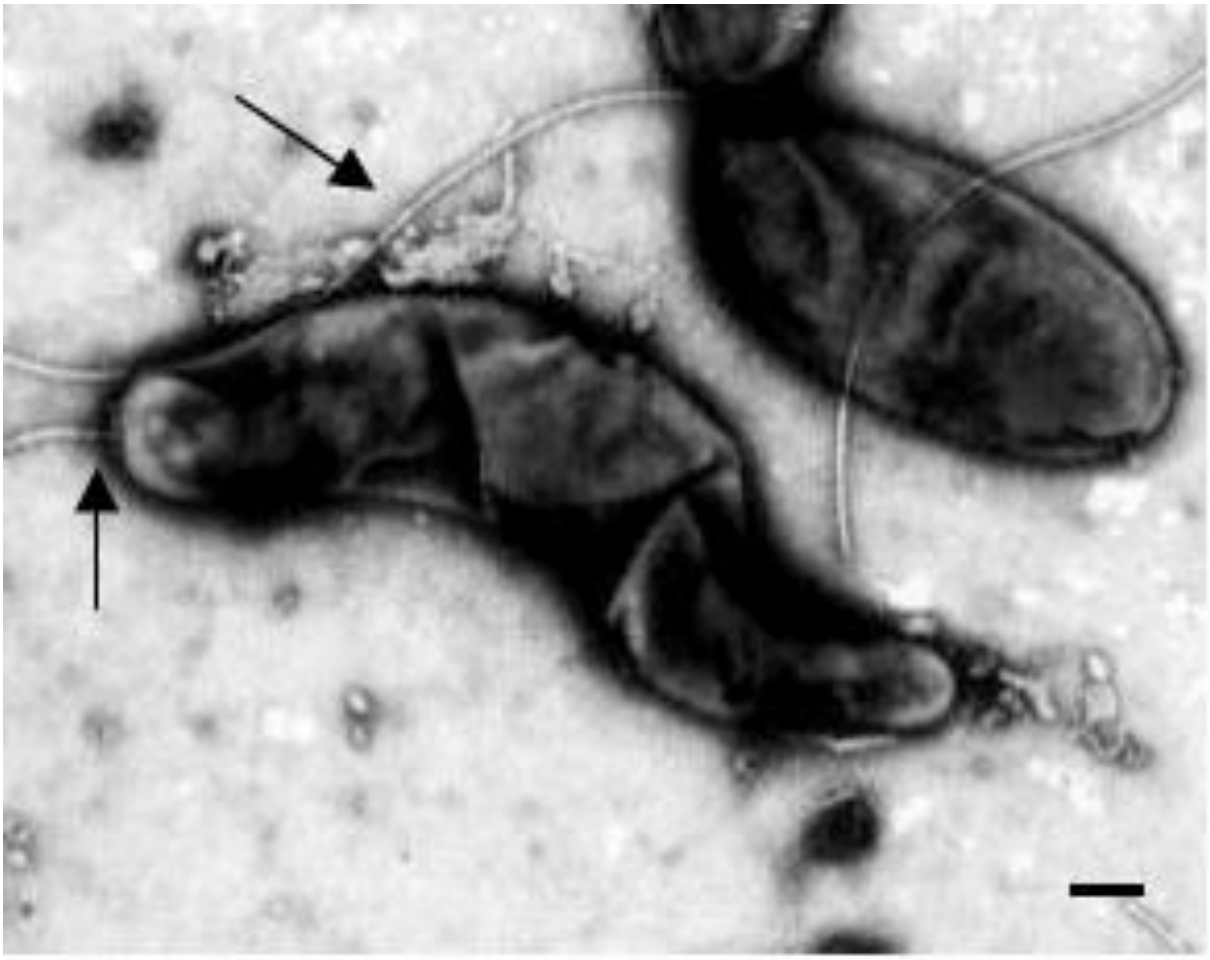


Figura 1: Micrografia eletrônica de *Lawsonia intracellularis* em sobrenadante de cultivo celular. As setas indicam o flagelo unipolar único (Fonte: Profa. Connie Gebhart, UMN, 2001).

3.1.3 Epidemiologia

A enteropatia proliferativa suína (EPS), ou ileíte (GUEDES et al., 2009), se trata de uma doença entérica com distribuição mundial, presente em todos os países produtores de suínos (MCORIST; GEBHART, 2011). Vários estudos ao longo dos anos já demostraram a alta prevalência, variando entre 80 e 100% (AARESTRUP; OLIVER DURAN; BURCH, 2008;

COLLINS, 2013; LARSEN et al., 2016; RESENDE et al., 2015). A principal fase de acometimento da doença ocorre na recria e terminação, entre 6 e 20 semanas de idade, e animais adultos jovens e cevados próximo a idade de abate, dependendo da forma de apresentação da doença (MCORIST, 2000). Fatores predisponentes para a ocorrência da EPS foram descritos por (BANE et al., 2001) e dentre eles podem ser citados a movimentação de animais, mudança de ração, variação grande de temperatura e falta de higiene. Além do suíno, a doença já foi descrita em equinos, hamsters, coelhos, furões, raposas, cães, ratos, ovinos, cervos, emus, avestruzes, primatas não humanos e cobaios (VANNUCCI; GEBHART, 2014). A infecção pode permanecer por até 10 semanas com a eliminação de grande quantidade de microrganismos nas fezes (MCORIST et al., 2000). Nunca houve relato da doença em seres humanos, mesmo tendo o agente sido alvo de pesquisas em pacientes com doença de Crohn (MICHALSKI et al., 2006) e em crianças que habitam localidades próximas às criações de suínos na Europa (JACOBSON et al., 2007).

A transmissão da doença ocorre através da rota fecal-oral (COLLINS, 2013). E o início da eliminação do agente nas fezes se inicia após a primeira semana da infecção e pode durar por até 12 semanas. Ocorre de forma intermitente coincidindo com o aparecimento dos sinais clínicos (GUEDES; GEBHART, 2003a). Após a recuperação total, os animais deixam de eliminar o agente nas fezes sendo incapazes de veicular a doença para animais não infectados (COLLINS, 2013).

Sabe-se que uma gama de espécies animais, sejam domésticas ou silvestres, podem se infectar com a bactéria e desenvolver a doença, sendo assim, é possível que surtos de EPS ocorram em rebanhos suínos sem a infecção prévia. Portanto, pássaros, insetos, roedores e suídeos silvestres são considerados prováveis vetores para suínos domésticos em função da proximidade desses animais com as granjas (COLLINS, 2013). Em um estudo com o intuito de avaliar o papel de roedores na epidemiologia da EPS, Gabardo et al. (2017) demonstraram que o camundongo é capaz de transmitir a bactéria para o suíno e vice-versa. Dessa forma, pode-se concluir que os roedores possuem um papel importante como reservatórios de *L. intracellularis* nas unidades de produção, bastando poucas gramas de fezes contaminadas do roedor para fazer com que a transmissão aconteça.

3.1.4 Sinais clínicos

Foram descritas três manifestações clínicas distintas nos casos de infecção por *L.*

intracellularis, sendo denominadas como enteropatia proliferativa hemorrágica ou aguda, adenomatose intestinal suína ou crônica e a forma subclínica da doença. A primeira delas, em geral, acomete animais adultos jovens entre 4 e 12 meses de vida e a segunda ocorre entre a sexta e a vigésima semana de idade (VANNUCCI; GEBHART, 2014).

A forma hemorrágica da EPS em geral pode ser observada em matrizes e machos de origem de granjas de alto padrão sanitário sendo introduzidos em novos sítios de produção. Nesses casos, os animais acabam sendo encontrados mortos sem sinal clínico detectado anteriormente, ou então esses animais vão desenvolver um quadro diarreico intenso com presença de sangue nas fezes e óbito subsequente entre 2 a 5 dias (COLLINS, 2013). Na forma crônica, os sinais clínicos são diarreia pastosa amarelada (Figura 2a) a acinzentada com caráter transitório, variação de peso entre os animais do lote acometido (MCORIST, 2000), emaciação acompanhada de perda de desempenho zootécnico, ou seja, piora na conversão alimentar e no ganho de peso diário (Figura 2b) (LARSEN et al., 2016).

A forma subclínica ou endêmica da doença configura com a manifestação de desuniformidade dos lotes acometidos, diminuição de desempenho dos animais como baixo ganho de peso diário e redução na conversão alimentar e ausência de diarreia evidente. Essa forma da EPS é a responsável por aumentar de forma significativa o custo de produção, na época estimados entre €9 a €86 porca/ano (POMMIER et al., 2008). Em estudos para avaliar o impacto dessa forma da doença foi observado redução de GPD entre 37 e 42% e no consumo de ração a redução foi de 27-37% (POMMIER et al., 2008). Para (COLLINS, 2013), a redução no GPD obteve variação de 17-84% e na conversão alimentar em mais de 50%.

3.1.5 Patologia

As lesões macroscópicas observadas em animais acometidos pela forma crônica da doença é a presença de edema e hiperemia de mesentério na região da inserção com as alças intestinais lesionadas. Ao observar a serosa intestinal adjacente, pode ser visualizado aspecto cerebroide (similar às circunvoluções cerebrais) e na abertura das alças intestinais pode ser observado espessamento da mucosa com evidenciação das pregas. A porção intestinal acometida com maior frequência é a região do íleo no intestino delgado, porém podem ser observadas lesões em outras porções como jejuno, ceco ou cólon. Em quadros mais intensos ocorre a formação de membrana fibrinonecrótica (Figura 3) e em quadros mais brandos as

lesões podem ser discretas ou nem serem visualizadas (GUEDES; BROWN; SEQUEIRA, 2016).

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

Figura 3: Suíno com enteropatia proliferativa. Forma crônica. A) Segmento do intestino delgado com edema de mesentério próximo à inserção com as alças intestinais acometidas e serosa intestinal com aspecto cerebroide devido a proliferação da mucosa. B) Abertura longitudinal de porção de intestino delgado. Há hiperemia e edema no mesentério próximo à inserção com as alças intestinais. A parede intestinal está espessada e a mucosa coberta por material necrótico e fibrinoso amarelado (Fonte: arquivo pessoal).

Nos casos de enteropatia aguda e hemorrágica, há espessamento da mucosa associado a quantidade acentuada de sangue coagulado no lúmen intestinal (Figura 4). Outras lesões que podem ser encontradas são o edema de mesentério na porção afetada e efusão serosa intraperitoneal moderada. O conteúdo presente no lúmen intestinal possui aspecto fluido e sanguinolento, algumas vezes com coágulos. A mucosa se apresenta difusamente hiperêmica e, conforme o quadro progride, pode ocorrer a forma caracterizada por enteropatia hemorrágica e fibrinosa recobrindo toda a mucosa (LOVE; LOVE, 1979).

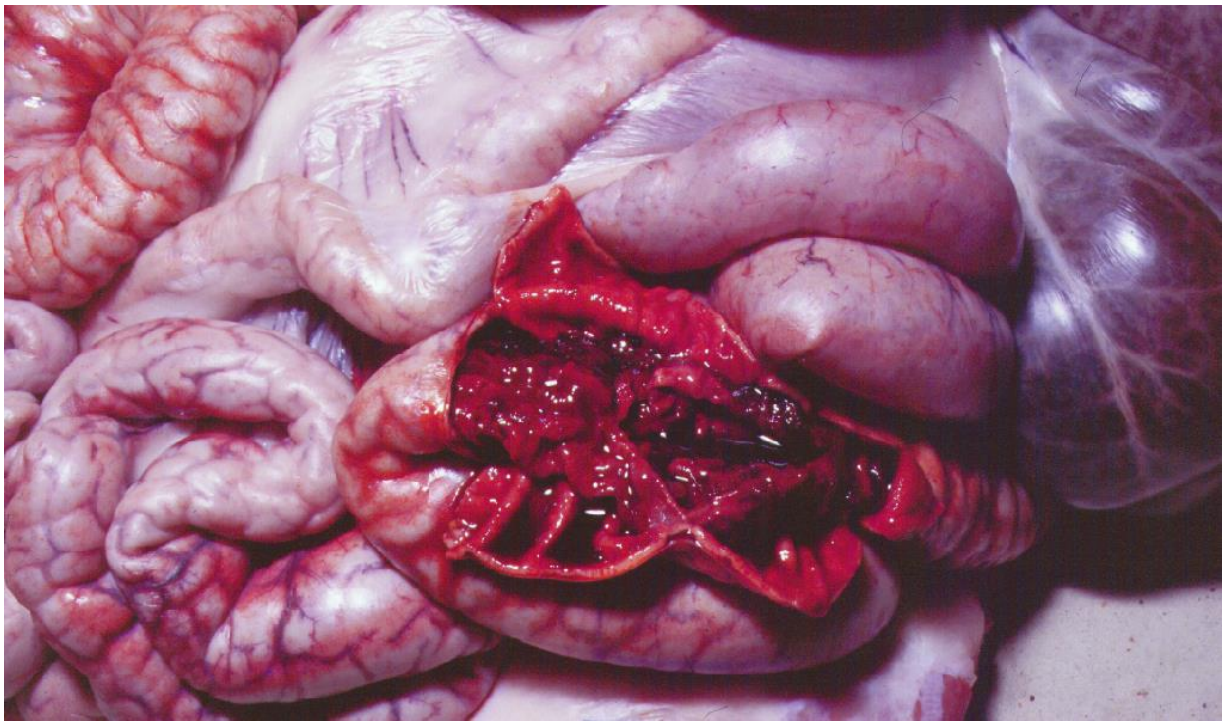


Figura 4: Intestinos de marrã com PHE. Corrugação e hiperemia de serosa de intestino delgado, espessamento de parede intestinal de jejuno, coágulos e fibrina no lúmen e evidenciação de pregas da mucosa. Conteúdo vermelho-escuro no lúmen do intestino grosso, visualizado através da serosa (Fonte: Prof. Roberto Guedes, UFMG).

Na avaliação histopatológica, devido a proliferação das células imaturas da cripta intestinal, pode haver intensa diminuição na quantidade de células caliciformes associadas a presença da bactéria na porção apical das células hiperplásicas (COLLINS, 2013). Pode haver também, o aumento de material proteináceo no interstício e no interior de vasos linfáticos da lâmina própria e do ápice das vilosidades. Em quadros hemorrágicos, além da descrição anterior, ainda pode ser observada a presença de hemorragia e infiltrado inflamatório na lâmina própria. Em quadros muito intensos pode haver presença sangue no lúmen da alça da porção acometida e abcessos de cripta (Figura 5). A visualização da bactéria no citoplasma das células imaturas da cripta intestinal hiperplásicas, ou em macrófagos presentes no interstício da lâmina própria ou submucosa só é possível através da realização de técnicas histoquímicas como a

coloração pela prata, marcação na imuno-histoquímica e por hibridização ‘in situ’ fluorescente (COLLINS, 2013; LOVE; LOVE; EDWARDS, 1977).

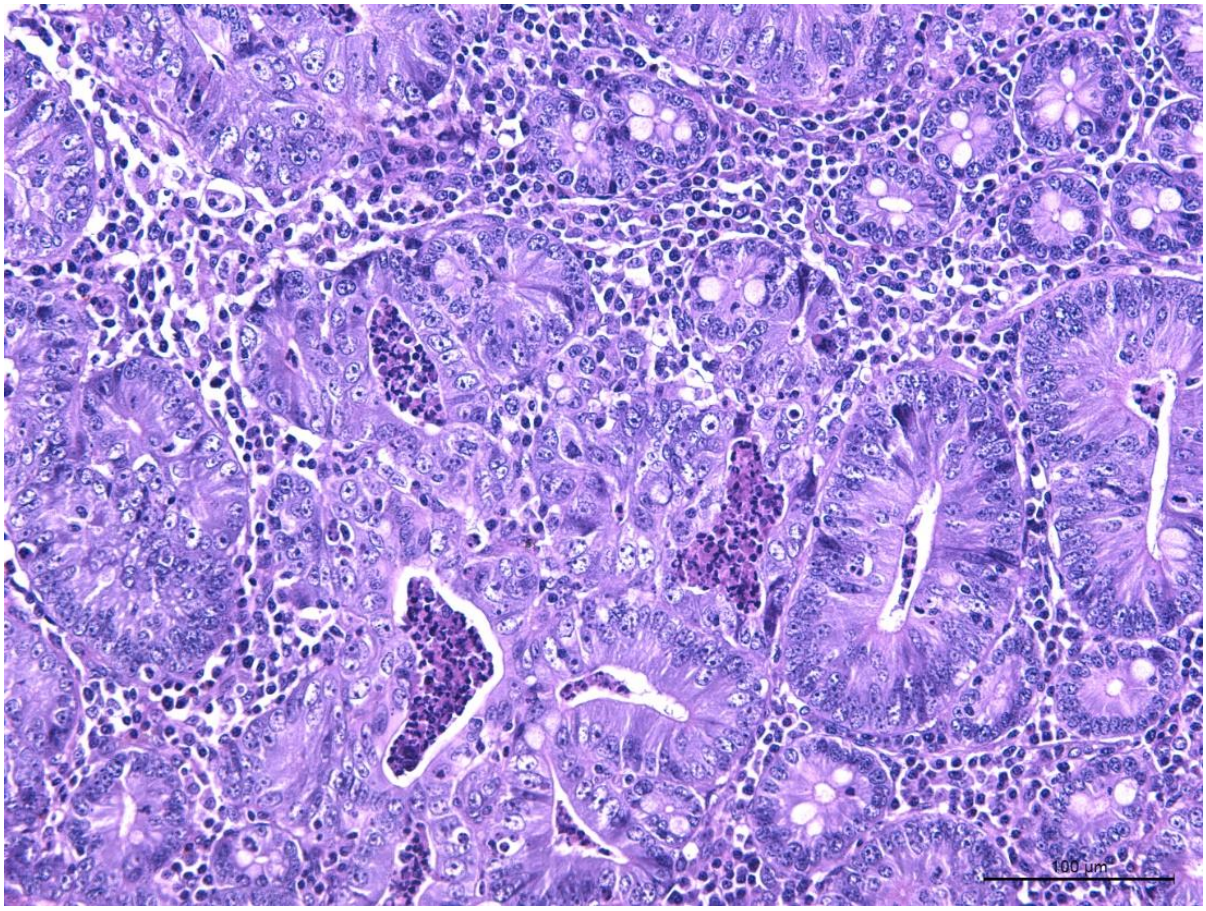


Figura 5: Suíno, intestino delgado. Na mucosa há infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário multifocal discreto na lâmina própria, hiperplasia evidente do epitélio das criptas intestinais associado a redução acentuada de células caliciformes e abcessos de cripta multifocais. H&E 40x (Fonte: Dra. Luísa Vianna).

3.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da EPS, em geral é baseado nas características clínicas e anatomopatológicas da infecção. Dessa forma, diagnósticos diferenciais podem incluir a disenteria suína (*Brachyspira hyodysenteriae*), além de salmonelose e úlceras gástricas (VANNUCCI; GEBHART, 2014). No caso de diagnóstico *ante-mortem*, pode ser utilizado a identificação molecular do DNA de *L. intracelulares* em fezes de animais acometidos por PCR, ou detecção de IgG específica para *L. intracellularis* por sorologia. A diferença entre essas técnicas de diagnóstico *ante-mortem* é que no caso da PCR, é um teste com detecção direta do agente nas fezes, ou seja, avaliar se existe infecção ativa, enquanto a sorologia é um teste indireto e indica exposição prévia ao agente (VANNUCCI; GEBHART, 2014). Tanto a PCR quanto a sorologia são ferramentas que auxiliam na identificação de fatores de risco e para mensuração das metodologias de controle como a vacinação, medicação e higiene (COLLINS,

2013).

O diagnóstico *post-mortem* é baseado na observação de lesões macroscópicas características das manifestações da EPS em associação com as lesões histológicas. Além disso, podem ser utilizadas técnicas para a visualização do agente na lesão, como por exemplo, a coloração de Warthin-Starry e a utilização de anticorpos específicos para *L. intracellularis* para a realização da técnica de imuno-histoquímica, sendo esta última considerada padrão ouro para o diagnóstico da EPS (VANNUCCI; GEBHART, 2014), além da hibridização 'in situ' fluorescente (JENSEN et al., 2010).

3.1.7 Prevenção e controle

3.1.7.1 Uso de antimicrobianos no controle da EPS

Do montante total de antimicrobianos utilizados para a produção animal no mundo, 34% são destinados para a indústria suinícola, com um valor estimado na época em torno de 1,7 bilhões de dólares. Sendo que a maior parte desses tratamentos são direcionados para o controle das infecções entéricas (AARESTRUP; OLIVER DURAN; BURCH, 2008), e de acordo com Larsen e colaboradores (2016) a via oral é a mais amplamente utilizada no seu controle.

Em geral, as penicilinas são os antimicrobianos mais utilizados nas terapias em massa de populações na suinocultura (VAN HOUT; HEUVELINK; GONGGRIJP, 2016), porém para o controle da EPS, os antimicrobianos descritos na literatura como mais eficazes são as tetraciclinas, tiamulina, valnemulina, tilvalosina e a tilosina (AARESTRUP; OLIVER DURAN; BURCH, 2008). Em uma avaliação de eficácia de lincomicina e espectinomicina via água feita por (MCORIST et al., 2000), ocorreu melhora na consistência das fezes e em ganho de peso. Além disso, a eliminação de *L. intracellularis* nas fezes diminuiu em todos os grupos de animais medicados testados. Portanto, ficou demonstrado a eficácia da lincomicina e espectinomicina para o tratamento da EPS.

De acordo com Larsen e colaboradores (2016), o princípio ativo mais utilizado na Dinamarca para o controle das desordens intestinais são os antimicrobianos do grupo das tetraciclinas, sendo assim foi realizado um estudo para avaliar a eficácia da oxitetraciclina na água para o tratamento da EPS. E o resultado demonstrou que em todas as concentrações testadas resultaram em melhor desempenho, na diminuição do quadro clínico de diarreia e na

eliminação do agente nas fezes. Em especial para as maiores dosagens, houve também a redução da lesão característica da EPS.

A avaliação da eficiência de um determinado tratamento com antimicrobiano em casos de EPS, o princípio ativo tem que ser capaz de reduzir a eliminação de *L. intracellularis* nas fezes (FRANÇA, S. A.; GUEDES, 2008) e essa eficácia foi observada em vários experimentos 'in vivo' realizados ao longo dos anos utilizando diversos antimicrobianos (ALEXOPOULOS et al., 2006; GUEDES et al., 2009; LARSEN et al., 2016; MCORIST et al., 2000; POMMIER et al., 2008; WALTER et al., 2001; WINKELMAN et al., 2002).

3.2 Vacinas

O mecanismo de proteção que as vacinas são capazes de induzir atuam de forma muito semelhante ao que os patógenos fazem naturalmente, que é por da indução de uma resposta inata que por sua vez consegue ativar a resposta adaptativa, porém diferente dos patógenos uma vacina não induz doença ao hospedeiro. A primeira linha de defesa contra qualquer microrganismo patogênico é a imunidade inata. Ela começa a agir logo assim que a infecção se estabelece, em contrapartida não haverá especificidade de resposta e a consequência disso é a geração de resposta sem memória imunológica. A resposta capaz disso é chamada de imunidade adaptativa. Ela atua como uma segunda linha de defesa, portanto ocorre apenas em uma fase posterior à infecção. Sendo caracterizada por diversos conjuntos de mecanismos que possuem a finalidade de reconhecer e eliminar o patógeno de forma específica. Sendo assim, vacina é toda substância que contenha antígenos e que induzam a imunidade adaptativa, independentemente do tipo de resposta, e que, após a eliminação do patógeno, possa ser estabelecida memória imunológica e proteção a longo prazo (VETTER et al., 2018).

3.2.1 Histórico

O primeiro relato de desenvolvimento de vacina foi realizado por Edward Jenner em 1796. Essa descoberta aconteceu, pois observou que mulheres que ordenhavam vacas infectadas pelo vírus da varíola bovina se tornavam protegidas contra a varíola humana. Dessa forma, conseguiu demonstrar que a proteção contra a varíola humana poderia ocorrer ao fazer a inoculação do conteúdo das vesículas de bovinos infectados. Até a atualidade, as abordagens para o desenvolvimento de vacinas vêm sofrendo grandes influências suscitadas pela ampliação dos conhecimentos em imunologia (PLOTKIN, 2014; WORBOYS, 2007).

Apesar de Edward Jenner ser anterior à época em que a microbiologia e a virologia alcançaram grandes avanços, foi esse pesquisador quem iniciou esse campo de estudo das doenças transmissíveis. E a partido do século XIX foi o momento em que a vacinologia obteve grandes avanços em função da maior compreensão acerca da etiologia das doenças e de suas interações com o hospedeiro. Uma descoberta dessa época e que ainda é atualmente empregada em algumas vacinas é a demonstração de que a administração de um patógeno inativado ou atenuado também é capaz de conferir proteção contra a própria doença que ele causa (PLOTKIN, 2014).

As primeiras vacinas que foram desenvolvidas no final do século XIX em geral eram produzidas com antígeno inativado e dirigidas contra os bacilos da febre tifoide e da cólera. Na primeira metade do século XX, foram desenvolvidas vacinas inativadas contra coqueluche, influenza, tifo, poliomielite, raiva, encefalite japonesa, encefalite transmitida por carrapatos e hepatite A (DEMICHELI; DEBALINI; RIVETTI, 2009; GIRARD et al., 2006; “Introduction of inactivated poliovirus vaccine into oral poliovirus vaccine-using countries.”, 2003; “Rabies vaccines. WHO position paper.”, 2007; PLOTKIN, 2014; TAUBER; DEWASTHALY, 2008).

Outro marco importante na história da vacinologia foi com o desenvolvimento de metodologias para a atenuação de patógenos. E só foi possível atenuar agentes patogênicos graças ao desenvolvimento de técnicas aprimoradas de cultivo e propagação deles, sobretudo agentes virais. A atenuação de um patógeno ocorre através de passagens sucessivas em cultivo ‘in vitro’. Esse processo faz com que haja diminuição da virulência, tornando-o não patogênico(ZEPP, 2010).

Atualmente com o desenvolvimento de metodologias de edição genética, foi possível modernizar vacinas já existentes (PULENDRAN; AHMED, 2011). Um exemplo disso são as vacinas vetorizadas, feitas a partir de partículas virais não patogênicas expressas por vetores não patogênicos para o hospedeiro. E, mais recentemente, foi desenvolvida uma metodologia baseada em ácidos nucléicos. Esse tipo de vacina funciona através da inserção de DNA ou RNA de proteínas antigênicas nas células do hospedeiro e essa sequência de ácido nucléico vai induzir a expressão da proteína antigênica, que será apresentada ao sistema imune e, por fim, a indução da resposta adaptativa (DEERING et al., 2014; KHAN, 2013).

3.2.2 Tipos de vacina

3.2.2.1 Vacina viva atenuada

Vacina viva atenuada é a vacina preparada a partir de patógenos enfraquecidos, alterados ou selecionados para serem menos patogênicos do que suas variantes naturais. Assim sendo, não são capazes de causar doença clínica, eles apenas imitam a doença produzindo uma manifestação branda e induzindo proteção no hospedeiro. Em geral, esse tipo de vacina é amplamente aplicado para agentes virais em vez de bactérias, pois a forma de atenuação deles é mais fácil e confiável em função de possuírem menor quantidade de fatores associados com virulência. A forma mais utilizada para atenuar patógenos para a produção de vacinas é a partir da passagem em série do cultivo ‘in vitro’. A atenuação ocorre, pois, a cada passagem do vírus em cultivo celular, ocorre seleção para se tornar mais adaptado à linhagem de célula in vitro do que às células do hospedeiro in vivo (HAJJ HUSSEIN et al., 2015).

As vacinas vivas atenuadas atuam de forma semelhante à infecção natural, ou seja, elas imitam a infecção natural e como o patógeno atenuado possui os mesmos antígenos que o patógeno original, os indivíduos vacinados conseguirão montar respostas imunes comparáveis às que são induzidas pela infecção natural. A consequência disso é a indução de respostas imunes robustas que levam o hospedeiro à proteção de longo prazo (PULENDRAN; AHMED, 2011). Outra vantagem desse tipo de vacina é a capacidade de indução de imunidade de rebanho através da eliminação da estirpe vacinal no ambiente, o que leva a imunização indireta de outros indivíduos que vivam juntos (VETTER et al., 2018).

As desvantagens para esse tipo de vacinas, embora reportado raramente, seria a manifestação de doença clínica após a vacinação, mas em geral os sinais clínicos produzidos pela vacinação são em sua maioria mais leves que os induzidos pela infecção natural. Os riscos são aumentados em indivíduos imunocomprometidos, onde existe maior risco de ocorrer a multiplicação descontrolada da estirpe vacinal, e em casos extremos causar infecção grave emorte. Sendo assim, esse tipo de vacina em geral é contraindicado para indivíduos imunocomprometidos e seu uso deve ser realizado apenas após avaliação de risco. De forma semelhante, essas vacinas são contraindicadas para animais gestantes devido ao risco de resultar em infecção fetal e aumentar as chances de alterações de ordem congênita e de outras considerações já ditas. É importante ressaltar que embora raramente aconteça, essas vacinas

podem reverter a virulência da cepa vacinal por passagens de animal para animal e, dessa forma, o agente voltar a causar doença clínica (“Rubella vaccines: WHO position paper.”, 2011).

3.2.2.2 Vacinas não-vivas

Vacina não viva é toda forma de vacina que não contenha partícula viva, dessa forma são incapazes de serem reativadas e, portanto, não causam doença. Esse tipo de vacina geralmente são as que possuem maior perfil de segurança, mesmo em indivíduos imunocomprometidos. No entanto, existe uma desvantagem nesse tipo de vacina que é a duração da proteção a qual tende a ser mais curta se comparadas às vacinas com agente vivo atenuado. Dessa forma, exige que sejam feitas doses de reforço ou então seja adicionado adjuvantes para melhorar a sua imunogenicidade. Se adotadas essas estratégias, esse tipo de vacina consegue induzir imunidade, tanto celular quanto humoral, de longo prazo (VETTER et al., 2018).

A composição desse tipo de vacina pode ser bastante variada. Elas podem ser formuladas a partir do patógeno inteiro inativado, ou então possuir apenas uma parte dele, ou seja, vacinas contendo subunidades desses microrganismos. A inativação de patógenos inteiros é feito a partir da inativação por calor, radiação ou pela adição de produtos químicos, como por exemplo, o formaldeído (VETTER et al., 2018). No caso das vacinas de subunidade, em vez do patógeno inteiro, ela contém apenas porções selecionadas desse patógeno, que em geral são fragmentos de proteínas, polissacarídeo, porções de um vírus ou toxina que seja produzida por algum microrganismo. Esses tipos de vacina são as que menos possuem reações adversas, ao mesmo tempo são as que tendem a ser menos imunogênicas. Isso acontece, pois no processo de purificação dos antígenos ocorrerá a eliminação de diversos componentes que desencadeiam a imunidade inata (RAPPUOLI et al., 2014).

Existem algumas doenças que são causadas a partir da liberação de toxinas patogênicas, produzidas em geral por bactérias, como por exemplo os *Clostridium* spp. Nesses casos foram desenvolvidas vacinas a partir da inativação das toxinas, que são produzidas por esses microrganismos. A inativação dessas toxinas é feita através do calor, produtos químicos ou então por ambos os mecanismos. Uma vez inativadas, essas toxinas passam a se chamar toxoides, os quais possuem a capacidade de induzir o sistema imune a montar resposta contra elas e, consequentemente, contra a forma ativa dessas toxinas (MOLONEY, 1926; “Tetanus vaccine.”, 2006; VETTER et al., 2018). A proteção fornecida por vacinas com toxoides ocorre

pela produção de anticorpos neutralizantes que devem estar presentes no início da doença para serem eficazes. Assim, essas vacinas requerem doses múltiplas, para que haja a manutenção da proteção adequada ao longo da vida. Vale ressaltar também, que pelo fato dessa vacina ser baseada em toxina produzida pela bactéria, a resposta é montada apenas para a toxina e não para a bactéria. Portanto, a vacina não será capaz de impedir a infecção ou a transmissão do patógeno (BORBA; VIDAL; MOREIRA, 2015).

3.2.3 Adjuvantes

Adjuvantes são substâncias utilizadas nas vacinas para aumentar e modular a indução da resposta imune. Geralmente não é necessária sua utilização em vacinas que utilizam agente vivo atenuado, porque sozinhos já são capazes de se multiplicar ativamente e, consequentemente, potencializar a resposta imune protetora. Em contrapartida, para vacinas não vivas seu uso é fundamental, sobretudo para as vacinas de subunidade, pois esse tipo de vacina naturalmente possui menor imunogenicidade em função da ausência dos diversos fatores intrínsecos presentes nos patógenos inteiros que são o gatilho para o início da resposta imune inata (DI PASQUALE et al., 2015).

Adjuvantes são capazes de ampliar a resposta imune e com isso auxiliar na formação da memória imunológica, pois são capazes de ativar a imunidade inata. Assim, a sua utilização no desenvolvimento de vacinas permite que haja redução de doses necessárias ou da quantidade de antígeno necessária em cada dose para induzir imunidade protetora eficiente. Portanto, a utilização desse recurso influência de forma importante o fornecimento global de vacinas. Essas substâncias também conseguem melhorar a resposta imune em populações que possuem respostas sabidamente baixas, como por exemplo, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (DI PASQUALE et al., 2015).

O adjuvante atualmente mais utilizado e aprovado no mundo são os sais de alumínio. A atuação desses sais ocorre pela ativação direta de células da imunidade inata, que induz, à produção de anticorpos (WEN; SHI, 2016). Além desses sais de alumínio, as emulsões de óleo em água, os virossomas e o MPL (Em inglês, ‘Monophosphoryl Lipid A’) podem ser utilizados também como estimulantes da resposta e todos podem, em geral, ser utilizados sozinhos ou em conjunto para obter a resposta imune desejada (MOSER et al., 2013).

3.2.4 Rotas de vacinação

Para que uma rota de vacinação seja eficiente, ela precisa fazer com que a vacina entre em contato com o sistema imune do indivíduo (DOUGAN, 1994). Sendo assim, existem diversas vias que podem ser utilizadas para essa finalidade. Estas incluem as vias localizadas, como por exemplo as vias intradérmica, subcutânea, intramuscular, transcutânea e de mucosa (oral, entérica, intranasal, respiratória, genital e retal). No caso da vacinação parenteral haverá produção de resposta sistêmica, enquanto pela vacinação localizada, em geral, só produzirá resposta local em linfonodos e tecido linfoide associado às mucosas (MCGHEE; KIYONO, 1993; PUSTERLA et al., 2010).

Sabe-se que a resposta imune nas mucosas possui independência da resposta imune sistêmica. Isso ocorre, pois há intenso intercâmbio entre as células desses sítios, ou seja, a indução de resposta realizada em uma determinada mucosa rapidamente será observada em outra atuando efetivamente. Porém, se tratando de vacinas, ainda existe desvantagens no uso desse tipo de via de vacinação, uma delas são as condições extremas de acidez presentes no estômago, que muitas vezes pode afetar a viabilidade da maior parte das vacinas vivas atenuadas. Outra forma de vacinação de mucosa que conceitualmente possui grande potencial de utilização, desde que a aplicação consiga fornecer as micropartículas de forma eficiente, é a vacina por aerossol. Nesse caso, a aplicação eficiente é aquela onde a vacina ganha acesso ao sistema respiratório inferior sem ficar retido nas conchas nasais (DOUCE et al., 1997).

3.2.5 Infecção experimental

A eficiência de um modelo de infecção experimental é bem-sucedida quando existe o isolamento do microrganismo a partir dos tecidos do animal doente experimentalmente inoculado, obedecendo ao que foi determinado nos postulados de Koch. A recuperação dos microrganismos nos animais traz evidências reais de que o animal de fato foi infectado. Outra forma de avaliar o sucesso da infecção experimental é pela determinação da quantidade de microrganismos eliminados ao longo do tempo após a inoculação. Além disso, esse índice também pode ser utilizado para determinar a intensidade da infecção juntamente com as alterações anatomopatológicas que auxiliam a determinar os padrões de intensidade e distribuição do agente nos diferentes órgãos durante a infecção (GRIFFIN, 2002).

Outras avaliações indiretas que podem ser utilizadas para verificar o sucesso do estabelecimento da infecção é a avaliação clínica dos animais infectados e a morbidade. Para

isso, pode ser avaliado a inapetência, perda de peso, presença de diarreia, sinais respiratórios ou alterações no comportamento (GRIFFIN, 2002). A mortalidade, do ponto de vista histórico, era bastante usada como um ponto final de uma infecção/doença, porém, atualmente, tem sido considerada inaceitável, principalmente pelo ponto de vista ético, mas também em experimentos de avaliação de eficácia de vacinas.

Em geral, índices de desempenho como ganho de peso e, sobretudo a perda de peso, servem como prognóstico para infecções. Assim sendo, animais que apresentam altas taxas de perda de peso precisam ser tratados, ou abatidos de forma eletiva. Portanto, todas as metodologias de avaliação de sucesso da infecção experimental devem em primeiro lugar permitir ao avaliador aferir de forma confiável a presença/ausência e gravidade da infecção. Em testes de eficácia de vacinas torna-se imprescindível, pois é fundamental ter muito bem determinado se a vacina é de fato capaz de proteger contra a infecção (GRIFFIN, 2002).

A qualidade da resposta imune induzida por uma infecção vai diferir entre a resposta primária, que é a que ocorre após a exposição a um determinado patógeno pela primeira vez, e a capacidade de resposta secundária, que acontece após a reexposição ao patógeno. Sabendo disso, a resposta imune que resulta após uma infecção é influenciada pela natureza do patógeno e pela rota que utiliza para infectar o seu hospedeiro. Portanto, as respostas imunes que serão produzidas após a infecção terão ou a capacidade de eliminar o microrganismo patogênico e conferir proteção para o hospedeiro, ou se desenvolver concomitantemente com a infecção e não causar proteção. Levando isso em consideração, a resposta não protetora é geralmente utilizada para o diagnóstico das doenças, enquanto as protetoras são direcionadas para o desenvolvimento de vacinas (GRIFFIN, 2002).

3.2.6 Proteção vacinal

Para se desenvolver uma nova vacina contra um determinado patógeno, o primeiro passo é identificar qual via de proteção é a mais apropriada para aquela infecção e a partir disso, projetar uma vacina que vá ativar de forma satisfatória essa via. De forma geral, sabe-se que cada via de proteção da resposta imune adaptativa tende a ter efeito inibitório sobre a outra, portanto, é muito importante que a qualidade da ativação forneça a proteção adequada (GRIFFIN, 2000).

Quanto ao tipo de via de proteção da resposta adaptativa, sabe-se que existem ao menos duas vias de regulação de proteção mediadas por linfócitos T. As que regulam o

desenvolvimento de resposta mediada por células, denominadas linfócitos Th1, e as que regulam a resposta humoral mediada por anticorpos, conhecida como linfócitos Th2. A regulação de ambas as respostas é feita através da produção de citocinas distintas, que possuem efeito inibitório de um pelo outro e vice-versa. Por exemplo, o IFN-γ produzido pelos linfócitos Th1 tem efeito inibitório sobre os linfócitos Th2, enquanto a IL-4, produzida pelos linfócitos Th2, suprime a atividade dos linfócitos Th1 (GRIFFIN, 2000).

No entanto, esse efeito inibitório descrito agora, ocorre de forma mais evidente para animais consanguíneos. Em animais não consanguíneos a observação de efeito inibitório de uma resposta sobre a outra não é visualizado de modo tão claro durante a infecção e vacinação, e com frequência pode ser observado a ação tanto de linfócitos Th1, quanto de Th2 concomitantemente. Mas mesmo sabendo disso, ao projetar uma vacina é interessante que ela seja capaz de produzir e ativar uma resposta na ausência da outra. Como por exemplo, nas infecções que requerem a via de proteção do tipo Th1. Nesse tipo de resposta foi descrito que resposta do tipo Th2 pode comprometer a proteção produzida pelas células Th1, sendo inviável nesses casos, desenvolver vacinas que induzam respostas mistas (GRIFFIN, 2000).

Os fatores extrínsecos que influenciam na ativação dos linfócitos Th0 em Th1 ou Th2 incluem a forma de infecção, o tipo e a concentração de antígeno e em qual ambiente a resposta ocorre (MOSMANN et al., 1986). Enquanto a ativação de linfócitos Th1 ou Th2 representa o objetivo final das respostas dos linfócitos T, esses dois tipos de células são originados de células precursoras conhecidas como naïve que irão se ativar após o contato com infecções ou vacinação. Portanto, após a ativação dos linfócitos naïve pelos antígenos, elas se diferenciarão em Th0, que por sua vez se diferenciarão novamente para se tornarem Th1 ou Th2 (GRIFFIN, 2002).

O sistema imune é capaz de montar quatro vias diferentes para o combate aos diferentes microrganismos. Para os extracelulares, em geral a proteção é atingida por respostas opsono-fagocíticas, onde existe a mediação da resposta através da atividade de anticorpos séricos (IgG) e proteínas do sistema complemento. As infecções extracelulares nas superfícies mucosas podem ser combatidas de forma não específica por uma série de peptídeos antimicrobianos produzidos pelas células do epitélio da mucosa em questão e a proteção específica é mediada através de anticorpos secretores (IgA), que normalmente tem ação neutralizante sobre os microrganismos infecciosos (SEDER; HILL, 2000).

A resposta contra agentes intracelulares vai ocorrer inicialmente devido a ação das células ‘Natural-Killer’ (NK), as quais fazem parte da resposta imune inata, portanto inespecífica. Com a persistência da infecção intracelular, será exigido do hospedeiro que monte vias imunes celulares de resposta específicas. Estas envolvem a atuação de linfócitos T citotóxicos, que pertencem à subpopulação $CD8^+$, ou linfócitos T auxiliares, que pertencem à subpopulação $CD4^+$, que regulam a morte intracelular por macrófagos. Dessa forma, sabe-se que os requisitos para o desenvolvimento de proteção imune às infecções intracelulares são muito mais complexas do que as respostas necessárias para proteção frente a patógenos extracelulares (SEDER; HILL, 2000).

A ativação da resposta imune tende a ocorrer para apenas uma das vias da resposta adaptativa, e, portanto, a resposta de memória a longo prazo, que será produzida após a ativação, tende a sustentar essa mesma resposta imune. Sabendo disso, é essencial que a exposição no início seja feita por uma vacina que consiga desencadear a via apropriada de imunidade. Nos casos em que é desencadeado a via inadequada, pode ocorrer a produção de resultado pior que a própria infecção (SEDER; HILL, 2000).

A avaliação de proteção vacinal para a maioria das doenças infecciosas ainda é pouco estabelecida. Porém, a avaliação pré-clínica de novas vacinas depende principalmente da avaliação da resposta imune após a vacinação, associados a estudos de proteção contra a infecção pelo patógeno de interesse. Assim, para que um modelo seja útil no desenvolvimento de vacinas, serão necessários diversos reagentes e ferramentas que permitam a caracterização do tipo de resposta imune que é induzida pelo imunizante. Para isso, já estão disponíveis diversos reagentes para grande parte de modelos animais utilizados em estudos de vacinas. Essa variedade de reagentes disponíveis serve para melhorar a caracterização da resposta imune que é induzida pela imunização e/ou pela infecção. Além da disponibilidade de material para teste de resposta imune, atualmente, já estão disponíveis metodologias como sequenciamento completo do genoma das principais espécies de animais utilizadas como modelo experimental (GERDTS et al., 2015).

Os modelos experimentais, de forma semelhante aos seres-humanos, produzem diversos marcadores associados a proteção, por exemplo, as imunoglobulinas, que podem ser detectadas em ensaios sorológicos de rotina. Existe também a disponibilidade de anticorpos específicos para a variada gama de citocinas e quimiocinas associadas com todos os tipos de respostas imunes. Além disso, existe a possibilidade de utilização de testes moleculares para a detecção

da expressão de seus RNAs mensageiros. Outras técnicas empregadas com bastante frequência na avaliação da resposta são o 'Enzyme-linked immuno-spot' (ELISPOT) e o ensaio de citometria de fluxo (BALDWIN; TELFER, 2015; MAIR et al., 2014; WAI et al., 2009). Essas duas metodologias geralmente são utilizadas para quantificar o tipo e a intensidade da resposta imune produzida. Resumidamente, a qPCR, ELISPOT e a citometria de fluxo são frequentemente utilizadas para determinar o tipo de resposta imune induzida após a vacinação e/ou infecção. Além disso, existem disponíveis anticorpos para moléculas e receptores para outras espécies domésticas como suínos, bovinos e ovinos, embora não sejam tão numerosos quanto são para camundongos. No caso dessa última espécie, é possível a seleção de células de todas as populações relevantes do sistema imune (BALDWIN; TELFER, 2015; MAIR et al., 2014; WAI et al., 2009).

3.3 Vacinação contra enteropatógenos

O protocolo de vacinação utilizado na suinocultura é bastante variável entre as unidades de produção. Portanto, não existe um único programa universal estabelecido. Isto ocorre, pois é necessário que sejam levados em conta todos os desafios sanitários e de manejo empregados em cada uma dessas unidades individualmente. É responsabilidade do médico veterinário responsável por monitorar os índices zootécnicos e entender profundamente a epidemiologia das doenças presentes no local, o que possibilitará montar um programa de vacinação adequado com as necessidades da granja (CARON et al., 2012). A tabela 1 apresenta lista de doenças entéricas que acometem suínos para as quais existem vacinas comerciais disponíveis no mercado brasileiro.

Tabela 1. Relação das doenças que acometem suínos passíveis de imunização ativa artificial, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal em 2018.

Doença	**Agente etiológico**	**Classificação**
Rotavirose	Rotavírus suíno	Vírus
Clostridioses	*Clostridium perfringens* tipos A, B e C, *C. novyi; C. septicum; C. tetani; C. botulinum; C. sordellii e C. chauvoei*	Bactéria
Colibacilose	*Escherichia coli* (ETEC)	
EPS	*Lawsonia intracellularis*	
Salmonelose	*Salmonella enterica* Sor. Choleraesuis e *S. enterica* Sor. Typhimurium	

Fonte: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (2018), com modificações.

Outro tipo de ferramenta de imunização rotineiramente utilizada na suinocultura, além das vacinas comerciais, é através da vacinação do plantel com a utilização das vacinas do tipo autógena, que são desenvolvidas e formuladas especificamente para uso em granjas as quais o agente alvo foi isolado. Em geral, esse tipo de imunizante é produzido a partir de antígeno proveniente da inativação do agente por formalina com a adição de adjuvantes a base dos sais de alumínio ou oleosos (BARCELLOS et al., 2007; THACKER, 2004).

Na suinocultura atual, os principais agentes enteropatogênicos de maior importância são: Rotavírus suíno, *Clostridium perfringens* tipo C *e Clostridioides difficile, Escherichia coli* enterotoxigênica, *Cystoisospora suis, Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae* e os sorovares Tiphymurium e Cholerasuis de *Salmonella enterica*. Destes, a maior parte deles são causadores de doenças entéricas no período neonatal e nas primeiras semanas de vida, portanto a vacinação de porcas e marrãs associada a boa ingestão de colostro imediatamente após o nascimento é essencial para a prevenção das diarreias neste período (BARCELLOS et al., 2007).

Para EPS foram desenvolvidas duas formulações de vacinas como ferramenta de prevenção e controle da doença, portanto a primeira vacina comercial disponibilizada no mercado foi a Enterisol® (Boehringer Ingelheim), composta por antígeno vivo atenuado e administração por via oral. A recomendação de uso deste produto é por volta de seis semanas antes da soroconversão, que seria o momento ideal, onde os animais começam a entrar em contato com o agente (BARCELLOS et al., 2007, (KROLL; ROOF; MCORIST, 2004). A segunda vacina, recentemente disponibilizada no mercado para o controle da EPS, é a Porcilis®Ileitis (Merck Animal Health, Medison, NJ, EUA). Esta formulação monovalente e composta de adjuvante a base de óleo mineral e α-tocoferol e patógeno inteiro inativado. Possui administração por via intramuscular com dose única (ROERINK et al., 2018).

Considerando os agentes que causam diarreia em suínos, de acordo com os dados obtidos pelo compêndio de produtos veterinários do SINDAN (2018), existem 27 formulações de vacinas no mercado, disponíveis para todos os principais enteropatógenos, com exceção à *B. hyodysenteriae.* Sendo 22 formulações voltadas para os agentes envolvidos em quadros de diarreias neonatais, duas formulações específicas para a prevenção da infecção por *L. intracellularis* e outras duas vacinas contendo antígenos dos sorovares Thyphimurium e Cholerasuis de *Salmonella enterica.* Informações sobre as vacinas, seus respectivos fabricantes,

assim como o esquema de vacinação contra doenças entéricas podem ser encontrados nas tabelas 2 e 3.

3.3.1 Resposta imune e vacinação contra EPS

A princípio, as observações descritas na literatura acerca da resposta imune induzida durante a infecção por *L. intracellularis* eram apenas uma resposta inflamatória limitada presente apenas em animais com a presença das lesões características (BOUTRUP et al., 2010; LAWSON; GEBHART, 2000; ROWLAND; ROWNTREE, 1972), porém em experimento de inoculação experimental foram detectadas respostas imunes humoral e mediada por células(GUEDES; GEBHART, 2003a). O tempo de duração da resposta imune humoral é limitado, entre 2 e 3 meses. Em geral ocorre inicialmente com a produção de IgM, que indica a fase ativa da doença, seguida por mudança de classe e produção de IgG. Para a imunidade humoral de mucosa, a produção de IgA específica para *L. intracellularis* está presente apenas no soro de animais infectados (CORDES et al., 2012), e na mucosa intestinal essa imunoglobulina foi detectada em até 3 semanas após a inoculação (GUEDES; GEBHART, 2003a).

O fato de o agente ter natureza intracelular, a resposta imune mediada por célula possui papel importante na resposta. De acordo com Cordes e colaboradores (2012), , a resposta mediada por células ocorre através da infiltração de células $CD8^+$ e macrófagos na lâmina própria dos intestinos dos animais com EPS. Nesse experimento foi demonstrado através da técnica de ELISA que existe produção de IFN-ϒ pelas células T após a infecção e que a produção dessa citocina possuiu relação com o controle da doença. No entanto, em outro estudo produzido por MacIntyre e colaboradores (2003) foi observado que houve redução nos números de células T e B no intestino de animais infectados com associação à presença de *L. intracellularis*, sugerindo que a bactéria possua algum mecanismo imunossupressivo desconhecido.

Tabela 2. Descrição dos tipos de vacinas, apresentação antigênica, tipos de adjuvantes, vias de administração e protocolo de imunizações dos principais produtos disponíveis para comercialização no mercado brasileiro contra doenças entéricas (*E. coli, C. perfringens* tipo B e C e Rotavírus) em suínos disponíveis no mercado brasileiro.

Número	Tipo de vacina	Agentes	Tipo de antígeno	Tipo de adjuvante	Dose	Via
LitterGuard LT-C ®	Polivalente	*C. perfringens* tipo C e D (bacterinas e toxoides) e *E. coli enterotoxigênica (K-88, K-99, 987-P e F-41) (bacterina e toxoide)*	Antígenos inativados	NI	2 mL	IM ou SC
PORCILIS® BPE 4*3	Polivalente	*B. bronchisseptica*, *P. multocida* não toxigênica tipo A e a toxigênica tipo D, *E. rhusiopathiae*, *E. coli* (K88, K99, 987P e F41) e *C. perfringens* tipo C	Antígenos inativados	Adjuvante aquoso	2 mL	IM ou SC
PORCILIS® 2*4*3	Polivalente	Rotavírus suíno (sorotipos G4 e G5), *E. coli* (K88, K99 987P e F41) *e C. perfringens* tipo C (bacterina e toxóide)	Antígenos inativados	Adjuvante aquoso	2 mL	IM ou SC
PORCILIS® COLI	Monovalente	*E. coli* (K88, K99, 987P e toxoide LT)	Antígenos inativados	Adjuvante oleoso	2 mL	IM
PORCILIS® Ileitis	Monovalente	*L. intracellularis*	Antígeno inativado	Adjuvante oleoso	2 mL	IM
PILI SHIELD PORCINO + C ®	Polivalente	*E. coli* (K99, K88, 987P e F41) e *C. perfringens* tipo C *(bacterina e toxóide)*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	IM

PILI SHIELD PORCINO ®	Monovalente	*E. coli* (K99, K88, 987P e F41)	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	IM
SUISENG ® Diff/A	Polivalente	*E. coli enterotoxigênica (K88ab, K88ac, K99 e 987), C. perfrigens* tipo C (toxoides), *Clostridium novyi* tipo B *(toxoide)*	Antígenos inativados	NI	2 mL	IM
COLISUIN-CL®	Polivalente	*E.coli* (K88, K99, 987P e toxoide LT), *C. perfrigens* tipo C (toxóide) e *C. novyi* tipo B (toxóide)	Antígenos inativados	NI	2 mL	IM
Serkel Gastro RV ®	Polivalente	Rotavírus, *E. coli* (K88, 987P, K99 e F41), *C. perfringens* tipo C (toxoide β) e D (toxoide ε)	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	IM
Excell 11 ®	Polivalente	Bacterina de *C. chauvoei, C. perfringens* tipos A, B, C e D, *C. septicum, C. novyi, C. tetani, C. sordellii e C. botulinum* tipos C e D	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	SC
Excell 10 ®	Polivalente	Bacterina de *C. chauvoei* e toxoides de *C. sordellii, C. novyi, C. perfringens* B, C e D, *C. septicum, C. tetani e C. botulinum* C e D	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	SC
Excell 8 ®	Polivalente	Bacterina de *C. chauvoei* e toxoides *de C. sordellii, C. novyi, C. perfringens B, C e D, C. septicum e C. tetani,*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	SC

Poliven 7 ®	Polivalente	Bacterina de *C. chauvoei* e toxoides de *C. sordellii, C. novyi, C. perfringens* B, C e D e C. septicum	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	SC
Millenium ®	Polivalente	Bacterinas de *C. chauvoei* e *C. sordellii*, e toxoides de *C. perfringens* A, B, C e D, C. novyi A e B, C. *septicum, C. haemolyticum* (novyi D) e *C. tetani*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	SC
Serkel Gastro ®	Polivalente	*E. coli* (K88, 987P, K99, F41 e toxoide LC), *C. perfringens tipo C (toxoide β) e D (toxoide ε)*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	IM
Suiven ®	Polivalente	*Salmonella enterica* Sor. Choleraesuis, *S. enterica* Sor. Choleraesuis Var. Kunzendorf, *P. multocida* A e D, de *E. coli* (K88, K99, 987P, F41), *L. pomona, L. canicola, L. icterohaemorrhagiae, L. wolffii, L. grippotyphosa, L. tarassovi, E. rhusiopathiae e B. bronchiseptica*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	3 mL	SC
SINTOXAN® POLIVALENTE	Polivalente	Toxoides: *C. septicum; C. perfringens* tipos B, C, D e *C. novyi* Bacterinas: *C. sordellii e C. chauvoei*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	IM
SINTOXAN® POLIVALENTE T	Polivalente	Toxoides: *C. septicum; C. perfringens* tipos B, C, D*; C.* novyi e *C. tetani*; Bacterinas: *C. sordellii e C. chauvoei*; Bacterina-Toxóide de *C. chauvoei, C. septicum, C. perfringens* tipos B, C e D, *C. novyi, C. sordelli* e *C. tetani*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	3 mL	IM

CLOSTRIMUNE-8 ®	Polivalente	Bacterina-Toxóide de *C. chauvoei, C. septicum, C. perfringens* tipos B, C e D, C. novyi, *C. sordelli e C. tetani*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	3 mL	SC
VACINA POLY-HEPTA ®	Polivalente	*C. septicum; C. perfringens tipos B, C, D; C. novyi e C. chauvoei;*	Antígenos inativados	NI	2 mL	SC
OUROVAC 10 TH ®	Polivaente	Toxoides de *C. septicum, C. novyi* tipo B, *C. sordelli, C. perfringens* tipos A, C e D, *C. tetani* e bacterinas de *C. chauvoei e C. haemolyticum.*	Antígenos inativados	NI	2 mL	SC
RESGUARD POLIVALENTE ®	Polivalente	Bacterinas de *C. chauvoei* e de *C. perfringens* B e D, Toxoides de *C. septicum, C. novyi e C. sordellii*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	3 mL	SC
CLOSTRIVAC ®	Polivalente	*C. perfringens tipo B* e *D, C. novyi B, C. chauvoei, C. sordelli e C. septicum (bacterinas e toxoides)*	Antígenos inativados	Hidróxido de alumínio	2 mL	SC
Enterisol ® Ileitis	Monovalente	*L. intracellularis*	Antígeno atenuado	NI	2 mL	Oral
Enterisol ® SC-54	Monovalente	*Salmonella enterica* Sor. Cholerasuis	Antígeno atenuado	NI	2 mL	Oral
Enterisol ® T/C	Polivalente	*Salmonella enterica* Sor. Cholerasuis e Typhiurium	Antígeno atenuado	NI	2 mL	Oral

Pneumoenterite	Polivalente	*S. entérica* Sor. Choleraesuis, *P. multocida e S.* Typhimurium	Antigenos inativados	Soro fisiológico fenicado	2 mL	SC
Vacina Hertape contra a pneumoenterite dos suínos ®	Polivalente	*S. entérica* Sor. Choleraesuis, *P. multocida e S.* Typhimurium	Antigenos inativados	Soro fisiológico fenicado	2 mL	SC

Fonte: Compêndio de Produtos Veterinários – SINDAN (2018) com modificações.
Legenda: SC – Subcutânea; IM – Intramuscular; NI – Não informado.

Tabela 3. Descrição dos tipos de vacinas, baseado na sequência listada na tabela 3, com relação ao intervalo de administração, duração da imunidade e reforço vacinal.

.

Número	Intervalo de administração (Primovacinação e *Boosters*)	Duração da imunidade	Reforço vacinal
LitterGuard LT-C ®	Duas doses	NI	Gestação
PORCILIS® BPE 4*3	Dose única.	NI	NI
PORCILIS® 2*4*3	Dose única (porcas e marrãs prenhes).	NI	NI
PORCILIS® COLI	Dose única (porcas e marrãs prenhes).	NI	NI
PORCILIS® Ileitis	Dose única	20 semanas	NI
PILI SHIELD PORCINO + C ®	Duas doses	NI	Gestação
PILI SHIELD PORCINO ®	Duas doses	NI	Gestação
SUISENG ® Diff/A	Duas doses	NI	Gestação
COLISUIN-CL®	Duas doses	6 meses	Gestação
Serkel Gastro RV ®	Duas doses	NI	Gestação
Excell 11 ®	Duas doses	NI	Anual
Excell 10 ®	Duas doses	NI	Anual
Excell 8 ®	Duas doses	NI	Anual
Poliven 7 ®	Duas doses	NI	Anual
Millenium ®	Duas doses	NI	Anual
Serkel Gastro ®	Duas doses	NI	Gestação
Suiven ®	Duas doses	NI	Anual
SINTOXAN® POLIVALENTE	Duas doses	NI	Gestação
SINTOXAN® POLIVALENTE T	Duas doses	NI	Gestação
CLOSTRIMUNE-8 ®	Duas doses	NI	Anual
VACINA POLY-HEPTA ®	Duas doses	NI	NI

OUROVAC 10 TH ®	Duas doses	NI	Anual
RESGUARD POLIVALENTE ®	Duas doses	NI	Anual
CLOSTRIVAC ®	Dose única	NI	Gestação
Enterisol ® Ileitis	Dose única	NI	NI
Enterisol ® SC-54	Dose única (a partir de 1 dia de idade)	NI	NI
Enterisol ® T/C	Dose única (2 semanas de idade)	NI	NI
PNEUMOENTERITE	Dose única	NI	Anual
Vacina Hertape contra a pneumoenterite dos suínos ®	Dose única	NI	Anual

Legenda: NI – Não informado.

Para proteger o plantel contra a EPS, a vacinação é uma alternativa eficaz e para isso é fundamental que se encontre o momento correto para que a estratégia funcione de modo efetivo. Para se encontrar o exato momento em que se deve iniciar a vacinação, o soroperfil é uma ferramenta que pode monitorar e informar o melhor momento para proteger os animais. De acordo com (WALTER et al., 2004) , o período crucial com maior risco de infecção ocorre na fase da creche entre a quinta e a oitava semana de vida, portanto esse seria o melhor momento para se iniciar um protocolo vacinal. Atualmente, existem duas vacinas comerciais para prevenir casos de EPS disponíveis.

A primeira vacina registrada para controle da EPS (Enterisol®, Boehringer Ingelheim) é composta por agente vivo atenuado. A cepa utilizada na vacina é a B3903 e a atenuação da virulência foi realizada através das passagens sucessivas in vitro (20-40 vezes) em cultivo de células McCoy (KROLL; ROOF; MCORIST, 2004). A dose recomendada para uso em leitões de desmama é aproximadamente 10^5 bactérias veiculados na água (KROLL; ROOF; McORIST, 2004) . A segunda vacina disponível é a Porcilis®Ileitis (Merck Animal Health, Medison, NJ, EUA), composta pelo patógeno inteiro inativado com adjuvante a base de óleo mineral e α-tocoferol (ROERINK et al., 2018).

Quanto a indução de proteção conferida pela vacina contendo a bactéria viva atenuada, um estudo mostrou que os animais vacinados mostraram redução significativa de lesões intestinais, ausência de sinais clínicos da doença e melhora no desempenho quando comparados com os animais não vacinados e grupo controle (KROLL; ROOF; McORIST, 2004) . Porém, a

vacina não foi capaz de reduzir significativamente a eliminação nas fezes, ou seja, os animais vacinados continuaram eliminando grande quantidade de bactéria nas fezes, e dessa forma, continuariam sendo uma fonte de infecção para outros animais (KROLL; ROOF; McORIST, 2004) .

A partir desse estudo conduzido por Kroll e colaboradores (2004) foi gerada a hipótese de que a dose recomentada não seria o suficiente para reduzir a eliminação de *L. intracellularis*. Para isso, Nogueira e colaboradores (2013) conduziram um experimento onde em um dos grupos experimentais foi administrado o tratamento com 10x a dose recomentada. E o grupo vacinado após o desafio mostrou uma diminuição significativa na eliminação de *L. intracellularis* se comparado com o grupo controle. Além disso, antes do desafio esse grupo obteve maior concentração de IgG e IgM específicas para *L. intracellularis* no soro e na mucosa intestinal, aumento na detecção de TNF-α e TGF-β1 na mucosa intestinal e tendência de aumento nos níveis de IFN-γ e IL-6. Em contrapartida, os valores de IgA na mucosa foram abaixo do limite de detecção (NOGUEIRA et al., 2013). Após o desafio, os animais vacinados apresentaram aumento nos níveis de IFN-γ, IL-6, IL-10 e TNF-α, IgG no soro e IgA (NOGUEIRA et al., 2013).

Para caracterizar a resposta imune induzida pela infecção por *L. intracellularis* e fazer a identificação de marcadores relacionados com a proteção conferida pela vacina viva atenuada, Riber e colaboradores (2015) conduziram um experimento que identificou que tanto a resposta humoral quanto a resposta celular nos animais vacinados eram inferiores quando comparadas com animais infectados experimentalmente. Esse resultado contrasta com resultados prévios descritos por Guedes e Gebhart (2003a) , que mostrou diferença nos níveis de IFN-γ e a soroconversão em animais infectados foi mais precoce, a partir dos 14 dias após a infecção, enquanto de animais vacinados a detecção só ocorreu depois dos 35 dias após a vacinação (GUEDES; GEBHART, 2003a). Dessa forma, os dados obtidos através desses estudos indicam que a vacina viva atenuada é capaz de induzir proteção através de mecanismos relacionados a imunidade humoral de mucosa e pela secreção de citocinas responsáveis pela modulação da resposta adaptativa mediada por células, inflamação e da restauração da barreira epitelial.

Para a segunda vacina comercial disponível no mercado, composta por organismos de *L. intracellularis* inteiros inativados, Roerink e colaboradores (2018) observaram que animais vacinados tiveram menor ocorrência da doença. Os animais vacinados com a Porcilis®

mostraram menor severidade dos sinais clínicos, menor colonização e menor duração da eliminação de *L. intracellularis* nas fezes após o desafio. Além disso, a marcação de células PAS positivas na mucosa intestinal e a secreção de MUC2 nos animais vacinados estavam inalteradas, indicando que a vacina foi capaz de preservar a integridade de células caliciformes durante a infecção. Mesmo com resultados promissores, ainda são necessários outros estudos para auxiliar a entender melhor os mecanismos associados a proteção conferida por essa vacina, como por exemplo a indução de imunidade humoral de mucosa e imunidade mediada por células.

Independentemente dessas duas vacinas comerciais disponíveis no mercado, ainda há espaço e necessidade de desenvolvimento de novas alternativas para prevenção da EPS, pois para a produção, tanto da vacina inativada, quanto da viva atenuada, é necessário a propagação do agente em cultivo celular e isso torna o processo de produção dispendioso. Pensando nisso, vacinas de subunidades compostas por antígenos de *L. intracellularis* se tornam uma maneira viável de reduzir esse custo, pois são menos onerosas para se produzir e capazes de estimular o sistema imune e montar respostas protetoras da mesma forma que as já disponíveis (OBRADOVIC; WILSON, 2020).

Em estudo de imunoproteomica '*in vitro'* realizado por Obradovic et al., (2019) foram identificadas 11 proteínas imunogênicas potenciais candidatas a vacinas de subunidade contra *L. intracellularis*. De todas, quatro delas com maior potencial, sendo LI0710 (Flagelina), LI1153 (Proteína N putativa), L0649 (Proteína de autotransporte) possivelmente expressas na membrana externa e LI0649 ('ABC dipeptide transport system') predita ser periplásmica com domínio transmembrana (OBRADOVIC et al., 2019).

Após produção recombinante em cepas de *E. coli* essas 4 proteínas foram submetidas a técnica de Western Blotting e reagiram positivamente com soro de suínos oriundos de granjas com casos de EPS, sugerindo o alto potencial imunogênico. A partir de então, para avaliar o potencial uso dessas proteínas foi realizado teste de neutralização utilizando soro hiperimune de coelho específico para cada imunógeno. Foi observado que houve bloqueio de internalização de *L. intracellularis* em cultivo 'in vitro' de células epiteliais intestinais de suínos (IPEC-J2). Outro dado interessante discutido nesse estudo foi que a proteína de flagelina de *L. intracellularis* (LI0710) possui papel potencial imunoestimulante e agonista de TLR5, sugerindo que essa proteína poderia, além de atuar como antígeno, desempenhar função

adjuvante na resposta de mucosa contra *L. intracellularis* OBRADOVIC et al., 2019; OBRADOVIC; WILSON, 2020; PORTE et al., 2017).

Existe também na literatura, relato de formulação de uma vacina de subunidade baseada em proteínas quiméricas recombinantes de *L. intracellularis* (MONTESINO et al., 2019). E após o estímulo dos animais com essa proteína quimérica, a detecção de IgG foi significativamente maior se comparada com os animais do grupo controle e o título cresceu gradualmente até após 5 semanas depois da inoculação. A resposta mediada por células também foi analisada 8 dias após a imunização e todos os genes testados se apresentavam aumentados no grupo vacinado com esse composto. Na avaliação microscópica dos animais vacinados com a proteína quimérica de antígenos de *L. intracellularis* não foram observadas lesões microscópicas características da infecção. Em contrapartida, animais do grupo controle positivo foi visualizado proliferação das células imaturas da cripta intestinal, ausência de células caliciformes, atrofia de vilosidades após o desafio (MONTESINO et al., 2019).

A busca para o desenvolvimento de marcadores vacinais que permitam a diferenciação entre animais vacinados dos naturalmente infectados também faz parte dos avanços dos estudos em vacinação contra *L. intracellularis*. Esse tipo de vacina é denominado DIVA (‘Differenciating Infected and Vaccinated Animals’). Essa tecnologia já vem sendo desenvolvida ao longo dos anos para prevenção de diversas enfermidades importantes que acometem a espécie suína. Resumidamente esse tipo de vacina é formulada como uma vacina viva modificada, onde um ou mais antígenos são deletados da cepa vacinal, porém estão presentes nas cepas de campo. A ausência dessas proteínas na cepa vacinal permite, baseado em testagem sorológica, distinguir animais infectados dos vacinados (OBRADOVIC; WILSON, 2020).

Levando em consideração a natureza intracelular de *L. intracellularis*, o uso de técnicas moleculares capazes de modificar microrganismos e induzi-los a expressar ou não determinadas proteínas se torna limitada. Neste caso, a solução para o desenvolvimento de vacinas de subunidade do tipo DIVA para *L. intracellularis* seria através da seleção de proteínas bacterianas imunogênicas, por exemplo, a seleção de uma proteína imunogênica presente em cepas de campo e ausente na vacina de subunidade. Dessa forma, tanto animais vacinados quanto infectados gerariam resposta de anticorpo contra os antígenos vacinais, porém apenas animais infectados teriam títulos para a proteína imunogênica que está ausente na fórmula da vacina (OBRADOVIC; WILSON, 2020).

Ainda com o objetivo de desenvolver potenciais vacinas de subunidade contra EPS, Fourie et al, (2021) conduziram alguns estudos de testes de proteínas imunogênicas presentes em *L. intracellularis* em um desses estudos eles fizeram o teste de uma vacina contendo uma proteína de flagelina recombinante (rFliC) presente em *L. intracellularis* associada com fragmento de Glicoproteína D (TgD) originado de herpesvírus, possível molécula a ser usada como antígeno DIVA. Neste estudo, leitões de aproximadamente 5 semanas de vida foram vacinados por via intramuscular com essa formulação. Os resultados desse experimento indicaram que os animais vacinados apresentaram aumento significativo da resposta humoral no soro, tanto para a rFliC, quanto para TgD, indicando capacidade imunogênica de ambos os antígenos enquanto animais do grupo controle negativo apresentaram títulos insignificantes para TgD. Esse resultado indica que essa glicoproteína pode ser um potencial candidato a proteínas para diferenciar animais vacinados de infectados para a espécie suína (FOURIE et al., 2021).

Park e colaboradores (2019) desenvolveram um estudo com o objetivo de investigar se uma vacina atenuada de *Salmonella* contendo antígenos recombinantes de *L. intracellularis* era capaz de induzir resposta imune e proteção contra EPS e salmonelose suína. Para isso eles inseriram antígenos específicos de *L. intracellularis* em isolado de *Salmonella enterica* Sorovar Typhimurium. As proteínas de *L. intracellularis* selecionadas incluíam Lat2, LfliC e Lhly. E o estudo demonstrou que os camundongos vacinados com essa cepa modificada de *Salmonella enterica* foram capazes de induzir resposta sistêmica e de mucosa específicas, tanto contra *L. intracellularis*, quanto para o sorovar Typhimurium, provendo proteção parcial e completa respectivamente. Sendo assim, esse modelo de vacina de *L. intracellularis* baseada em cepa mutante de *Salmonella enterica* possui potencial futuro na prevenção das duas enfermidades, uma vez que a vacinação conseguiu efetivamente induzir respostas específicas em níveis humoral e celular conferindo proteção para ambos os agentes (PARK; WON; LEE, 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação da resposta imune e proteção induzidas pela vacina Porcilis® Ileitis foi realizado um experimento ‘in vivo’ onde foi estudado o tipo de resposta imune (humoral ou celular) potencialmente relacionada à proteção contra a infecção experimental por *L. intracellularis*

4.1 Infecção experimental de suínos com *L. intracellularis.*

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, número do processo 36/2016. Foram utilizados 72 suínos, provenientes de granja sem histórico clínico de Salmonelose ou enteropatia proliferativa e livre de disenteria suína. Os leitões foram transferidos para as instalações de pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG com aproximadamente 3 semanas de idade. Todos os animais foram pesados e homogeneizados aleatoriamente em 4 salas, balanceando os grupos por peso, tendo acesso a água e ração não medicada *ad libitum* desde sua chegada. Cada sala recebeu um grupo experimental, sendo eles: Vacinado/desafiado (VAC/DES), Vacinado e não desafiado (VAC), Desafiado e não vacinado (DES) e Controle (CONT), de acordo com a Tabela 4. Cada sala possuía 4 baias suspensas, com comedouro do tipo depósito e um bebedouro do tipo chupeta.

Tabela 4. Resumo do desenho experimental considerando os grupos vacinado e desafiado (VAC/DES), vacinado (VAC), desafiado (DES) e controle (CONT).

Grupos	Número de animais	Dia 0	Dia 28	Dia 49
VAC/DES	16	Vacinação	Inoculação	Necropsia
VAC	20	Vacinação	SPG*	Necropsia
DES	16	PBS**	Inoculação	Necropsia
CONT	20	PBS	SPG	Necropsia

*Solução de sacarose, fosfato e glutamato - **Solução de tampão salino de fosfato

O resumo com a linha do tempo do experimento está descrito na figura 6. Antes da vacinação, no dia 0 do experimento, amostras de sangue e fezes foram coletadas de todos os animais para confirmar a ausência de *L. intracellularis* e anticorpos maternos, respectivamente. Com 3 semanas de idade, também no dia 0, leitões do grupo VAC/DES e VAC receberam uma dose de 2 mL da vacina *L. intracellularis* inativada (Porcilis® Ileitis), via intramuscular (IM). Leitões do grupo DES e CONT, no mesmo dia, receberam o mesmo volume de PBS via intramuscular.

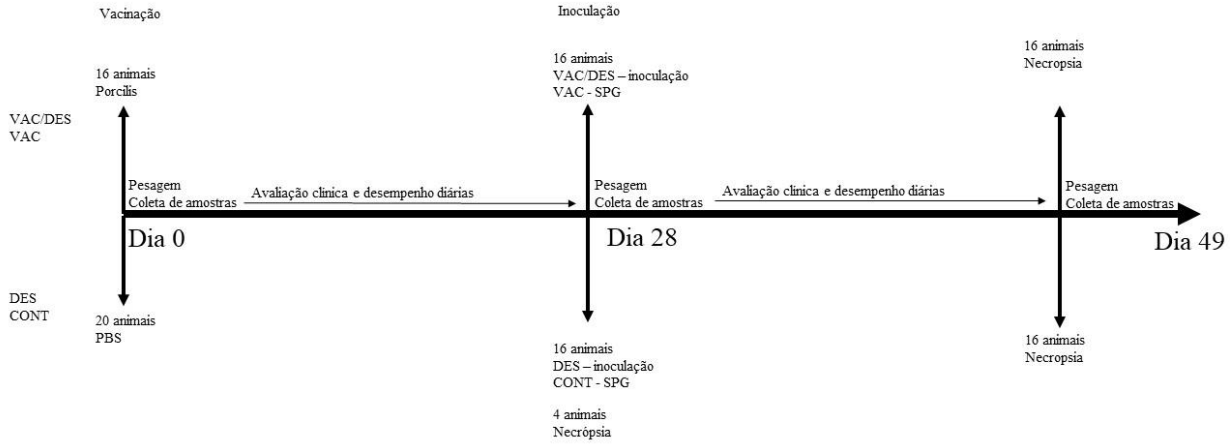


Figura 6. Linha do tempo com resumo experimental indicando as três datas de coleta, de vacinação, inoculação e necropsia.

Com 7 semanas de idade, no dia 28, animais dos grupos VAC/DES e DES foram inoculados pela via intragástrica com homogeneizado de raspados de mucosa proveniente de suínos infectados por *L. intracellularis*, com cerca de 10^9 organismos por mL (GUEDES et al., 2002). Leitões dos grupos VAC e CONT receberam somente diluente. Neste mesmo dia, antes do procedimento de inoculação, 4 animais do grupo VAC e outros 4 animais do grupo CONT foram selecionados aleatoriamente e submetidos a eutanásia para coleta de lavado ileal para a quantificação da presença de IgA. No dia 49, os leitões restantes foram eutanasiados para realização da avaliação anatomopatológica e coleta de amostras para os testes laboratoriais. A eutanásia ocorreu 21 dias após a inoculação (dia 49), pois a data coincide com o pico de infecção, que ocorre entre 14 e 21 dias pós-inoculação.

4.2 Coleta de amostras

Amostras de fezes foram coletadas de todos os leitões nos dias 0, 28 e 49 e testadas por qPCR (NATHUES; HOLTHAUS; BEILAGE, 2009) para avaliar a eliminação de *L. intracellularis.* Amostras de soro foram coletadas de todos os animais nos dias 0, 14, 28, e 49 e testadas pela técnica de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA) para se detectar IgG sérico específicos contra *L. intracellularis* (GUEDES et al., 2002).

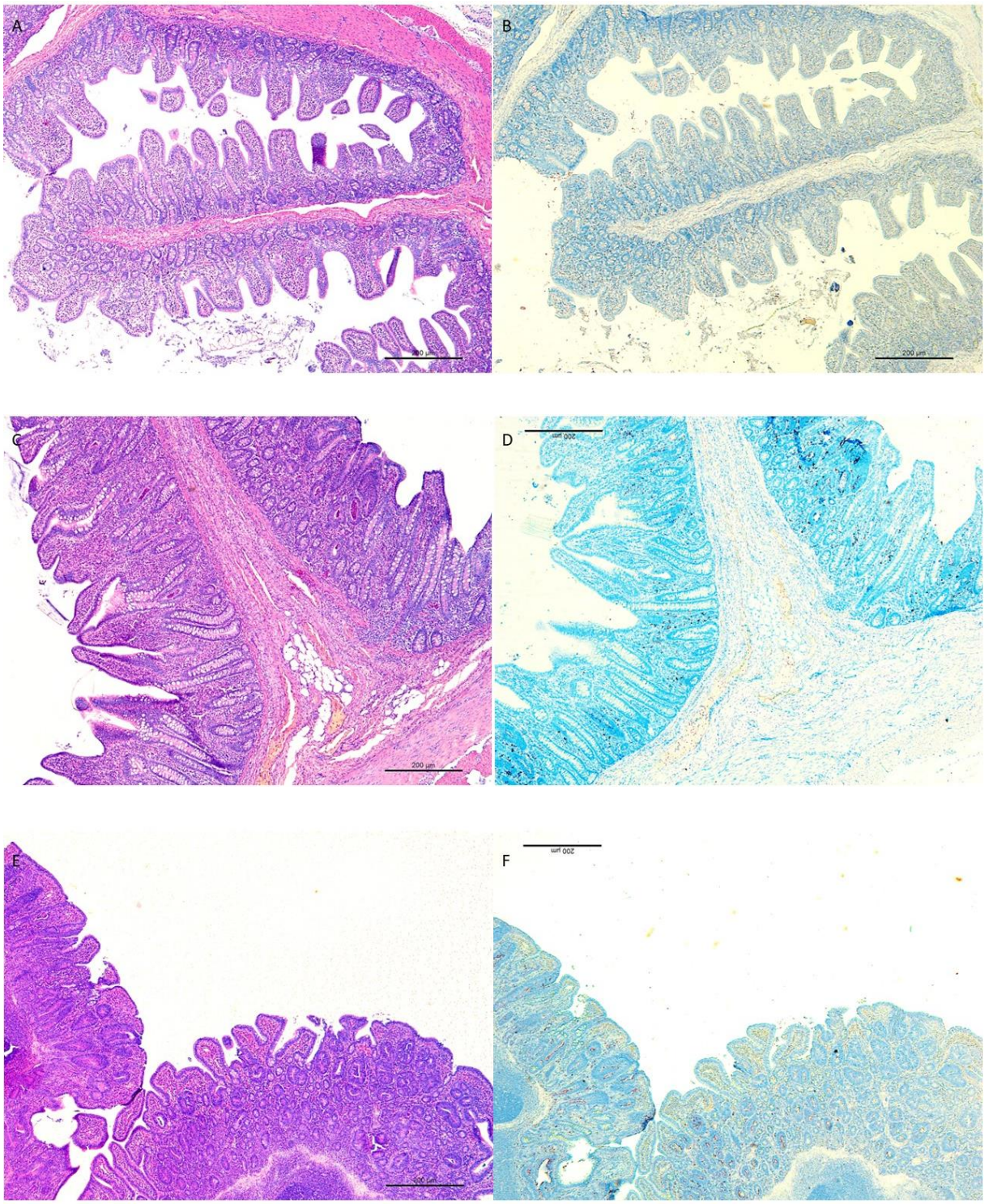
No dia 28, 8 leitões, sendo 4 do grupo VAC e 4 do grupo CONT, foram aleatoriamente selecionados e submetidos a eutanásia e lavagem da região aboral do íleo, em uma extensão de 20 a 30 centímetros a partir da válvula ileocecal, utilizando 20 mL de PBS refrigerado. Uma técnica de IPMA modificada foi utilizada para quantificar IgA no lavado ileal, de acordo com Guedes et al. (2002) e Guedes e Gebhart (2010) . A lavagem ileal também foi realizada nos leitões submetidos a eutanásia no dia 49.

Nos dias 0, 28 e 49, amostras de sangue total foram coletadas de 8 leitões aleatoriamente selecionados dos grupos VAC/DES e VAC e de 4 leitões dos grupos DES e CONT. As amostras foram testadas pela técnica de ELISPOT para detectar as células produtoras de IFN-ϒ que respondem especificamente à *L. intracellularis* (GUEDES; GEBHART, 2003a).

4.3 Sinais clínicos e lesões

A avaliação clínica foi realizada diariamente, utilizando a seguinte escala baseada na consistência das fezes: 0 = Normal, 1 = semissólido, 2 = cremosa e 3 = aquoso sem sangue e 3,5 = aquoso ou semissólido com sangue (COLLINS; BARCHIA, 2014), sendo considerado diarreia apenas avaliações com grau 3, ou superior. A extensão e severidade das lesões macroscópicas intestinais compatíveis com EPS foram avaliadas à necropsia utilizando-se uma escala de 1 a 3, sendo 0 = normal, 1 = levemente espessada e com hiperemia, 2 = espessamento moderado com hiperemia e exsudato fibrinoso e 3 = espessamento acentuado com exsudato fibrinonecrótico e/ou hemorrágico. Um '*gross composite score*' foi calculado para cada leitão através da multiplicação do escore de lesão da mucosa intestinal pela extensão da lesão (GUEDES; GEBHART, 2003a). Amostras de íleo e intestino grosso de cada leitão foram fixadas em formol 10% para exame histopatológico, e processados rotineiramente de acordo com Luna (1968) . Para a avaliação da distribuição e intensidade das lesões, foi utilizado corte transversal da porção de íleo e cólon. O escore a seguir: grau 0, para ausência de hiperplasia das células imaturas da cripta intestinal no corte (Figura 7A), grau 1 para área focal de hiperplasia (Figura 7C), grau 2 para hiperplasia multifocal (Figura 7E), grau 3 para hiperplasia multifocal a coalescente (Figura 7G) e grau 4 para hiperplasia difusa (Figura 7I). Para confirmar o status da infecção, uma secção transversal do íleo e cólon de cada animal e de cada grupo foi submetida à imuno-histoquímica (IHQ) utilizando anticorpo policlonal anti-*L. intracellularis* (GUEDES; GEBHART, 2003b) e a revelação com o método da estreptavidina marcada. Assim, foi utilizado o seguinte escore: grau 0, nenhuma área com marcação (Figura 7B); grau 1, área focal de marcação positiva (Figura 7D); grau 2, marcação positiva multifocal

(Figura 7F); grau 3, marcação multifocal a coalescente positiva (Figura 7H) e grau 4, marcação difusa (Figura 7J) (GUEDES et al., 2002; GUEDES; GEBHART, 2003c; JENSEN et al., 1997)



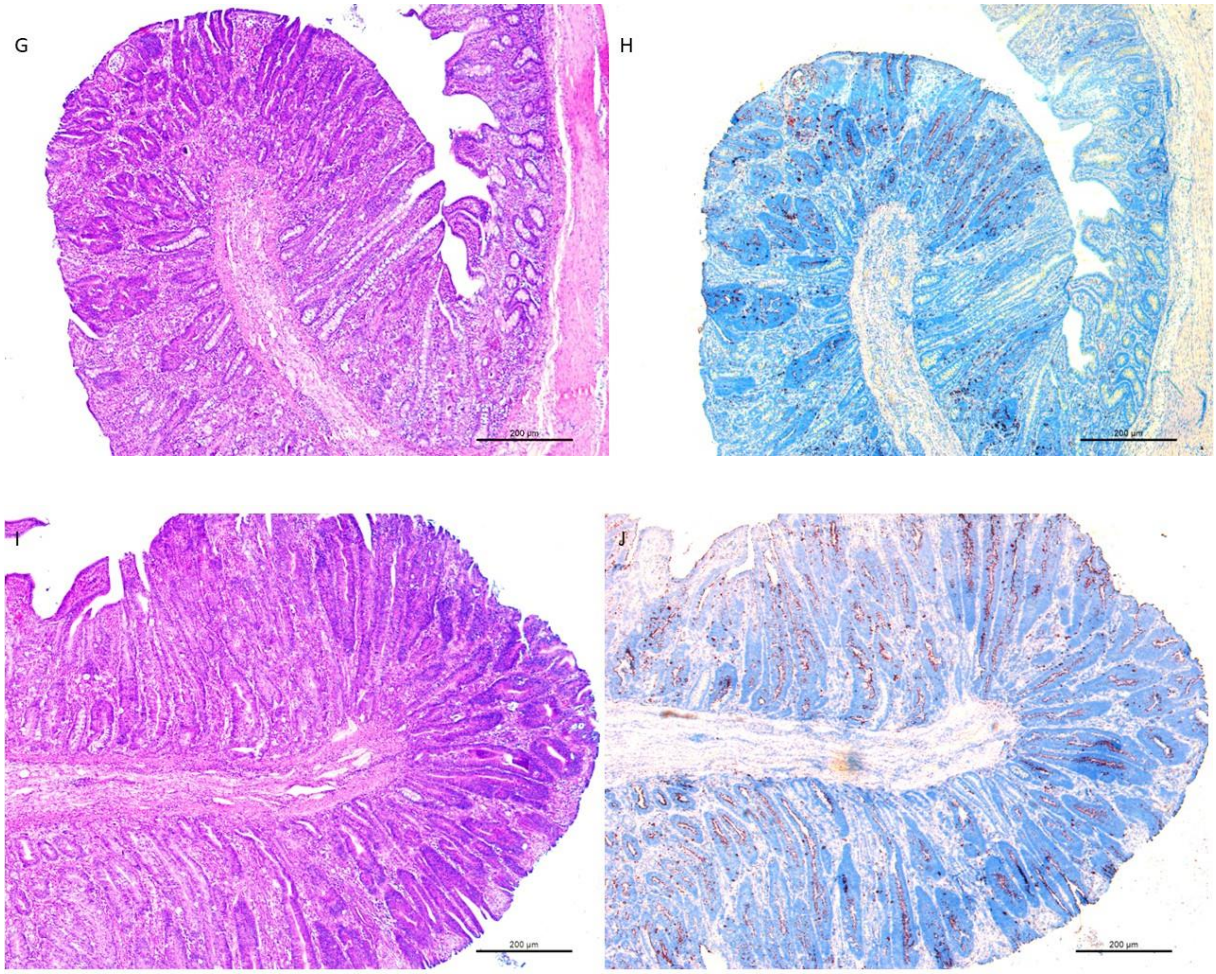


Figura 7. Fotomicrografias em menor aumento de secções de íleo coradas com hematoxilina e eosina e submetidas a avaliação por imuno-histoquímica para *L. intracellularis* (aumento 4x). (A) Corte transversal de íleo de animal com grau 0 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (B) Corte transversal de íleo com grau 0 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis.* (C) Corte transversal de íleo de animal com grau 1 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (D) Corte transversal de íleo com grau 1 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis*. (E) Corte transversal de íleo de animal com grau 2 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (F) Corte transversal de íleo com grau 2 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis*. (G) Corte transversal de íleo de animal com grau 3 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (H) Corte transversal de íleo com grau 3 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis*. (I) Corte transversal de íleo de animal com grau 4 de hiperplasia de células imaturas da cripta. (J) Corte transversal de íleo com grau 3 de marcação positiva pela técnica de imuno-histoquímica para *L. intracellularis*.

4.4 Desempenho dos animais

Os animais foram pesados nos dias 0, 28, 49. O consumo real da ração, oferta menos desperdício, durante o experimento foi registrado dos dias 0-28 e 28-49. Estes dados foram utilizados para calcular ganho de peso diário (GPD), consumo médio diário e conversão alimentar.

4.5 PCR quantitativo

DNA bacteriano foi extraído de amostras fecais (0,2 g) individuais utilizando o QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado através da técnica de PCR em tempo real. Resumidamente, forward (5'-GCT CAT ACC GAT TGT GTA ATG CA -3') e reverse (5'-GAA AAA CAG GCC GTA TCC TTG-3') primers e uma sonda TaqMan (5'-FAM-TAG CCA CAT CAA GTG TTC CAG CTG CAA G-TAMRA-3') (Applied Biosystems) amplificam um fragmento de 525 pares de bases do gene de origem. A reação de PCR de 25 μL conteve 12,5 μL de um reagente comercial para PCR em tempo real (TaqMan® universal PCR master mix 2x), 12,5 pmol de cada primer, 5 pmol de sonda e 2,5 μL de DNA extraído. O protocolo de amplificação do DNA inclui um passo inicial de 10 minutos a 95°C e 45 segundos a 60°C. As reações foram colocadas em um termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Uma curva padrão de concentração conhecida de organismos de *L. intracellularis* foi utilizada para determinar a concentração de cada amostra, de acordo com (NATHUES; HOLTHAUS; GROSSE BEILAGE, 2009; WATTANAPHANSAK et al., 2010).

4.6 Imunoperoxidase em monocamada celular (IPMA)

O teste de IPMA foi realizado conforme descrito por Guedes et al. (2002) . Brevemente, células McCoy foram infectadas com *L. intracellularis* e fixadas em placas de 96 poços com acetona. As placas foram hidratadas com água destilada por 10 minutos a 37°C. Amostras de soro foram adicionadas aos poços e as placas incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas e adicionado anticorpo anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase (Sigma, St Louis, MO, USA) diluído 1:600 em uma solução tampão (PBS com 2,5% de soro fetal bovino, 1% de soro suíno inativado e 0,008 de Tween 80) e incubado por 45 minutos a 37°C.

Uma solução de AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole; AEC; A-6926; Sigma) e peróxido de hidrogênio foi adicionada a cada poço e incubado à temperatura ambiente por 20 minutos para revelar a reação. A leitura das placas foi feita em microscópio de luz invertida e resultados positivos de são pela marcação em vermelho da bactéria no interior do citoplasma das células infectadas (Figura 8A) e resultados negativos pela ausência de marcação (Figura 8B).

A técnica de IPMA também foi usada para quantificar IgA de mucosa intestinal (lavado ileal), conforme descrito por (GUEDES; GEBHART, 2010). Brevemente, células McCoy foram infectadas com *L. intracellularis* e fixadas com acetona em placas de 96 poços. As placas

foram hidratadas em uma solução de PBS com 5% de leite desnatado por 10 minutos à 37°C para bloquear reações inespecíficas. Diluições seriadas na base 4 de 1:4 a 1:256 foram realizadas usando a mesma solução de PBS com 5% de leite desnatado. Em seguida, 50 µL de cada amostra diluída foi adicionada ao respectivo poço.

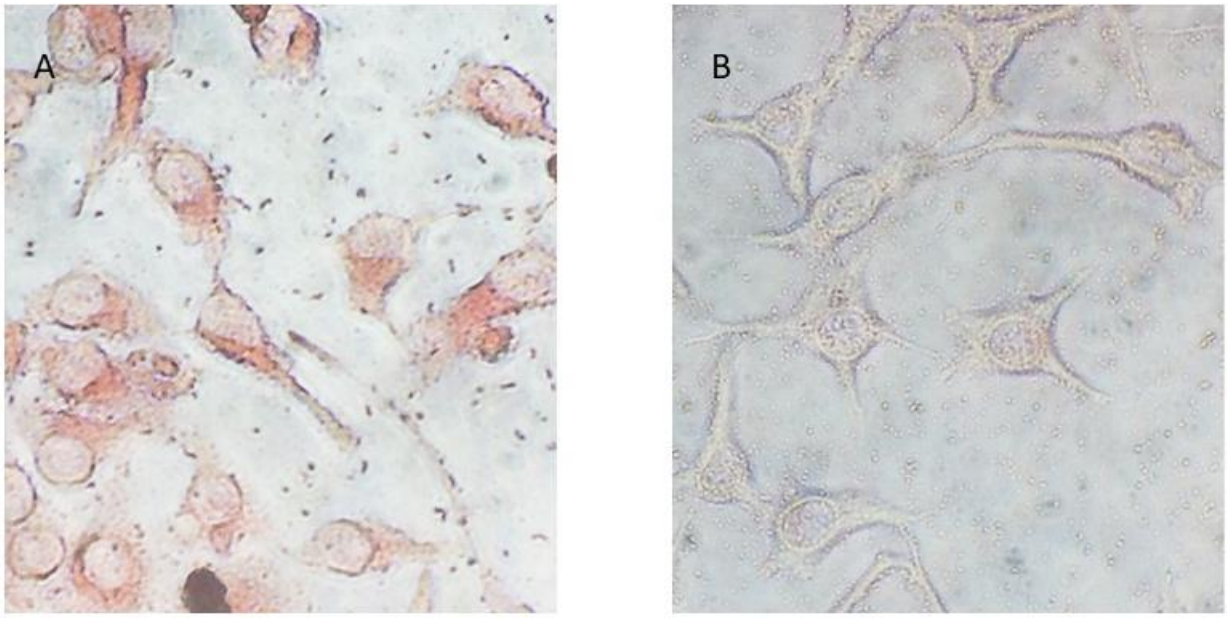


Figura 8. Fotomicrografia de placa de IPMA para *L. intracellularis* (Aumento de 40x). (A) Soro de suíno com marcação positiva para presença de anticorpos anti-*L. intracellularis.* (B) Soro de suíno com marcação negativa para presença de anticorpos anti-*L. intracellularis.*

As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C e então lavadas 5 vezes contendo 0,05% Tween 20 (PBST). Trinta microlitros de anticorpo caprino anti-IgA de suíno conjugado à imunoperoxidase (A100-102P-11: Bethyl Laboratories, Monterey, Texas, USA) e diluído 1:1000 em PBST, foi adicionado em cada poço e incubado por 45 minutos a 37°C. As placas foram lavadas 5 vezes com PBST e 100 µL da solução de AEC foi adicionada a cada poço e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. As placas foram lavadas com PBS por 3 vezes e, após secagem, observadas em microscópio de luz invertida, com leitura semelhante a realizada pela IPMA convencional (Figura 8).

4.7 Enzyme-linked immunospot (ELISPOT)

O teste de ELISPOT tem a capacidade de identificar respostas imunes celulares através da quantificação de linfócitos produtores de IFN-ϒ que respondem especificamente à antígenos, no caso antígenos de *L. intracellularis* (GUEDES; GEBHART, 2003a). Um volume de 50µL/poço contendo 333ng de anticorpo monoclonal anti-IFN-ϒ (Pharmagen) foi adicionado a cada poço de placas de 96 poços de polyvinylide fluoride (PVDF) (Millipore

MultiScreen™, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e incubado por 16 horas a 4°C. Em seguida, a reação foi bloqueada pela adição de 200 µL/poço de uma solução de PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA). As células mononucleares isoladas dos animais foram diluídas em meio RPMI 1640 até atingirem concentração de 500.000 células por poço em um volume de 50 µL. Dez microlitros contendo 10 µg/mL de proteína total obtidas a partir de células sonicadas de *L. intracellularis*, 10 µg/mL de Fitohemaglutinina (PHA) (controle positivo) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ou 10 µg de células McCoy sonicadas (controle negativo) foram adicionadas em cada poço. Em seguida as placas foram incubadas por 20 minutos a 36°C em atmosfera de 5% CO2. As placas foram lavadas 6 vezes com PBST e 100 µL de anticorpo suíno anti-IFN-ϒ (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) diluído 1:100 em PBS contendo 1% BSA foi adicionado a cada poço e incubado por 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente com PBST e 100 µL de estreptavidina com fosfatase alcalina diluída 1:100 foi adicionada aos poços por 2 horas à temperatura ambiente. Após 4 lavagens, 100 µL de cromógeno BCIP/NBT (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) foram adicionados a cada poço e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as placas as placas foram lavadas com água destilada e secas ao ar. As placas foram examinadas com auxílio de um microscópio estereoscópio. A resposta imune celular foi avaliada baseado no número de Linfócitos T corados positivamente. Os dados foram apresentados como número de linfócitos produtores de IFN-ϒ específicos para *L. intracellularis* para cada 10^6 de células mononucleares.

4.8 Análise estatística

Os resultados das avaliações de desempenho foram analisados usando o teste exato de Fisher e teste *post-hoc* de Tukey. O teste não paramétrico de Kuskal-Wallis foi utilizado para as avaliações clínicas, lesões macroscópicas e histopatológicas, eliminação de *L. intracellularis* no ambiente, comparação dos títulos de anticorpos e números de células produtoras de IFN-γ entre grupos. A análise dos escores de sinal clínico foi feita a partir da soma de cada avaliação diária por animal ao longo do período do experimento. A avaliação de dias com diarreia foi feita a partir a soma dos dias que cada animal teve grau 3. As análises de lesão macroscópica foram feitas com a soma dos ‘composite scores’ obtidos em intestino delgado e grosso e separadamente. As análises histopatológicas foram feitas com o somatório dos escores obtidos em intestino delgado e grosso e separadamente.

5. RESULTADOS

No início do experimento, ocorreu quadro de diarreia pós-desmame causado por *Escherichia coli* enterotoxigênica em alguns animais. Em função desse quadro clínico de diarreia, 4 animais, sendo 2 do grupo CONT, e 2 do grupo DES morreram. O surto aconteceu a partir do D29, por 4 dias, após o início do experimento. Posteriormente a inoculação, foi realizado exame bacteriológico do inóculo, com resultados negativos para *Salmonella* sp. e para *Escherichia coli* enterotoxigênica, descartando a possibilidade do inóculo ter sido a causa do surto da doença.

Quanto às avaliações clínicas de diarreia, realizadas diariamente durante o experimento, devido ao quadro clínico de diarreia associado a colibacilose, observada por 4 dias a partir do D29, entendemos que houve viés, particularmente no período entre 29-49, particularmente no grupo CONT (Figura 9).

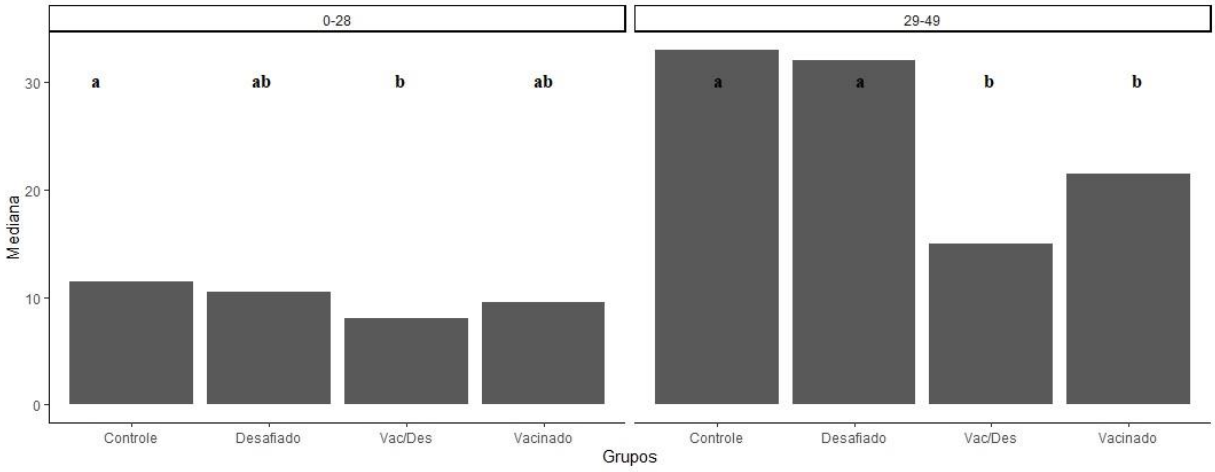


Figura 9. Mediana do escore de diarreia no período entre os dias 0-28 e 29-49 contados a partir do início do experimento. (0-28) Escore de diarreia total dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) no período entre os dias 0 e 28 após vacinação. (29-49) Escore de diarreia total dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) no período entre os dias 29 e 49 após vacinação.
*Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais.

5.1 Desempenho dos animais

Para avaliação do desempenho dos animais, os dados de consumo de ração (Tabela 5) e o peso de cada animal durante o período do experimento foram tabulados para o cálculo do ganho de peso diário (GPD) e da conversão alimentar (CA) (Tabela 6). Os dados foram agrupados em dois períodos: Antes da inoculação (0-28) e após a inoculação (29-49). No período do dia 0 ao dia 28, não foi observada diferença no ganho de peso diário e no consumo

de ração entre os grupos experimentais e para conversão alimentar foi observada diferença estatística entre o grupo VAC e DES.

Tabela 5. Consumo de ração, em gramas por dia, dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES).

GRUPO	CONSUMO 0-28	CONSUMO 29-49
CONT	2108,20 a	3802,28 a
VAC	2441,51 a	4017,20 a
DES	2323,39 a	2882,97 b
VAC/DES	2177,56 a	3907,32 a

*Teste exato de Fisher com post-hoc de Tukey. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais

No período do dia 28 ao dia 49, para ganho de peso diário e consumo de ração, foi observada redução significativa no grupo DES em relação aos demais grupos (Tabelas 5 e 6). Para conversão alimentar, o grupo DES diferiu, com pior resultado, apenas dos grupos CONT e VAC/DES (Tabela 6).

Tabela 6. Ganho de peso diário, em gramas, e conversão alimentar dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES), nos períodos dos dias 0-28 e 28-49 após a vacinação com Porcilis® Ileitis.

GRUPO	GPD 0-28	CA 0-28	GPD 29-49	CA 29-49
CONT	177,57±55,77 a	16,2±1,96 ab	430,54±126,52 a	6,77±0,76 a
VAC	156,25±63,20 a	20,0±1,97 a	387,14±214,03 a	7,90±0,94 a
DES	167,83±84,53 a	15,4±1,77 b	253,035±235,52 b	11,50±4,51 a
VAC/DES	175,46±65,30 a	16,6±1,81 ab	442,35±159,64 a	6,56±0,42 a

*Teste exato de Fisher com post-hoc de Tukey. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais

5.2 Achados anátomo-patológicos

À necropsia, no dia 49 do experimento, oito animais apresentaram lesões macroscópicas típicas da EPS no íleo. Destes animais, 7/8 (87,5%) eram do grupo DES e 1/8 (12,5%) do grupo VAC/DES, todos classificados com grau 1 de lesão à macroscopia. A extensão total de área com lesões macroscópicas (não ajustadas pela intensidade) somando todos os animais com alteração foi de 156 cm, sendo 149 cm (95,51%) em animais do grupo DES e 7 cm (4,49%) em um animal do grupo VAC/DES (Figura 10).

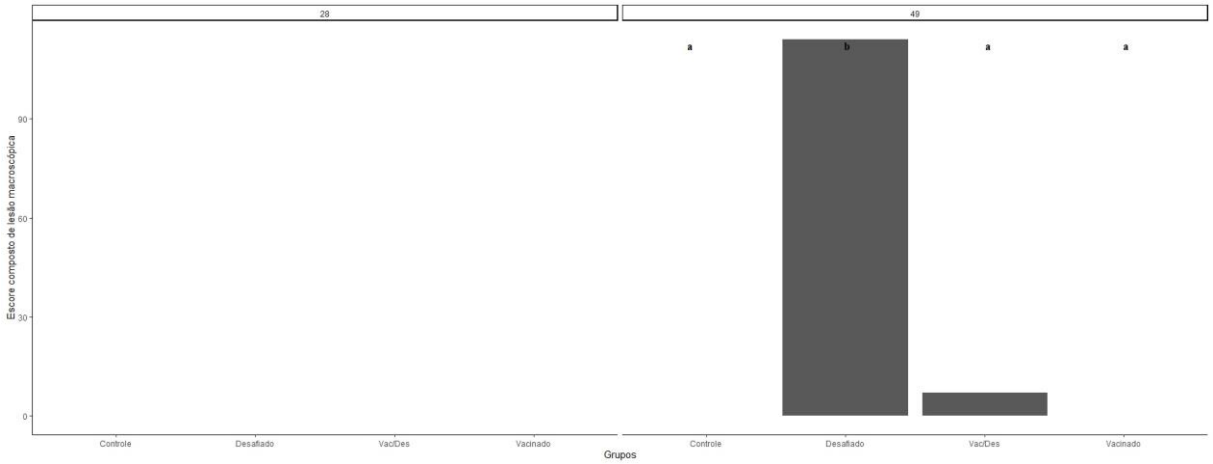


Figura 10. Escore de lesões macroscópicas de *L. intracellularis* dos grupos Controle, Vacinado, Desafiado e Vacinado/Desafiado (Vac/Des) nos dias 28 e 49 pós vacinado. Composite score de lesões macroscópicas. *Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais.

Para a avaliação histopatológica, foi observado apenas diferença entre os animais inoculados (VAC/DES e DES) e os não inoculados (VAC e CONT) como mostrado na Figura 11. O mesmo padrão pode ser observado para o teste de imuno-histoquímica para *L. intracellularis*, como mostrado na Figura 12.

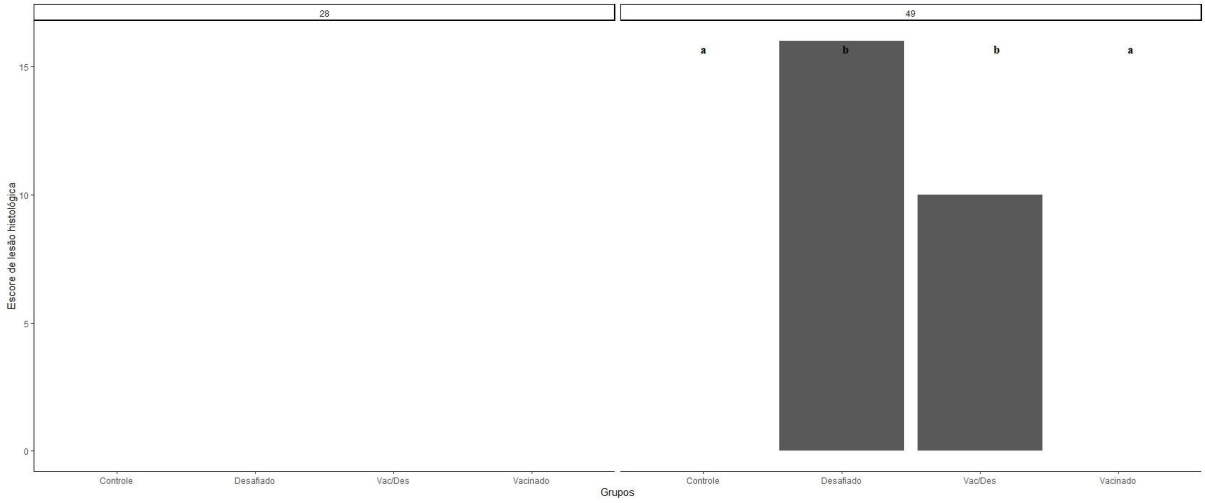


Figura 11. Escore de lesões histológicas de *L. intracellularis* dos grupos Controle, Vacinado, Desafiado e Vacinado/Desafiado (Vac/Des) nos dias 28 e 49 pós vacinado. Total dos escores de hiperplasia de cripta de intestino delgado e grosso na avaliação histopatológica.
*Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais.

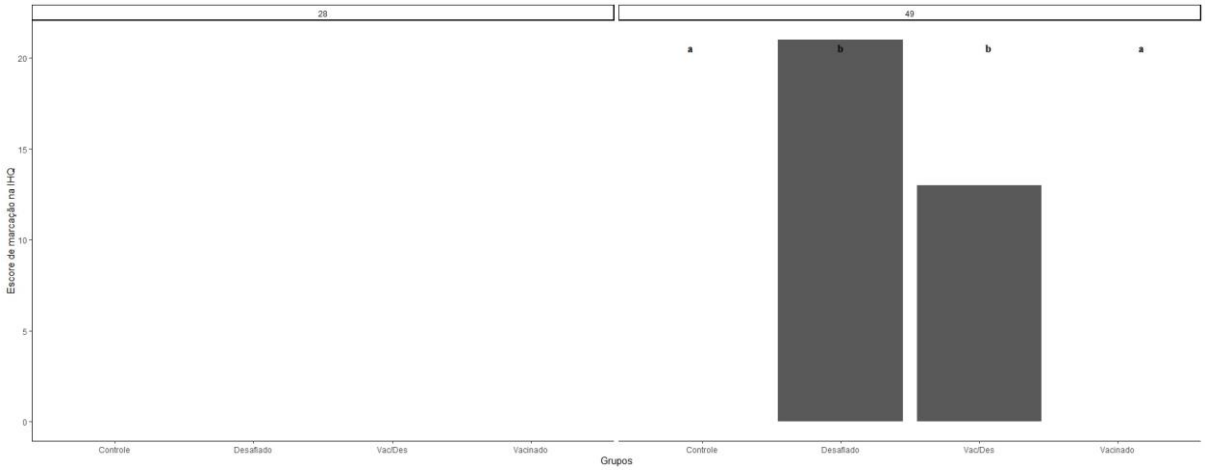


Figura 12. Escore de marcação para *L. intracellularis* na técnica de IHQ dos grupos Controle, Vacinado, Desafiado e Vacinado/Desafiado (Vac/Des) nos dias 28 e 49 pós vacinado. Total dos escores de marcação positiva na IHQ.
*Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais.

5.3 Eliminação de *L. intracellularis* nas fezes

Não houve detecção de *L. intracellularis* nas fezes coletadas nos dias 0 e 28 pós-vacinação de nenhum dos leitões nos quatro grupos experimentais (Figura 13). No dia 49 pós-vacinação foi detectada *L. intracellularis* nas fezes apenas nos grupos DES e VAC/DES (Figura 13), porém não foi observado diferença estatística entre esses dois grupos (Figura 13). Animais dos grupos CONT e VAC, em nenhum momento, eliminaram *L. intracellularis* nas fezes, confirmando ausência de contaminação cruzada entre grupos, validando o ensaio.

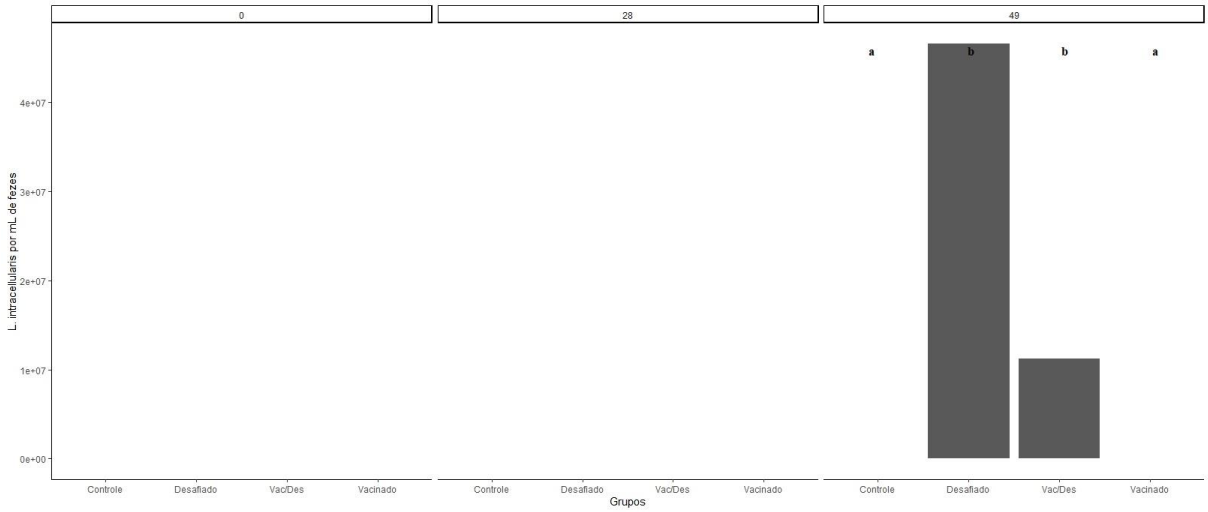


Figura 13. Quantificação por qPCR de *L. intracellularis* nas fezes dos animais dos grupos Controle, Vacinado, Desafiado e Vacinado/Desafiado (VAC/DES). Os dados são referentes aos dias 0, 28 e 49 após a vacinação e a quantidade é dada em Log_{10} microrganismos de *Lawsonia intracellularis* pela técnica de qPCR.
*Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais.

5.4 Produção de anticorpos específicos contra *L. intracellularis*

No dia 0, houve detecção de IgG específica para *L. intracellularis*, títulos baixos (1:30), em oito (11,1%) dos 72 animais estudados, sendo quatro (50%) animais do grupo CONT, dois (25%) animais do grupo VAC e dois (25%) do grupo DES (Figura 14).

A detecção de anticorpos induzidos pela vacinação já pode ser detectada a partir do dia 14 pós-vacinação (Figura 14), onde os animais dos grupos VAC e VAC/DES apresentaram títulos significativamente maiores que os animais dos grupos CONT e DES (Figura 15). O pico de detecção de anticorpos anti-*L. intracellularis* ocorreu no dia 28 pós-vacinação (Figura 15), com mediana de 480 para os grupos VAC e VAC/DES e de 0 para os grupos CONT e DES, seguindo mesmo padrão observado para o dia 14, onde os grupos VAC e VAC/DES apresentaram valores estatisticamente superiores aos grupos controle e desafiado, com medianas de 120 e 30 para os grupos VAC e VAC/DES, respectivamente, e de 0 para os grupos CONT e DES.

No dia 49 houve detecção de IgG específica para *L. intracellularis* em todos os animais dos grupos VAC e VAC/DES e em 4 animais do grupo DES (Figura 14). Todos os animais do grupo CONT foram soronegativos nessa data. Portanto, tanto para o dia 49 quanto para o dia 28 pós-vacinado, os animais dos grupos VAC e VAC/DES apresentaram valores estatisticamente superiores aos grupos CONT e DES (Figura 15). Animais do grupo DES apresentaram soropositividade apenas ao final do estudo (Figura 14), confirmando a infecção pelo agente após inoculação, validando o modelo experimental.

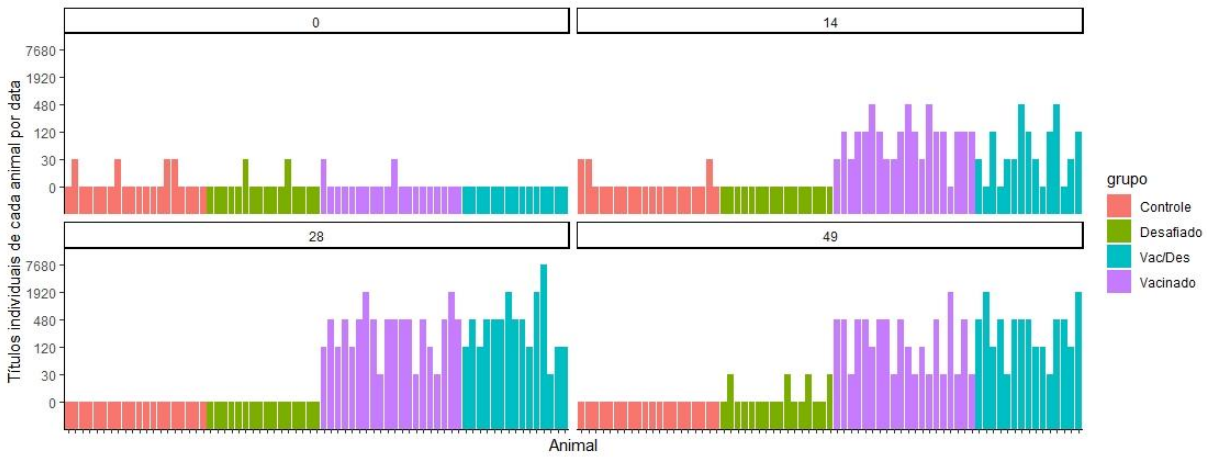


Figura 14. Títulos individuais de anticorpos anti-*L. intracellularis* dos animais dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) pela técnica de IPMA. (0) Título encontrado de IgG em soro no dia 0 pós vacinação. (14) Título encontrado de IgG em soro no dia 14 pós vacinação.

(28) Título encontrado de IgG em soro no dia 28 pós vacinação. (49) Título encontrados de IgG em soro no dia 49 pós vacinação.
*Kruskal-Wallis com ajuste pelo teste de Dunn. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais.

No dia 28, oito leitões, sendo quatro do grupo VAC e quatro do grupo CONT, foram aleatoriamente selecionados e submetidos a eutanásia para coleta do lavado intestinal e realização da IPMA para quantificar IgA de mucosa. Não foi detectado IgA nos lavados coletados nesta data em nenhum dos animais. No dia 49, o mesmo procedimento foi realizado para o restante dos animais. Foi detectado IgA em oito dos 16 animais do grupo VAC/DES (Figura 16). Não sendo observado resposta humoral local de mucosa detectável nos animais do grupo VAC nos dias 28 e 49 após a vacinação e nos animais do grupo DES no dia 49 pós-vacinado.

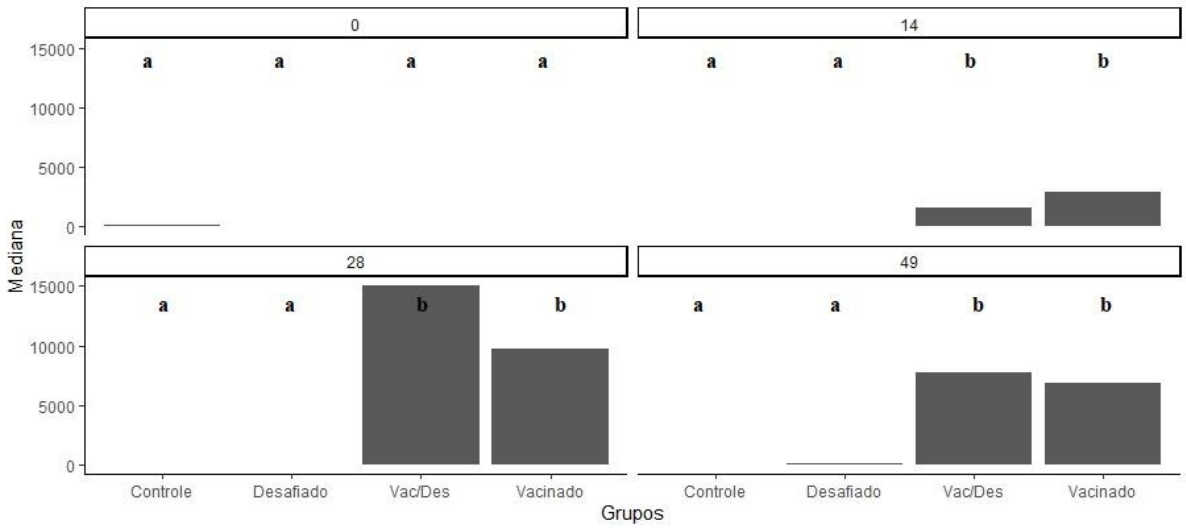


Figura 15. Mediana dos títulos de anticorpos anti-*L. intracellularis* dos animais dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES). (0) Título encontrado de IgG em soro no dia 0 pós vacinação. (14) Título encontrado de IgG em soro no dia 14 pós vacinação. (28) Título encontrado de IgG em soro no dia 28 pós vacinação. (49) Título encontrados de IgG em soro no dia 49 pós vacinação. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais.

5.1 Indução de resposta imune celular específica

Para detectar as células produtoras de IFN-γ que respondem especificamente para *L. intracellularis* foi coletado sangue total dos animais nos dias 0, 28 e 49, e testadas pela técnica de ELISPOT. Não foi observado diferença estatística para indução de resposta imune celular específica nos dias 0 e 28 pós-vacinação (Figura 17). No dia 49, foi observado diferença estatística entre os grupos CONT e VAC/DES, superior no grupo VAC/DES. Os grupos DES e VAC desenvolveram resposta celular específica no dia 49, porém não diferiram nem do grupo

CONT nem do grupo VAC/DES, ou seja, vacinação ou desafio, isoladamente, induziram resposta celular sistêmica específica para *L. intracellularis* intermediaria semelhante, que não diferiu estatisticamente dos dois outros grupos, enquanto o grupo VAC/DES (VAC/DES) apresentou resposta significativa frente ao desafio após a vacinação (Figura 17).

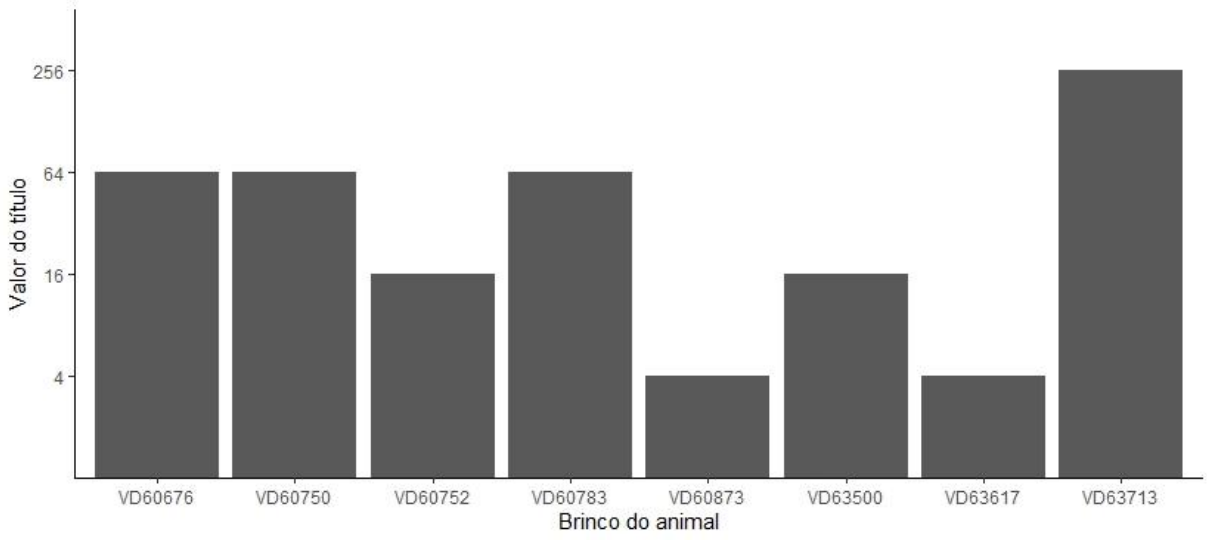


Figura 16. Título de anticorpos (IgA) em lavado ileal dos 8 animais positivos do grupo Vacinado e Desafiado (VAC/DES) no dia 49.

6. DISCUSSÃO

O resultado de ganho de peso diário (GPD) e consumo médio de ração no período entre os dias 28 e 49 indicam que o grupo DES obteve resultado inferior ao demais grupos, com ganho em média de 253,035 gramas por dia, bastante inferior ao GPD observado nos grupos CONT, VAC e VAC/DES, que obtiveram ganho médio diário de 430,54, 387,14 e 442,35 gramas, respectivamente. Animais do grupo VAC/DES tiveram GPD similar aos do grupo CONT, ou seja, animais vacinados e desafiados obtiveram ganho de peso semelhante aos animais não desafiados. Esse resultado corrobora os achados de Jacobs et al. (2019) , que realizaram o teste com a mesma vacina em condições de campo, e ambos os estudos demonstram a melhoria de desempenho mediante o uso da vacina em suínos desafiados.

O resultado da avaliação do escore clínico de diarreia indicou que no grupo DES o quadro clínico de diarreia foi mais intenso e por período mais prolongado em relação aos grupos VAC e VAC/DES, entretanto, ao comparar com o grupo CONT não houve diferença. Esse achado pode ser justificado, provavelmente, pelo surto de diarreia, sem correlação com enteropatia proliferativa suína, entre os dias 29 e 33 dias após o início do experimento, mais

severa nos animais do grupo controle. Os animais do grupo CONT não tiveram resultados positivos para *L. intracellularis* em nenhuma dos testes durante todo o período do experimento. Contudo, devido a essa intercorrência com o grupo CONT, os dados de escore clínico não foram utilizados na avaliação de proteção conferida pela vacina.

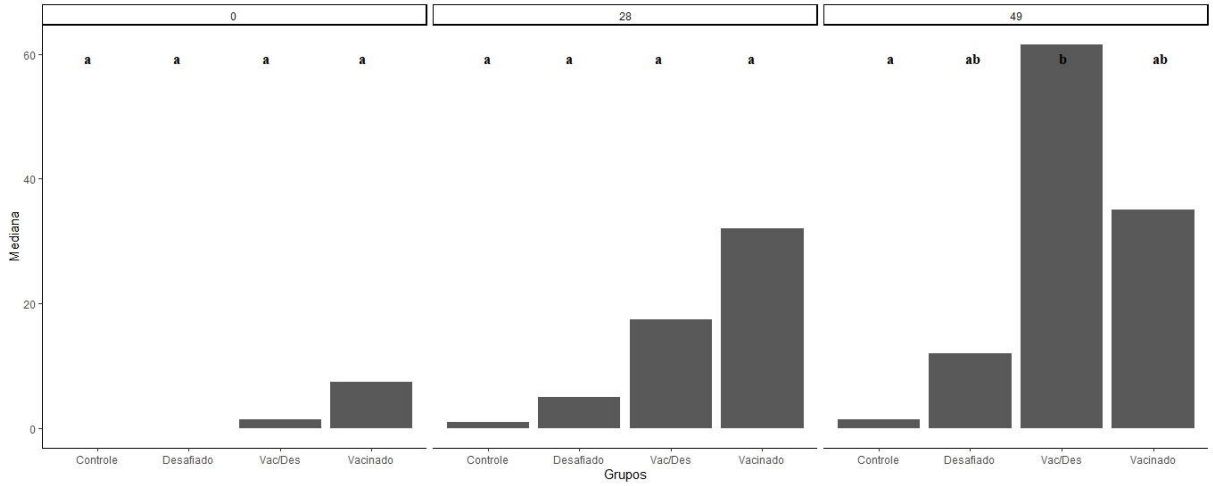


Figura 17. Detecção de resposta imune celular específica para *L. intracellularis* dos grupos Controle (CONT), Vacinado (VAC), Desafiado (DES) e Vacinado/Desafiado (VAC/DES) pela técnica de ELISPOT. Diferentes letras indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos experimentais. (0) Mediana da contagem de spots no dia 0 pós vacinação. (14) Mediana da contagem de spots no dia 14 pós vacinação. (28) Mediana da contagem de spots no dia 28 pós vacinação. (49) Mediana da contagem de spots no dia 49 pós vacinação.

Quanto a avaliação dos achados anátomo-patológicos, os animais do grupo VAC/DES apresentaram redução significativa de lesões intestinais e melhora no desempenho zootécnico, quando comparados aos animais do grupo DES. Importante salientar que as lesões macroscópicas observadas foram de grau I e características da forma subclínica de enteropatia proliferativa suína. Resultado semelhante foi documentado por Roerink e colaboradores (2018) , quanto a redução de lesões intestinais. Dessa forma, os animais vacinados com a Porcilis® Ileitis apresentaram menor distribuição e intensidade de lesões intestinais quando comparados com animais não vacinados. As lesões histológicas e o nível de infecção por *L. intracellularis* detectado na imuno-histoquímica não foram estatisticamente diferentes entre os grupos VAC/DES e DES, como previamente demonstrado por Roerink et al (2018); contudo, é importante considerar que para o presente estudo foram examinadas apenas uma secção de íleo e outra de ceco, e secções seriadas não foram realizadas. Assim, essas variáveis (lesões histológicas e marcações de infecção por imuno-histoquímica) apresentam aspecto pontual e restrito na avaliação do efeito vacinal. No trabalho de Roerink et al (2018) não são detalhados quantos segmentos e secções de intestino foram avaliados.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, a detecção de anticorpos específicos (IgG) para *L. intracellularis* induzidas pela Porcilis® Ileitis ocorreu nos animais dos grupos VAC e VAC/DES a partir do dia 14 após a vacinação, com seu pico aos 28 dias. Dessa forma, os animais vacinados com Porcilis® Ileitis apresentam resposta imune humoral em apenas duas semanas após a vacinação, mesmo que com títulos inferiores quando comparados às outras duas datas avaliadas posteriormente. O pico de soroconversão observado no dia 28 após a vacinação, indica que é nesta data que os animais apresentam a resposta humoral adaptativa expressiva e no seu ápice. Sendo este, o momento ideal para que os animais comecem a ter contato com o microrganismo presente no ambiente. Como não foi avaliado no presente estudo a duração desses níveis de anticorpos séricos, não é possível inferir sobre a melhor data de vacinação, mas apenas que resposta imune humoral sistêmica expressiva está presente quatro semanas após vacinação.

No dia 0 também pode ser observado a presença de anticorpos (IgG) em alguns animais dos grupos CONT, VAC e DES (Figura 14), porém a detecção de anticorpos nessa data é decorrente de imunidade passiva colostral, já que poucos animais apresentaram baixos títulos (1:30), e negativaram (particularmente os grupos CONT), a partir do dia 28 do experimento. Outro fato que corrobora essa interpretação é o resultado negativo na PCR em tempo real para *L. intracellularis* em ambas as datas. Outro aspecto importante é que a detecção desses anticorpos maternais pode ocorrer por até a quinta semana após o nascimento (GUEDES; GEBHART, 2003a), dessa forma os animais do experimento já estariam na fase de decaimento da imunidade passiva nos dias 0 e 14 pós-vacinação.

A detecção de IgA em lavado ileal só pode ser observada em 8 animais do grupo VAC/DES no dia 49 após a vacinação. A marcação de IgA no lavado ileal foi detectada somente em animais do grupo VAC/DES. Esse resultado pode indicar que, ou uma única dose da vacina não é suficiente para induzir uma resposta humoral de mucosa detectável nos animais e que apenas após o contato com *L. intracellularis* o organismo foi capaz de induzir resposta local suficiente para ser detectada, ou que a técnica de IPMA modificada não apresenta sensibilidade suficiente para detectar respostas de baixa intensidade. Resultados obtidos por Kroll et al. (2004) para a vacina viva atenuada indicaram também que a dose oral indicada pelo fabricante não foi o suficiente para induzir a resposta imune de mucosa nos níveis esperados.

Nogueira e colaboradores (2003), comparando a resposta imune humoral de mucosa induzida em animais vacinados com a vacina viva atenuada na dose recomentada pelo

fabricante ou usando 10 vezes a dose recomendada, observaram que animais vacinados com 10 vezes a dose recomendada antes do desafio, ainda assim apresentavam resultado abaixo do limite de detecção, somente sendo observado significância na detecção de IgA após o desafio. Esses achados indicam que mesmo com o aumento da dosagem da vacina viva atenuada, ela não foi eficiente em induzir a produção de IgA na mucosa intestinal antes do desafio. Vale ressaltar também que esse estudo mostrou que com o aumento da dosagem da vacina viva atenuada induziu aumento significativo das concentrações de anticorpos, IFNγ e IL-6 circulantes e diminuição significativa da eliminação da bactéria nas fezes.

Em relação à eliminação do agente nas fezes, no presente estudo, a vacina Porcilis® Ileitis não foi capaz de reduzir de forma significativa a eliminação de *L. intracellularis* nos animais vacinados e posteriormente desafiados. Esse resultado contrasta os resultados observados por Roerink e colaboradores (2018), no qual foi observado que a vacina Porcilis® Ileitis foi capaz de reduzir de forma significativa a colonização e a eliminação da bactéria após o desafio de animais vacinados. Porém, em estudos usando a vacina atenuada, foram observados resultados semelhantes ao do presente estudo, onde a vacina não foi capaz de reduzir a eliminação de *L. intracellularis* na dose indicada pelo fabricante (KROLL; ROOF; MCORIST, 2004; NOGUEIRA et al., 2013).

Levando em consideração a semelhança nos resultados citados anteriormente e dos obtidos nesse estudo quanto a indução de resposta imune humoral de mucosa e eliminação de *L. intracellularis* no ambiente utilizando a dose recomendada pelo fabricante, juntamente com o resultado obtido por Nogueira e colaboradores (2013) , onde a dosagem 10 vezes maior que a dose recomendada da vacina viva atenuada e resultados bem sucedidos, sobretudo para o resultado relativo a redução da eliminação de *L. intracellularis* no ambiente, pode ser sugerido a hipótese de que talvez seja necessária uma dose de reforço da vacina Porcilis® Ileitis para que haja indução de resposta imune humoral de mucosa detectável mais robusta e também para diminuir a eliminação do agente nas fezes, porém nenhum experimento com esse objetivo foi executado até o momento.

Estudos avaliando a indução de resposta imune mediada por célula (INF-γ) em animais vacinados com Porcilis® Ileitis ainda não foram publicados, sendo esse, o primeiro estudo. Foi observada diferença significativa no dia 49 após a vacinação entre os grupos VAC/DES e CONT. Associando este resultado de resposta mediada por célula e de produção de anticorpos, circulantes e de mucosa, os animais VAC/DES obtiveram resultados superiores comparados

aos animais apenas desafiados (DES), mostrando que suínos, se vacinados com Porcilis® Ileitis, quando infectados apresentam resposta imune circulante e de mucosa específicas para *L. intracellularis* significativamente mais robustas que animais não vacinados e infectados.

Outros estudos mostrando a indução de resposta mediada por células com atuação específica contra *L. intracellularis* a partir da contagem de células que secretam IFN-γ já foram realizados utilizando apenas a vacina viva atenuada (GUEDES e GEBHART, 2003a). No presente trabalho, a resposta mediada por célula só foi detectada aos 49 dias após a vacinação em todos os grupos com exceção ao grupo CONT. No trabalho realizado por Guedes e Gebhart (2003a) foi mostrado que a resposta imune mediada por células de animais vacinados ocorreu a partir de 35 dias após a vacinação, enquanto nos animais inoculados experimentalmente com *L. intracellularis* a resposta ocorreu a partir dos 14 dias após a infecção. Foi sugerido que esses resultados podem indicar efeito dose dependente ou dependente de algum fator presente na cepa virulenta e ausente na cepa vacinal, corroborando a hipótese de que uma segunda dose da vacina inativada seja capaz de induzir uma resposta mais robusta.

7. CONCLUSÃO

Os achados clínico-patológicos, resultados imuno-histoquímicos, sorológicos e de desempenho dos animais demonstraram que o modelo experimental foi bem-sucedido, desenvolvendo quadro típico de EPS. Com base principalmente nos resultados de avaliação de desempenho dos animais (GPD e consumo médio de ração), de lesões macroscópicas, indução de resposta humoral e celular específicas, a vacina Porcilis® Ileitis mostrou-se eficiente no controle da EPS com melhora significativa dos índices avaliados em animais vacinados e, posteriormente, desafiados quando comparados ao grupo não vacinado e desafiado. Outro ponto importante a ser citado é o fato deste trabalho ser o primeiro estudo com resultados de geração de resposta imune celular específica induzida pela vacinação com Porcilis® Ileitis em suínos infectados por *L. intracellularis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.; OLIVER DURAN, C.; BURCH, D. G. S. Antimicrobial resistance in swine production. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 02, p. 135–148, 2008.

ALEXOPOULOS, C. et al. First experience on the effect of in-feed lincomycin for the control of proliferative enteropathy in growing pigs. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 53, n. 3, p. 157–162, 2006.

BALDWIN, C. L.; TELFER, J. C. The bovine model for elucidating the role of γδ T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. **Molecular immunology**, v. 66, n. 1, p. 35–47, jul. 2015.

BANE, D. P. et al. Porcine proliferative enteropathy: a case-control study in swine herds in the United States. **Journal of Swine Health and Production**, v. 9, n. 4, p. 155–158, 2001.

BARCELLOS, D. E. S. N.; BOROWSKI, S. M.; ALMEIDA, M. N. Programas de Vacinação para diferentes sistemas de produção. In: XIII Congressso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES, 2007, Florianópolis, SC. Anais eletrônicos. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_e3n54p5.pdf . Acesso em: 28/01/23.

BARCELLOS, D. E. S. N. et al. Uso de Antimicrobianos. Em: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. (Eds.). **Doença dos Suínos**. 2. ed. Goiânia: Cânone Editorial, 2007. p. 837–884.

BIESTER H. E., S. L. H. Intestinal Adenoma in Swine. **American Journal of Pathology**, v. VII, p. 175–185, 1930.

BORBA, R. C. N.; VIDAL, V. M.; MOREIRA, L. O. The re-emergency and persistence of vaccine preventable diseases. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 2 Suppl, p. 1311–1322, ago. 2015.

BOUTRUP, T. S. et al. Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by Lawsonia intracellularis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2–3, p. 101–109, 2010.

CARON, L.; LOYOLA, W.; MORÉS, N. Vacinação na suinocultura. In: V Simpósio Brasil Sul de Suinocultura, 2012, Chapecó, SC. Anais eletrônicos. Disponível em: h https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/944890/1/final6863.pdf. Acesso em: 21/11/18.

COLLINS, A. Advances in Ileitis Control, Diagnosis, Epidemiology and the Economic Impacts of Disease in Commercial Pig Herds. **Agriculture**, v. 3, n. 3, p. 536–555, 2013.

COLLINS, A. M.; BARCHIA, I. M. The critical threshold of Lawsonia intracellularis in pig faeces that causes reduced average daily weight gains in experimentally challenged pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 2–4, p. 455–458, 2014.

COMPÊNDIO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS, SINDAN. Disponível em http://www.cpvs.com.br/cpvs/pesquisar.aspx

CORDES, H. et al. Cell-mediated and humoral immune responses in pigs following primary and challenge-exposure to Lawsonia intracellularis. **Veterinary research**, v. 43, n. 1, p. 9, 2012.

DEERING, R. P. et al. Nucleic acid vaccines: prospects for non-viral delivery of mRNA vaccines. **Expert opinion on drug delivery**, v. 11, n. 6, p. 885–899, jun. 2014.

DEMICHELI, V.; DEBALINI, M. G.; RIVETTI, A. Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 2009, n. 1, p. CD000977, jan. 2009.

DI PASQUALE, A. et al. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. **Vaccines**, v. 3, n. 2, p. 320–343, abr. 2015.

DOUCE, G. et al. Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. **Infection and immunity**, v. 65, n. 7, p. 2821–2828, jul. 1997.

DOUGAN, G. 1993 Colworth Prize Lecture. The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. **Microbiology (Reading, England)**, v. 140 (Pt 2, p. 215–224, fev. 1994.

FOURIE, K. R. et al. Evaluation of immunogenicity and protection mediated by Lawsonia intracellularis subunit vaccines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 237, 1 jul. 2021.

FRANÇA, S. A.; GUEDES, R. M. C. Antimicrobianos para o controle da enteropatia proliferativa suína. **Ciência Rural**, v. 38, n. 01, p. 288–296, 2008.

GABARDO, M. DE P. et al. Evaluation of the involvement of mice (Mus musculus) in the epidemiology of porcine proliferative enteropathy. **Veterinary microbiology**, v. 205, p. 75–79, jun. 2017.

GEBHART, C. J. et al. Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to Desulfovibrio species. **International journal of systematic bacteriology**, v. 43, n. 3, p. 533–8, 1993.

GERDTS, V. et al. Large animal models for vaccine development and testing. **ILAR Journal**, v. 56, n. 1, p. 53–62, 2015.

GIRARD, M. P. et al. A review of vaccine research and development: human enteric infections. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2732–2750, abr. 2006.

GRIFFIN, J. F. Veterinary tuberculosis vaccine development. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 30 Suppl 3, p. S223-8, jun. 2000.

GRIFFIN, J. F. T. A strategic approach to vaccine development: Animal models, monitoring vaccine efficacy, formulation and delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 6, p. 851–861, 2002.

GUEDES, R. M. C. et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 6, p. 528–530, 2002.

GUEDES, R. M. C. et al. Use of tylvalosin-medicated feed to control porcine proliferative enteropathy. **Veterinary Record**, v. 165, n. 12, p. 342–345, 2009.

GUEDES, R. M. C.; BROWN, C. C.; SEQUEIRA, J. L. Sistema Digestório. Em: SANTOS, R.; ALESSI, A. (Eds.). **Patologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 87–180.

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, n. 2–3, p. 135–145, 2003a.

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Preparation and Characterization of Polyclonal and Monoclonal Antibodies against *Lawsonia Intracellularis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 5, p. 438–446, 2003b.

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 Microbioogy**, v. 91, p. 135–145, 2003c.

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous Lawsonia intracellularis isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 159–166, maio 2003d.

GUEDES, R. M. C.; GEBHART, C. J. Evidence of cell-mediated immune response and specific local mucosal immunoglobulin (Ig) a production against Lawsonia intracellularis in experimentally infected swine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 2, p. 97–101, 2010.

HAJJ HUSSEIN, I. et al. Vaccines Through Centuries: Major Cornerstones of Global Health. **Frontiers in public health**, v. 3, p. 269, 2015.

HOLYOAKE, P. K. et al. Identifying obstacles to reducing the use of antibiotics to control porcine proliferative enteropathy. **Australian Veterinary Journal**, v. 87, n. 1–2, p. 33–34, 2009.

Introduction of inactivated poliovirus vaccine into oral poliovirus vaccine-using countries. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, v. 78, n. 28, p. 241–250, jul. 2003.

JACOBS, A. A. C. et al. Efficacy of a novel inactivated Lawsonia intracellularis vaccine in pigs against experimental infection and under field conditions. **Vaccine**, v. 37, n. 15, p. 2149–2157, 3 abr. 2019.

JACOBSON, M. et al. Survey on the occurrence of Brachyspira species and Lawsonia intracellularis in children living on pig farms. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 6, p. 1043–1045, 2007.

JENSEN, T. K. et al. **Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of Lawsonia intracellularis in natural porcine proliferative enteropathy**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284044848>.

JENSEN, T. K. et al. Detection of Lawsonia intracellularis in formalin-fixed porcine intestinal tissue samples: comparison of immunofluorescence and in-situ hybridization, and evaluation of the effects of controlled autolysis. **Journal of comparative pathology**, v. 142, n. 1, p. 1–8, jan. 2010.

KHAN, K. H. DNA vaccines: roles against diseases. **Germs**, v. 3, n. 1, p. 26–35, mar. 2013.

KROLL, J. J. et al. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by Lawsonia intracellularis. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 02, p. 173–197, 2005.

KROLL, J. J.; ROOF, M. B.; MCORIST, S. Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of Lawsonia intracellularis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 5, p. 559–565, 2004.

LARSEN, I. et al. A randomised clinical trial on the efficacy of oxytetracycline dose through water medication of nursery pigs on diarrhoea, faecal shedding of Lawsonia intracellularis and average daily weight gain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 123, p. 52–59, 2016.

LAWSON, G. H. K. et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: Cultivation and maintenance in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1136–1142, 1993.

LAWSON, G. H. K.; GEBHART, C. J. Proliferative Enteropathy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 2–3, p. 77–100, 1 fev. 2000.

LOVE, D. N.; LOVE, R. J. Pathology of proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. **Veterinary pathology**, v. 16, n. 1, p. 41–8, 1979.

LOVE, R. J.; LOVE, D. N.; EDWARDS, M. J. Proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. **Vet Rec**, v. 100, n. 4, p. 65–68, 1977.

LUNA, L. G. Routine Staining Procedures. Em: LUNA, L. G. (Ed.). **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Force Institute of Pathology**. 3. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill Book Company, 1968. p. 32–47.

MACINTYRE, N. et al. Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 4, p. 421–432, 2003.

MAIR, K. H. et al. The porcine innate immune system: an update. **Developmental and comparative immunology**, v. 45, n. 2, p. 321–343, ago. 2014.

MCGHEE, J. R.; KIYONO, H. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. **Infectious agents and disease**, v. 2, n. 2, p. 55–73, abr. 1993.

McORIST, S. et al. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of Ileal symbiont intracellularis. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4286–4292, 1993.

McORIST, S. et al. Characterization of Lawsonia intracellularis gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. **International journal of systematic bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 820–5, out. 1995.

McORIST, S. Obligate intracellular bacteria and antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 483–486, 2000.

McORIST, S. et al. Therapeutic efficacy of water-soluble lincomycin-spectinomycin powder against porcine proliferative enteropathy in a European field study. **Veterinary Record**, v. 146, n. 3, p. 61–65, 2000.

McORIST, S. ;; GEBHART, C. J. Proliferative Enteropathy . Em: ZIMMERMANN, J. J. , et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blakewell, 2011. p. 811–820.

MICHALSKI, C. W. et al. Human inflammatory bowel disease does not associate with Lawsonia intracellularis infection. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 1–7, 2006.

MOLONEY, P. J. THE PREPARATION AND TESTING OF DIPHTHERIA TOXOID (ANATOXINE-RAMON). **American journal of public health (New York, N.Y. : 1912)**, v. 16, n. 12, p. 1208–1210, dez. 1926.

MONTESINO, R. et al. Multi-antigenic recombinant subunit vaccine against Lawsonia intracellularis: The etiological agent of porcine proliferative enteropathy. **Vaccine**, v. 37, n. 10, p. 1340–1349, 28 fev. 2019.

MOSER, C. et al. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. **Expert review of vaccines**, v. 12, n. 7, p. 779–791, jul. 2013.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, abr. 1986.

NATHUES, H.; HOLTHAUS, K.; GROSSE BEILAGE, E. Quantification of Lawsonia intracellularis in porcine faeces by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 2009–2016, 2009.

NOGUEIRA, M. G. et al. Immunological responses to vaccination following experimental Lawsonia intracellularis virulent challenge in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 1–2, p. 131–138, 2013.

NOGUEIRA, M. G. et al. Effect of the route of administration on the mucosal and systemic immune responses to Lawsonia intracellularis vaccine in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 93, n. 4, p. 124–126, 2015.

OBRADOVIC, M. et al. Immunoproteomic analysis of Lawsonia intracellularis identifies candidate neutralizing antibody targets for use in subunit vaccine development. **Veterinary Microbiology**, v. 235, p. 270–279, 1 ago. 2019.

OBRADOVIC, M. R.; WILSON, H. L. Immune response and protection against Lawsonia intracellularis infections in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 219, 1 jan. 2020.

PARK, S. et al. Efficacy of a commercial live attenuated Lawsonia intracellularis vaccine in a large scale field trial in Korea. **Clinical and experimental vaccine research**, v. 2, n. 2, p. 135–139, 2013.

PARK, S.; WON, G.; LEE, J. H. An attenuated Salmonella vaccine secreting Lawsonia intracellularis immunogenic antigens confers dual protection against porcine proliferative

enteropathy and salmonellosis in a murine model. **Journal of Veterinary Science**, v. 20, n. 3, p. e24, 1 maio 2019.

PLOTKIN, S. History of vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12283–12287, ago. 2014.

POMMIER, P. et al. Comparison of Tylvalosin with Tylosin for the control of subclinical ileitis in swine. **Revue De Medecine Veterinaire**, v. 159, n. 11, p. 579–582, 2008.

PORTE, R. et al. Flagellin-mediated protection against intestinal Yersinia pseudotuberculosis infection does not require interleukin-22. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 2, 2017.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Immunological mechanisms of vaccination. **Nature immunology**, v. 12, n. 6, p. 509–517, jun. 2011.

PUSTERLA, N. et al. 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**, v. 186, n. 1, p. 110–112, 1 out. 2010.

Rabies vaccines. WHO position paper. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, v. 82, n. 49–50, p. 425–435, dez. 2007.

RAPPUOLI, R. et al. Vaccines, new opportunities for a new society. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12288–12293, ago. 2014.

RESENDE, T. P. et al. Serological profile, seroprevalence and risk factors related to Lawsonia intracellularis infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, 23 dez. 2015.

RIBER, U. et al. Vaccination of pigs with attenuated Lawsonia intracellularis induced acute phase protein responses and primed cell-mediated immunity without reduction in bacterial shedding after challenge. **Vaccine**, v. 33, n. 1, p. 156–162, 2015.

ROERINK, F. et al. A novel inactivated vaccine against Lawsonia intracellularis induces rapid induction of humoral immunity, reduction of bacterial shedding and provides robust gut barrier function. **Vaccine**, v. 36, n. 11, p. 1500–1508, 7 mar. 2018.

ROWLAND, A. C.; LAWSON, G. H. Intestinal adenomatosis in the pig: a possible relationship with a haemorrhagic enteropathy. **Research in veterinary science**, v. 18, n. 3, p. 263–8, maio 1975.

ROWLAND, A.; ROWNTREE, P. A haemorrhagic bowel syndrome associated with intestinal adenomatosis in the pig. **Veterinary Record**, v. 91, n. 10, p. 235–241, 2 set. 1972.

Rubella vaccines: WHO position paper. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, v. 86, n. 29, p. 301–316, jul. 2011.

SEDER, R. A.; HILL, A. V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 793–798, ago. 2000.

STEGE, H. et al. Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 50, n. 1–2, p. 153–164, 2001.

STILLS, H. F. Isolation of an intracellular bacterium from hamsters (Mesocricetus auratus) with proliferative ileitis and reproduction of the disease with a pure culture. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 3227–3236, 1991.

TAUBER, E.; DEWASTHALY, S. Japanese encephalitis vaccines--needs, flaws and achievements. **Biological chemistry**, v. 389, n. 5, p. 547–550, maio 2008.

Tetanus vaccine. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, v. 81, n. 20, p. 198–208, maio 2006.

THACKER, E. What you should know about vaccine adjuvants. Pig International, v. 34, p. 10-12, 2004.

VAN HOUT, J.; HEUVELINK, A.; GONGGRIJP, M. Monitoring of antimicrobial susceptibility of Streptococcus suis in the Netherlands, 2013–2015. **Veterinary Microbiology**, v. 194, n. 2015, p. 5–10, 2016.

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.

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

VETTER, V. et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. **Annals of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 110–120, 2018.

VIOTT, A. DE M. et al. Infection of sparrows (Passer domesticus) and different mice strains with lawsonia intracellularis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 372–378, 2013.

WAI, L. L. et al. Comparison of intracellular cytokine flow cytometry and an enzyme immunoassay for evaluation of cellular immune response to active tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 3, p. 344–351, 2009.

WALTER, D. et al. Treatment and control of porcine proliferative enteropathy using different tiamulin delivery methods. **Journal of Swine Health and Production**, v. 9, n. 3, p. 109–115, 2001.

WALTER, D. et al. **Serologic profiling and vaccination timing for Lawsonia intracellularisJournal of Swine Health and Production**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.aasv.org/shap.html.>.

WATTANAPHANSAK, S. et al. Development of a polymerase chain reaction assay for quantification of Lawsonia intracellularis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 4, p. 598–602, 2010.

WEN, Y.; SHI, Y. Alum: an old dog with new tricks. **Emerging microbes & infections**, v. 5, n. 3, p. e25, mar. 2016.

WINKELMAN, N. L. et al. Lincomycin-medicated feed for the control of porcine proliferative enteropathy (ileitis) in swine. **Journal of Swine Health and Production**, v. 10, n. 3, p. 107–111, 2002.

WORBOYS, M. Vaccines: conquering untreatable diseases. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 334 Suppl, p. s19, jan. 2007.

ZEPP, F. Principles of vaccine design-Lessons from nature. **Vaccine**, v. 28, n. SUPPL. 3, p. 14–24, 2010.