

Diagnóstico histoquímico e imunoistoquímico da enteropatia proliferativa (*Lawsonia intracellularis*) em suínos

[*Detection of swine proliferative enteropathy (Lawsonia intracellularis) in slaughtered pigs by histochemical and immunohistochemical techniques*]

G.S. Faccini¹, R.M.C. Guedes², C.A. Pescador¹, C.E.F. Cruz¹, D. Driemeier¹

¹ Escola de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Caixa Postal 15094. Avenida Bento Gonçalves, 9090
91540-000 – Porto Alegre, RS

² Escola de Veterinária - UFMG - Belo Horizonte, MG

RESUMO

Estudou-se a eficácia do diagnóstico macroscópico de lesões da enteropatia proliferativa suína (EPS) usando-se fragmentos de íleo de 663 suínos, coletados em abatedouros localizados em três municípios do Rio Grande do Sul. As amostras foram processadas por métodos histológicos rotineiros e coradas por uma técnica desenvolvida pela combinação das colorações Warthin-Starry, *alcian blue* e hematoxilina-eosina para detecção simultânea de *Lawsonia intracellularis* e lesões associadas com EPS. Lâminas suspeitas de EPS foram submetidas à técnica de imunoistoquímica, utilizando anticorpo policlonal anti-*Lawsonia intracellularis* na diluição de 1:15.000 pelo método avidina-biotina. A coloração combinada detectou 11 casos positivos, e a imunoistoquímica, nove casos adicionais. Entre as 643 amostras consideradas negativas, 12 apresentaram desaparecimento de células caliciformes e proliferação adenomatosa características de EPS, mas ausência de bactérias intracelulares. A eficiência do exame macroscópico para diagnóstico de EPS foi medida pela associação entre os resultados das avaliações macroscópicas e histológicas realizadas em 219 amostras. Embora 51 delas tenham sido consideradas macroscopicamente positivas, apenas quatro foram confirmadas pela presença de bactérias intracelulares associadas com lesões características de EPS. Não se observou associação entre as alterações macroscópicas e histológicas de EPS.

Palavras-chave: suíno, enteropatia proliferativa, diagnóstico histoquímico, imunoistoquímica, *Lawsonia intracellularis*

ABSTRACT

Fragments of terminal ileum were collected from 663 pigs at slaughter from three municipalities of the Rio Grande do Sul state, southern Brazil, to study the efficacy of the macroscopic diagnosis of porcine proliferative enteropathy (PPE). All samples were processed by standard histological methods and stained with a technique that combined Warthin-Starry, alcian blue and hematoxylin-eosin. Sections were simultaneously evaluated for the detection of Lawsonia intracellularis and lesions associated with PPE. Sections in which the occurrence of PPE was suspected were stained by the avidin-biotin immunoperoxidase technique using a polyclonal antiserum to Lawsonia intracellularis, at the dilution of 1:15,000. The histochemical method detected 11 positive sections and immunohistochemical staining detected additional nine positive cases. Twelve out of 643 negative samples had reduced number of goblet cells and adenomatous proliferation without any detectable bacteria. The efficiency of gross evaluation for detecting PPE was measured through the comparison between the results from gross and histological evaluations performed on samples from 219 animals. Although 51 of these samples were considered

Recebido para publicação em 15 de junho de 2004

Recebido para publicação, após modificações, em 15 de fevereiro de 2005

E-mail: davetpat@vortex.ufrgs.br

positive by gross evaluations, only four of them were confirmed as positive by detection of intracellular bacteria associated with characteristic lesions of PPE. The association between gross and histological changes often reported in PPE was not observed in this study.

Keywords: swine, proliferative enteropathy, histochemical diagnosis, immunohistochemical diagnosis, Lawsonia intracellularis

INTRODUÇÃO

Enteropatia proliferativa suína (EPS) é uma doença infecciosa entérica de suínos (McOrist e Gebhart, 1999), causada pela bactéria *Lawsonia intracellularis* (McOrist et al., 1995) que afeta também outras espécies animais (Cooper et al., 1997) e apresenta distribuição mundial (McOrist et al., 1994).

Em suínos, o complexo EPS apresenta-se sob várias formas (Rowland e Lawson, 1992) e inclui alterações descritas como adenomatose intestinal suína (Biester e Schwarte, 1931), enteropatia proliferativa hemorrágica (Rowland e Lawson, 1975), enterite necrótica (Rowland e Lawson, 1992) e ileíte regional (Alderton, 1993). A lesão comum em todas as formas da doença consiste em intensa hiperplasia dos enterócitos das criptas do íleo, jejuno, ceco ou cólon. A presença de bacilos curvos ou retos no citoplasma apical dos enterócitos das criptas proliferadas é característica constante (McOrist et al., 1992; McOrist, 1996).

A epidemiologia da EPS permanece pouco esclarecida devido à grande prevalência de casos subclínicos (McOrist, 1996). A extensão em que a prevalência de lesões ao abate pode refletir a doença em vida ou queda de produtividade é, em grande parte, desconhecida (Rowland e Lawson, 1992). Estudos de prevalência têm revelado 20 a 40% de granjas infectadas em alguns países (Winkelman, 1995; McOrist, 1997). Levantamentos em abatedouros têm demonstrado variações de prevalência entre 0,7 e 12% (Rowland e Hutchings, 1978; Winkelman, 1995; McOrist, 1997). A sensibilidade da inspeção ao abate pode ser baixa para detectar doenças cujas lesões se resolvam previamente (Stevenson, 1996). Devido à elevada taxa de renovação do epitélio intestinal (Pointon, 1989), animais afetados por EPS podem se recuperar sem apresentar lesões no momento do abate (Holyoake et al., 1994).

O diagnóstico de EPS foi inicialmente limitado à pesquisa de lesões macro e microscópicas características na mucosa intestinal (Jones et al., 1993). O primeiro método de detecção da *L. intracellularis* em cortes histológicos foi a coloração Warthin-Starry. A PCR é sensível e específica para *L. intracellularis*, podendo ser usada para monitorar rebanhos suínos (Jordan et al., 1996), e a imunistoquímica foi indicada como método diagnóstico de escolha em amostras fixadas em formol (Guedes et al., 2002c). Recentes estudos de soroprevalência têm demonstrado valor diagnóstico (Guedes et al., 2002b; Guedes et al., 2002a).

No Brasil, a enfermidade foi primeiramente descrita por Morés et al. (1985), estando sua ocorrência freqüentemente associada à presença de lesões macroscópicas sugestivas. No Rio Grande do Sul, Barcellos et al. (1992) descreveram as características clínico-epidemiopatológicas observadas em um surto de EPS. Os objetivos deste trabalho foram detectar o agente causal da EPS em suínos de terminação e avaliar a eficácia do exame macroscópico das lesões de EPS como método diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Selecionaram-se frigoríficos nos municípios de Passo Fundo, Santa Rosa e Estrela, onde foram coletadas, aleatoriamente, 663 amostras de porções terminais de íleos de suínos com idade aproximada de cinco meses, independentemente de sexo ou raça. Informações sobre as condições sanitárias prévias dos animais abatidos ou seus rebanhos de origem não foram coletadas. Cada amostra consistiu de um segmento de íleo com cerca de 5cm de comprimento, retirado aproximadamente a 5cm da válvula íleocecal. Em 219 amostras, verificaram-se lesões macroscópicas sugestivas de EPS, incluindo espessamento, rugosidade e hemorragia da parede, além de edema do mesentério. As amostras foram acondicionadas em embalagens

individuais, numeradas e classificadas como positivas ou negativas ao exame macroscópico.

Os fragmentos de íleo foram processados por métodos histológicos de rotina. Com o objetivo de avaliar a presença simultânea de bactérias intracelulares e lesões histológicas, foi desenvolvida por Driemeier et al. (2002) uma combinação de técnicas de coloração Warthin-Starry, *alcian blue* e hematoxilina-eosina. Adicionalmente, amostras normais e suspeitas de EPS foram submetidas à técnica de imunoistoquímica (Guedes et al., 2002c), utilizando-se um anticorpo policlonal anti-*L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003) na diluição de 1:15.000, pelo método da avidina-biotina.

O protocolo seguido para a imunoistoquímica incluiu: (1) bloqueio da atividade da peroxidase endógena pela incubação das lâminas em metanol com 3% de H₂O₂ por 15 minutos, (2) digestão prévia das lâminas em tripsina 0,1% por 15 minutos a 37°C, (3) irradiação em forno de microondas com as lâminas imersas em 100ml de tampão citrato pH 6, por 2 minutos, à potência máxima, atingindo 60°C, (4) redução de marcações inespecíficas pela incubação das lâminas em leite em pó desnatado 5% por 20 minutos, (5) aplicação do anticorpo primário policlonal anti-*L. intracellularis* durante 45 minutos a 37°C, (6) lavagem em solução PBS e (7) incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) por 40 minutos, em temperatura ambiente. A revelação da reação foi

obtida utilizando-se diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, e amostras positivas na coloração Warthin-Starry foram controles positivos. Neste exame, a presença de antígenos bacterianos de *L. intracellularis* foi demonstrada pela formação de aglomerados de coloração amarronzada, finamente granular no interior das vilosidades intestinais das criptas de Lieberkühn do intestino ou na lâmina própria da mucosa. Utilizou-se o teste de χ^2 para estudar a associação entre os exames macroscópicos e histológicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de bactérias, com morfologia semelhante à *L. intracellularis*, associada com alterações morfológicas compatíveis com enteropatia proliferativa suína, foi confirmada em 20 casos (Tab. 1). Observou-se a prevalência de 3% de animais positivos para EPS. Resultados aproximados foram observados anteriormente (McOrist, 1997) nos Estados Unidos, utilizando-se metodologia semelhante. Os animais estavam clinicamente normais e foram selecionados ao acaso, enquanto a maioria dos estudos foi direcionada para rebanhos e propriedades com suspeita clínica da doença (Socci et al., 1998; Veenhuizen et al., 1998), impossibilitando quaisquer comparações. No Brasil, foi detectada prevalência de 13,8% pela técnica da PCR em amostras de fezes de animais provenientes dos estados de São Paulo e Santa Catarina (Baccaro et al., 1998).

Tabela 1. Distribuição de amostras de íleo coletadas e resultados obtidos nos exames histoquímicos e imunoistoquímicos para o diagnóstico de enteropatia proliferativa

Município	Frigorífico	Amostras			
		Positivas (%)	HTQ positivas	IHQ positivas	Total (%)
Passo Fundo	A	152	5	4	9 (5,92)
	B	98	-	-	-
Santa Rosa	C	60	-	-	-
	D	105	-	-	-
Estrela	E	76	6	5	11 (14,47)
	F	172	-	-	-
Total	-	663	11	9	20 (3,02)

$\lambda^2=3,84$; P=0,147 (esperado <5). HTQ= histoquímica, IHQ= imunoistoquímica.

A presença de doenças clínicas não letais ou de doenças subclínicas, associadas com queda de produtividade, é regularmente monitorada, ao abate, em países como a Austrália (Pointon e Sloane, 1984), Estados Unidos (Pointon et al., 1996) e Inglaterra (Carlyle et al., 1996). O monitoramento ao abate propiciou a coleta e o exame de amostras de número considerável de animais provenientes de várias localidades, em período de tempo relativamente curto.

Dentre as 663 amostras avaliadas microscopicamente, 643 foram negativas, pois não apresentavam lesões características de EPS associadas com bactérias intracelulares. Das 20 amostras restantes, 12 apresentavam proliferação adenomatosa de criptas com ausência de bactéria intracelular. Em tais casos, as amostras podem não ter sido representativas. A baixa prevalência observada (3%) pode estar relacionada com o tempo do início dos sinais clínicos e/ou com a prévia resolução das lesões (Holyoake et al., 1994; McOrist e Gebhart, 1999). O exame imunohistoquímico foi aplicado somente em tecidos com lesões histológicas de EPS e foi mais sensível que a impregnação pela prata.

Alguns autores classificam as alterações histológicas de EPS conforme escores (Jones et al., 1993), entretanto, optou-se por fazer a descrição das lâminas devido à pequena quantidade de amostras positivas. Histologicamente, havia extensa proliferação do epitélio das criptas e encurtamento das vilosidades, acompanhada do desaparecimento das células caliciformes (Fig. 1).

As bactérias concentravam-se no ápice das células epiteliais e apresentavam-se dispostas paralelamente (Fig. 2). Quando em grande quantidade, formavam aglomerados cuja justaposição conferia à porção apical das células epiteliais coloração marrom-escura pela técnica combinada. Em algumas lâminas positivas, havia criptas com grande quantidade de bactérias e, em outras, ausência delas. Figuras de mitose foram freqüentes no epitélio de criptas infectadas. Na lâmina própria, foram observados neutrófilos, eosinófilos e macrófagos.

Em alguns cortes histológicos, foram observadas criptas com a luz extremamente reduzida, em razão do aumento das camadas de células epiteliais. Entretanto, outros apresentaram uma única camada de células achatadas, com luz de diâmetro bastante aumentado (Fig. 1), contendo restos de células epiteliais e células inflamatórias.

O quadro histológico foi semelhante aos descritos anteriormente (Rowland e Rowtree, 1972), e é característico de adenomatose intestinal (PIA), enquanto as outras formas da doença, enterite proliferativa hemorrágica (EPH) (Morés et al., 1985), ileíte regional (IR) (Jonsson e Martinsson, 1976) e enterite necrótica (EN) (Rowland e Hutchings, 1978) não foram encontradas. Este resultado confirma relatos prévios de que PIA é a forma mais encontrada e que IR e EN são achados ocasionais (McOrist et al., 1992). Embora EPH seja a segunda forma mais freqüente da doença (Dufresne, 1998), é raramente diagnosticada ao abate, pois apresenta caráter agudo e alta mortalidade.

A eficiência do exame macroscópico como método de diagnóstico para EPS foi mensurada comparando-se os resultados das avaliações macro e microscópicas de 219 amostras de íleo (Tab. 2). Pelo teste do qui-quadrado, não foi constatada associação entre os fatores analisados ($\chi^2 = 1,108$; $P > 0,05$).

Mais de 23% das amostras avaliadas macroscopicamente foram consideradas positivas para EPS. Esses segmentos apresentaram aparência reticular, diâmetro consideravelmente aumentado, parede com rigidez e, às vezes, associação com edema. Entretanto, apenas quatro (7,8%) amostras consideradas positivas macroscopicamente apresentaram lesões microscópicas associadas a bactérias intracelulares. As demais 47 (92,2%) amostras consideradas positivas no exame macroscópico resultaram negativas ao exame histológico. Portanto, embora a correlação entre os exames macroscópicos e histológicos seja freqüentemente citada (Jones et al., 1993; Holyoake et al., 1994; Guedes et al., 2002c), não foi observada neste estudo.

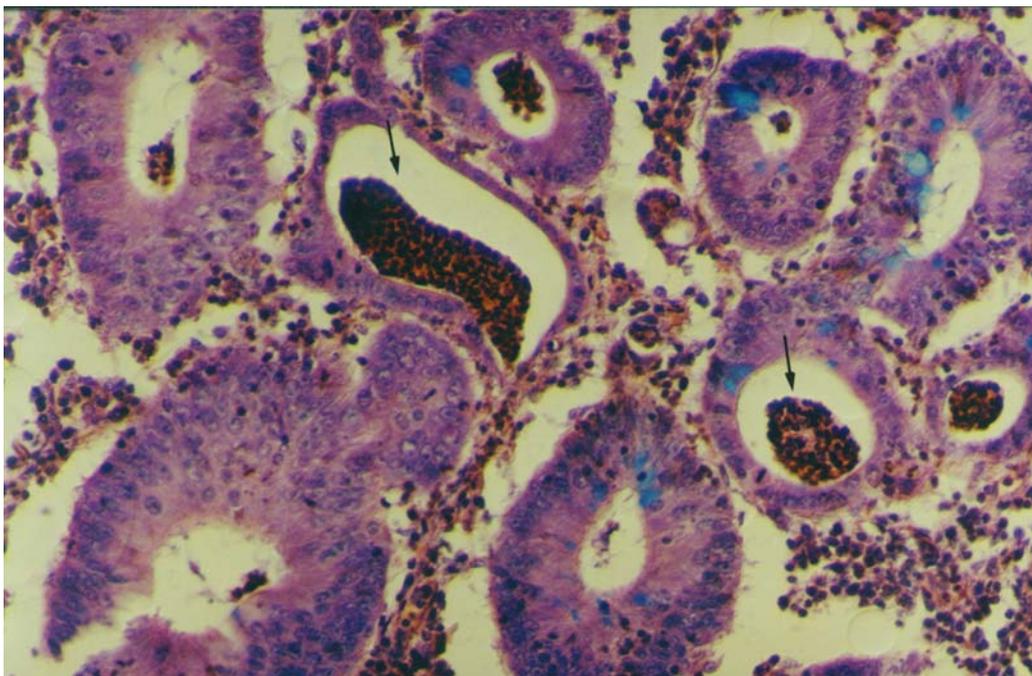


Figura 1. Micrografia de íleo com diminuição das células caliciformes (coradas em azul), proliferação do epitélio das criptas e formação de abscesso nas criptas. Coloração combinada, $\times 100$.

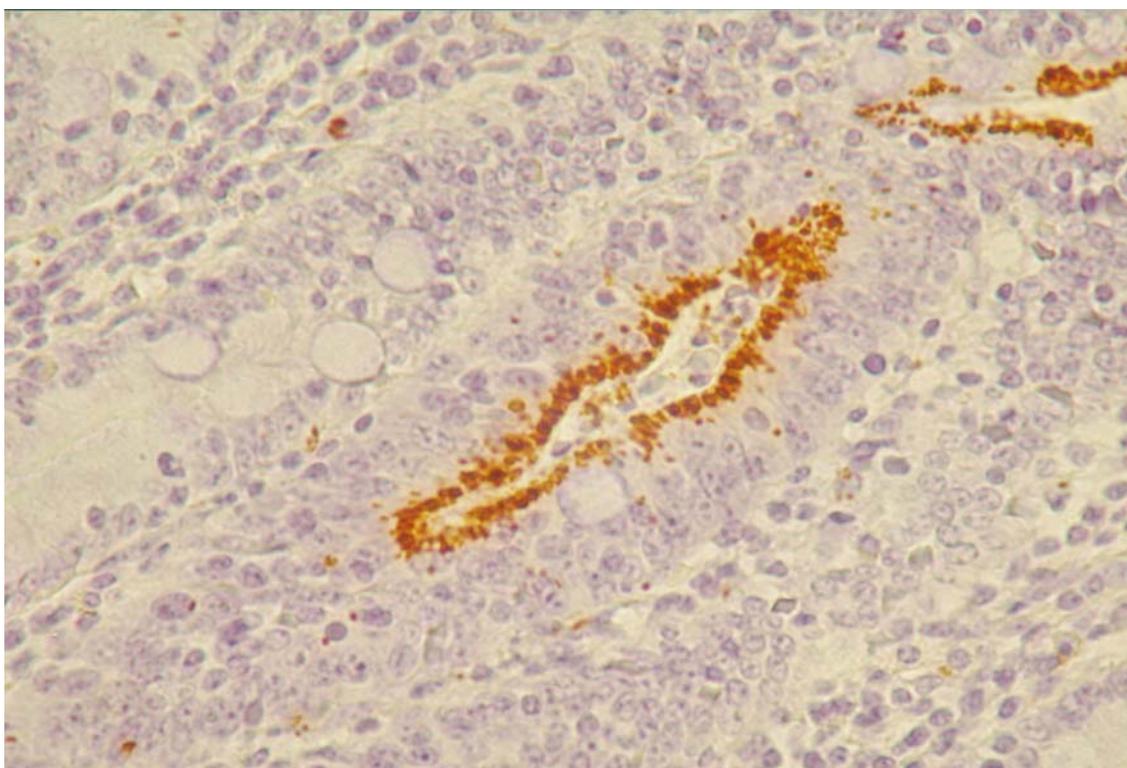


Figura 2. Intestino de suíno apresentando marcação anti-*Lawsonia intracellularis* no epitélio das criptas intestinais. Streptavidina-biotina, $\times 200$.

Tabela 2. Resultados das avaliações macroscópicas e histológicas para diagnóstico de enteropatia proliferativa suína em 219 amostras de fragmentos de íleo coletadas em abatedouros

Avaliação macroscópica	Número de amostras	Avaliação histológica		
		Bactérias	Proliferação	Bactérias + Proliferação
Positiva	51	6	10	4
Negativa	168	7	9	7
Total	219	13	19	11

A prevalência de EPS em animais de abate, estimada pela presença de lesões macroscópicas, poderia estar superestimada. Entre os fatores que poderiam influenciar a interpretação desses resultados citam-se: a variação de tamanho dos rebanhos, os tipos de cruzamento industrial, o uso de aditivos antibacterianos na ração, as diferenças anatômicas entre intestinos normais e os critérios técnicos da inspeção para a seleção de amostras, uma vez que, nos animais recém-mortos, o peristaltismo ainda existente pode ser confundido com espessamento de causa infecciosa (Holyoake et al., 1994).

O uso da técnica histoquímica adaptada permitiu a avaliação simultânea das bactérias intracelulares e das alterações morfológicas resultantes dessa infecção. O desaparecimento das células caliciformes facilitou a detecção das amostras positivas, pois a diminuição dessas células é uma característica de fácil identificação ao microscópio, mesmo em pequeno aumento. Estas células, quando presentes, coram-se de azul claro (Fig. 1), contrastando de forma evidente com a coloração homogênea dos cortes de intestino afetados por *L. intracellularis*. Essa técnica histoquímica, ao reunir três colorações em um único corte histológico, diminuiu tanto os custos por lâmina quanto o tempo para avaliação histológica (Driemeier et al., 2002). Os achados aqui descritos confirmam a presença do complexo enteropatia proliferativa em suínos de abate no Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERTON, M.R. Proliferative enteritis: endemic in Australian piggeries? *Aust. Vet. J.*, v.70, p.311, 1993.
- BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; COUTINHO, L.L. Porcine proliferative enteritis: histopathological aspects and diagnosis using polymerase chain reaction In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. *Proceedings...* Birmingham: IPVS, 1998. p.108.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; FALLAVENA, L.C.B.; JACOBI, H. et al. Enteropatia proliferativa hemorrágica como causa de diarreia em suínos, no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.20, p.21-33, 1992.
- BIESTER, H.E.; SCHWARTE, L.H. Intestinal adenoma in suine. *Am. J. Pathol.*, v.7, p.175-185, 1931.
- CARLYLE, W.W.H.; PENNY, R.H.C.; GUISE, H.J. Condemnation of pigs heads – an abattoir survey In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY CONGRESS, 14., 1996, Bologna. *Proceedings...* Bologna: IPVS, 1996. p.324.
- COOPER, D.M.; SWANSON, D.L.; BARNES, S.M. et al. Comparison of the 16s ribosomal DNA sequences from the intracellular agents of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. *J. Syst. Bacteriol.*, v.47, p.635-639, 1997.
- DRIEMEIER, D.; FACCINI, G.S.; OLIVEIRA, R.T. et al. Silver staining combined to alcian-blue and hematoxylin-eosin for detection of swine proliferative enteropathy. *Acta Histochem.*, v.104, p.285-287, 2002.
- DUFRESNE, L. Alimentary tract disorders of growing pig. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. *Proceedings...* Birmingham: IPVS, 1998. p.71-77.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.15, p.438-446, 2003.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; ARMBRUSTER, G.A. et al. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative enteropathy. *Can. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 258-263, 2002a.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; DEEN, J. et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.14, p.528-530, 2002b.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; WINKELMAN, N.L. et al. Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can. J. Vet. Res.*, v.66, p.99-107, 2002c.

- HOLYOAKE, P.K.; CUTLER, R.S.; CAPLE, I.W. A diagnostic dilemma: detecting proliferative enteritis in pigs at slaughter. *Aust. Vet. J.*, v.71, p.308-309, 1994.
- JONES, G.F.; DAVIES, P.R.; ROSE, R. et al. Comparison of techniques for diagnosis of proliferative enteritis of swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.1980-1985, 1993.
- JONSSON, L.; MARTINSSON, K. Regional ileitis in pigs. Morphological and pathogenetical aspects. *Acta Vet. Scand.*, v.17, p. 223-232, 1976.
- JORDAN, D.M.; KNITTEL, J.P.; HOFFMAN, L. *Detection of Lawsonia intracellularis in Iowa using polymerase chain reaction methodology*. Iowa: American Association of Swine Practice, 1996.
- McORIST, S. Enteric diseases: porcine proliferative enteropathies. *Pig J.*, v.39, p.74-76, 1997.
- McORIST, S. Enteropatia proliferativa del porcino-Ileitis. *Pigs*, p.8-9, 1996.
- McORIST, S.; GEBHART, C.J. Porcine proliferative enteropathies. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. et al. (Eds.). *Diseases of swine*. 8.ed. Ames: Iowa State University, 1999. p.521-534.
- McORIST, S.; GEBHART, C.J.; BROID, R. et al. Characterization of *Lawsonia intracellularis* ge. Nov., sp. Nov., the obligately intracellular bacterium of porcine enteropathy. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.45, p.820-825, 1995.
- McORIST, S.; GEBHART, C.J.; LAWSON, G.H.K. Polymerase chain reaction for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.*, v.41, p.205-212, 1994.
- McORIST, S.; McINTYRE, N.; STOKES, C.R. et al. Immunocytological responses in porcine proliferative enteropathies. *Infect. Immun.*, v.60, p.4184-4191, 1992.
- MORÉS, N.; NOGUEIRA, R.H.G.; NEVES, D.S. et al. Diagnóstico clínico e anátomo-histopatológico de casos espontâneos de enterite proliferante e hemorrágica dos suínos (EPH). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.37, p.29-37, 1985.
- POINTON, A.M. *Campylobacter* associated intestinal pathology in pigs. *Aust. Vet. J.*, v.66, p.90-91, 1989.
- POINTON, A.M.; MOORE, M.J.; DAVIES, P.R. Estimation of the sensitivity and specificity of gross lesions monitored at slaughter In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY CONGRESS, 14., 1996, Bologna. *Proceedings...* Bologna: IPVS, 1996. p.718.
- POINTON, A.M.; SLOANE, M. An abattoir survey of the prevalence of lesions of enzootic pneumonia of pigs in South Australia. *Aust. Vet. J.*, v.61, p.408-409, 1984.
- ROWLAND, A.C.; HUTCHINGS, D.A. Necrotic enteritis and regional ileitis in pigs at slaughter *Vet. Rec.*, v.103, p.338-339, 1978.
- ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K. Porcine intestinal adenomatosis: A possible relationship with necrotic enteritis, regional ileitis and proliferative hemorrhagic enteropathy. *Vet. Rec.*, v.6, p.178-180, 1975.
- ROWLAND, A.C.; LAWSON, G.H.K. Porcine proliferative enteropathies In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, S. et al. *Disease of swine*. 7.ed. Ames: Iowa State University, 1992. p.560-569.
- ROWLAND, A.C.; ROWTREE, P.G.M. A Hemorrhagic bowel syndrome associated with intestinal adenomatosis in the pig. *Vet. Rec.*, v.91, p.235-241, 1972.
- SOCCI, E.G.; RENTERIA, F.A.; OJEDA, Z.P. et al. Use of PCR to determine the pattern of shedding of *Lawsonia Intracellularis* in swine and the frequency of infected farms in Mexico In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. *Proceedings...* Birmingham: IPVS, 1998. p.121.
- VEENHUIZEN, M.F.; ELAM, T.E.; SOENKSEN, N. The potential economic impact of porcine proliferative enteropathy on the US swine industry In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. *Proceedings...* Birmingham: IPVS, 1998. p.66.
- WINKELMAN, N.L. "Ileitis" – Porcine proliferative enteritis In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7., 1995, Blumenau. *Anais...* Concórdia: ABRAVES, 1995. p.45-48.