

Saira Mabel Nara Neves

Avaliação das técnicas de isolamento, reação em cadeia da polimerase e hibridização fluorescente *in situ* para diagnóstico de *Brachyspira* sp. em suínos.

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de Patologia Veterinária, sob orientação do Prof^o Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2012

N513a Neves, Saira Mabel Nara, 1986-
Avaliação das técnicas de isolamento, reação em cadeia de polimerase e hibridização fluorescente *in situ* para diagnóstico de *Brachyspira* sp. em suínos / Saira Mabel Nara Neves. – 2012.
50 p. : il.

Orientador: Roberto Mauricio de Carvalho Guedes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Diarréia em animais – Teses.
3. Intestinos – Doenças – Teses. 4. Colite – Teses. I. Guedes, Roberto Mauricio de Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.408 96

Dissertação defendida e aprovada em 12 de abril de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes
Presidente



Prof. Aline de Marco Viott



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

Dedicado aos meus pais, Sara e Augusto.
*“Hay pota ko che tembiapo pende bo bya
porque koa pende bae avei”*

Agradecimentos

Ao Pai Celestial por me dar o privilégio de uma nova oportunidade de evolução, pela minha fé, pelo meu amigo protetor e por me proporcionar tudo que é mais importante na minha vida.

Agradeço aos meus pais, pelo amor incondicional, por serem exemplos para mim de honestidade, perseverança e caridade. É uma felicidade fazer parte da família que vocês construíram, farei sempre meu melhor para sentirem pelo menos um pouco do orgulho que sinto de vocês.

Ao João Helder, obrigada por ser meu amor e amigo. Seu carinho e companheirismo me mantém forte quando está ao meu lado.

Ao professor Roberto Guedes, pela orientação durante esse período. Obrigada por ajudar tornar meu sonho realidade. Fico imensamente honrada que alguém que admiro tanto, tenha contribuído para meu desenvolvimento profissional.

Vó Dionísia, obrigada pelas preces, que sempre chegaram como energia positiva até mim. Vô Nara, levarei sempre com dignidade seu nome. Aos familiares, obrigada pela torcida.

Aos amigos Ana Paula, Léo, Talys, Mari, Bruno, Camila, Raquel e Juh Magnino, mesmo longe não deixamos de estar próximos! Obrigada pela amizade e estímulos de “volta logo!”.

Às amigas de BH, Karine e Karen, obrigada pelos conselhos, conversas, “happy hours”, a amizade de vocês tornou tudo mais fácil por aqui!

Mi, serei eternamente grata pela sua participação em todas as etapas do experimento. Obrigada por ser a co-pilota, pelo chimarrão, pão de queijo, Luizinho... sua generosidade, empolgação e incentivos me ajudou muito a terminar o trabalho.

Agradeço ao CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro, e à EV-UFMG por me dar oportunidade de concluir a pós-graduação.

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	9
1.	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	AFECÇÕES ENTÉRICAS.....	11
2.2	PREVALÊNCIA.....	12
2.3	DISENTERIA SUÍNA.....	13
2.4	COLITE ESPIROQUETAL.....	15
2.5	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	17
2.6	TRANSMISSÃO.....	20
2.7	SUSCEPTIBILIDADE.....	21
2.8	PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	21
2.9	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	22
2.9.1	Isolamento.....	22
2.9.2	Microscopia.....	24
2.9.3	Métodos Sorológicos.....	24
2.9.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
2.9.5	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	LOCAL.....	28
3.2	AMOSTRAS.....	28
3.3	ISOLAMENTO.....	28
3.4	HISTOPATOLOGIA.....	29
3.5	HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i>	30
3.6	PCR DUPLEX.....	30
3.7	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	31
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	ISOLAMENTO.....	32
4.2	HISTOPATOLOGIA.....	34
4.3	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	35
4.4	HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i>	37
4.5	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	39
5	CONCLUSÕES	41
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Patogenicidade, nome das espécies e classificação por reação bioquímica de cepas de <i>Brachyspira</i> sp.	23
Tabela 2 -	Sondas marcadas com fluorocromo utilizadas para a hibridização fluorescente <i>in situ</i>	31
Tabela 3 -	Seqüência de <i>primers</i> e tamanho dos produtos utilizados para detecção de <i>B. hyodysenteriae</i> e <i>B. pilosicoli</i>	32
Tabela 4 -	Detecção de amostras positivas por método avaliado em cada espécie de <i>Brachyspira</i> patogênica.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	a) Mucosa de cólon de suíno acometido por Disenteria Suína. Nota-se a grande quantidade de muco, traços de sangue e focos de necrose superficial (seta). b) Fezes de suíno infectado com <i>B. pilosicoli</i> . Aspecto mucoso, acinzentado, semelhante a “cimento fresco”.....	16
Figura 2 -	a) Corte histológico de cólon de suíno acometido por Disenteria Suína. Notar a necrose superficial, acúmulo de exsudato catarral e intensa congestão da mucosa, H&E, 100x. b) Corte histológico de cólon de suíno acometido por Colite Espiroquetal. Presença de bactérias aderidas a mucosa intestinal, formando a lesão de “falso bordo em escova” (seta). H&E, 400x.....	35
Figura 3 -	Gel de agarose 1%, PCR duplex. kb, marcadores de pesos moleculares de 100pb; 1, controle positivo de <i>B. hyodysenteriae</i> (354pb); 2, controle positivo para <i>B. pilosicoli</i> (823pb); colunas 3,4,6,8,9,10,11,12, infecção por <i>B. hyodysenteriae</i> , coluna 13, infecção por <i>B. pilosicoli</i> , coluna 5 e 7 amostras negativas, coluna 14 controle negativo.....	36
Figura 4 -	a) Detecção específica de <i>B. hyodysenteriae</i> em suíno com Disenteria Suína, hibridizada com sonda específica marcada com Cy3. As bactérias são observadas entre as células da mucosa do cólon, 1000x (setas).....	38
Figura 5 -	Corte histológico de cólon de suíno com Colite Espiroquetal sob microscopia fluorescente, 400x. a) Filtro para fluorocromo FITC sem sinal detectável. b) Filtro para fluorocromo Cy3 e a visualização de sinal forte no lúmen de cripta e na superfície epitelial (setas).....	39
Figura 6 -	Fragmentos de cólon de suínos marcados (setas) por imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal produzido em coelho (cedido pelo Prof. David Barcellos da UFRGS). Nota-se a marcação em tecido de animal infectado com a) <i>B. pilosicoli</i> , 200x e b) Suíno infectado com <i>B. hyodysenteriae</i> , 400x.....	40

RESUMO

Disenteria Suína e Colite Espiroquetal são duas enfermidades importantes em suínos causados pela *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli*, respectivamente. Sendo assim, o diagnóstico eficaz dessas espécies são extremamente importantes para a adoção de estratégias adequadas para o controle. Propõe-se avaliar a eficiência das técnicas de isolamento, PCR, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e imuno-histoquímica (IHQ), para diagnóstico das *B. hyodysenteriae* e da *B. pilosicoli*. Foram coletadas 39 amostras de campo de suínos positivos para essas espécies de *Brachyspira* sp. em pelo menos um dos testes submetidos. Os resultados do número de amostras positivas em cada teste foram avaliadas de forma comparativa pelo método estatístico de McNemar, com $p < 0,05$. De 39 amostras analisadas, foram obtidos três isolamentos bem sucedidos (7,69%), detectadas 28 (71,7%) amostras positivas na PCR e no FISH e 32 (82,0%) na IHQ. O isolamento obteve a menor taxa de positividade, sendo significativamente inferior as outras técnicas, enquanto os resultados de FISH, IHQ e PCR não diferiram entre si. Baseado em sua praticidade, rapidez e associação com lesões histológicas, o FISH demonstrou ser mais uma alternativa no diagnóstico de *Brachyspira* sp.

Palavras-Chave: espiroquetas patogênicas, diagnóstico molecular *in situ*, Disenteria Suína, Colite Espiroquetal.

ABSTRACT

Growing and finishing pigs are affected by pathogenic spirochetes of the genus Brachyspira sp., which cause a significant economic impact due to direct and indirect losses. Thus, efficient diagnosis of these species enables better technical intervention to prevent or treat diseases. This study aimed to evaluate the efficiency of isolation, PCR, FISH and IHC for the diagnosis of B. hyodysenteriae and B. pilosicoli. Thirty-nine samples were collected from pigs positive for this species in at least one test. The number of positives in each assay was evaluated in a comparative form, using the McNemar statistical method, with $p < 0.05$. Out of the 39 analyzed samples, three (7.69%) were positive by isolation, 28 (71.7%) by PCR and FISH and 32 (82.0%) by IHC. The bacterial isolation had the lowest rate of detection, statistically inferior to the other tests. Based on the practicality, speed and association with histologic lesions, FISH has become a diagnostic alternative for Brachyspira sp..

keywords: pathogenic spirochaetes, in situ molecular diagnostics, Swine Dysentery, Spirochaetal diarrhea

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da suinocultura brasileira, nos últimos anos, tem se apoiado no desenvolvimento de fatores imprescindíveis como, a melhoria da genética, nutrição, manejo, bem-estar e principalmente sanidade animal. É

fundamental para a comercialização desses animais, que o setor receba serviço de qualidade com precisão e agilidade no que se refere aos diagnósticos de agentes infecciosos. Para garantir que as ações terapêuticas e preventivas sejam direcionadas e eficazes, é importante que haja a

identificação acurada do agente causador da doença.

As fases de recria e terminação no sistema de produção de cevados são consideradas críticas, pois devido à proximidade do abate, o animal possui maior valor agregado. Por isso, quando os animais são afetados por alguma doença nessas fases, é maior o prejuízo ao produtor, relacionados às despesas com tratamentos, elevação do custo de produção devido ao aumento da conversão alimentar, desuniformidade entre lotes e também pelo aumento da taxa de mortalidade no rebanho (Zlotowski et al., 2008). Animais na fase de crescimento e terminação podem ser afetados por afecções entéricas caracterizadas, principalmente, pelas diarreias (Guedes, 2010). Dentre os agentes etiológicos causadores de diarreias nas fases finais de criação de suínos, estão as bactérias do gênero *Brachyspira* sp., a qual possui sabidamente duas espécies patogênicas que causam a “Colite Espiroquetal” e a “Disenteria Suína” (Hampson e Trott, 2006; Harris et al, 2006).

Para o diagnóstico dessas doenças, é considerado como padrão ouro o isolamento em meio sólido (Kennedy et al., 1988; Fellstrom et al., 2001b). No entanto, essa bactéria por ser de crescimento fastidioso e dependente do tempo de chegada e condição térmica da amostra para análise, já que as bactérias precisam estar viáveis para o cultivo, havendo a possibilidade, portanto, de resultados equivocados. Além disso, é possível que haja problemas entéricos com infecção por

mais de um patógeno (La et al., 2009; Guedes, 2010), demonstrando a importância de se obter um diagnóstico correto. Assim, para assegurar a sanidade animal, há uma necessidade cada vez maior de desenvolver e implantar novas técnicas de diagnósticos mais precisos, rápidos e de custos acessíveis.

Além do cultivo bacteriano, foram desenvolvidos testes moleculares, como o PCR, que são capazes de identificar de forma altamente específica as *Brachyspira* sp.. Esses testes foram desenvolvidos principalmente para agilizar o processo diagnóstico e diminuir a necessidade de equipamentos especiais para o cultivo. Quando foram aplicados em fezes, a PCR demonstrou sensibilidade e especificidade superiores ao isolamento, e foi largamente implantada nos laboratórios de diagnósticos (Atyeo et al., 1998; La et al., 2003).

Aumentar a sensibilidade de detecção de patógenos, principalmente aqueles considerados fastidiosos para o cultivo, requer o desenvolvimento de técnicas que atendam aos requisitos praticidade, agilidade, sensibilidade e especificidade. A Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) é uma técnica molecular realizada em cortes histológicos, que combina a precisão da genética molecular com a informação visual do microscópio ótico (Moter e Gobel, 2000; Ploeg, 2000; Amann e Fuchs, 2008). Portanto, a FISH é uma técnica promissora para implantar na rotina

de laboratórios de diagnóstico de enfermidades suínas.

Sendo assim, propõe-se neste estudo implantar a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) para detecção das diferentes espécies de *Brachyspira* sp. em fragmentos histopatológicos de intestino grosso de suínos e compará-la ao isolamento, PCR duplex e imunohistoquímica para o diagnóstico de *Brachyspira* sp..

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Afecções entéricas

Os suínos em fase de crescimento e terminação podem ser afetados por diversas doenças, entre elas, as respiratórias e entéricas. Ambas afecções prejudicam o desempenho do animal. Em condições normais, uma boa conversão alimentar com elevado ganho de peso diário, uniformidade dentre os lotes e obtenção do peso de abate na idade programada são esperados (Guedes, 2010). A fase final de criação de suínos concentra 2/3 dos custos totais com alimentação destacando-se, portanto, a importância de controlar doenças que diminuam a eficiência produtiva, para que a suinocultura permaneça viável ao produtor (Duhammel, 2005).

As doenças entéricas são freqüentemente encontradas no sistema de produção atual e são caracterizadas principalmente pela diarreia. Esse

quadro gera perdas econômicas significativas para o setor, pois, além das manifestações clínicas, há despesas diretas com medicamentos e serviços técnicos especializados. Além disto, estas enfermidades podem apresentar-se de forma sub-clínica e diminuir a eficiência na conversão alimentar, sem ser notada pelo produtor (Zlotowski et al., 2008).

A diarreia é uma condição patológica caracterizada pelo excesso de água nas fezes em proporção à matéria seca, e presença de eventuais traços de gordura, muco, fibrina ou coágulos sanguíneos, dependendo das diferentes alterações da mucosa. Pode estar relacionada a enterites ou a disfunções entéricas, e em ambos os casos ocorre perdas de fluidos com consequente desidratação, depleção de eletrólitos e desequilíbrio ácido-básico podendo ser fatal se não tratada adequadamente (Liebler-Tenorio et al., 2006). Os mecanismos da diarreia em suínos na fase de recria e terminação são, principalmente, a má absorção intestinal e efusão, com saída de líquidos em casos de inflamação da lâmina própria, havendo aumento da permeabilidade vascular, edema e perdas de proteínas plasmáticas. São observadas efusões de fluídos a partir de tecidos e sangue, identificados como fibrina e hemorragia na luz intestinal. Muitas vezes, esses mecanismos ocorrem em conjunto, quando há necrose severa do epitélio da mucosa e dano vascular (Zlotowski et al., 2008).

Os principais agentes infecciosos causadores de diarreias nas fases de crescimento e terminação, encontrados na indústria suinícola atual, são *Brachyspira* sp., *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e o Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2) (Muller et al., 1998; Liebler-Tenorio et al., 2006, Zlotowski et al., 2008, Guedes, 2010). Menin et al. (2008) em um estudo no estado de Santa Catarina, confirmaram a prevalência desses patógenos, sendo encontrados isoladamente, mas a coinfeção de dois ou três desses agentes foi mais freqüente.

O gênero *Brachyspira* possui sete espécies reconhecidas sendo elas a *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, *B. alvinipulli* e *B. aalborgi*. Com exceção das duas últimas, as demais são encontradas no intestino grosso de suínos, e em sua maioria sem causarem doença (Stanton, 2006). Recentemente, Rasback et al. (2007) na Suécia, isolaram uma cepa patogênica de suínos que diferia das análises moleculares de todas as outras espécies já relatadas e sugeriram uma nova espécie para o gênero, a *B. suanatina*. O quadro clínico anatomopatológico e características de crescimento *in vitro* desta nova espécie de *Brachyspira* sp. são idênticas as da *B. hyodysenteriae* (Jansson et al., 2009).

As bactérias do gênero *Brachyspira* consideradas patogênicas, a *B. hyodysenteriae* e a *B. pilosicoli*, são agentes que afetam rebanhos nas

fases finais de criação, apresentando morbidade de 37% e 90%, respectivamente, e mortalidade, nos casos de Disenteria Suína de até 30% (Hampson e Trott, 2006; Harris et al., 2006; Stanton, 2006). Ambas as *Brachyspira* sp. patogênicas quando inoculadas oralmente, mostraram-se capazes de colonizar o intestino grosso e causarem diarreia e colite em leitões convencionais, livres de outros enteropatógenos. Isso demonstra que são hábeis em estabelecer uma infecção e provocar os sintomas na ausência de outros patógenos entéricos, sendo consideradas agentes exclusivos das doenças Colite Espiroquetal e da Disenteria Suína (Glock et al., 1974; Thomson et al., 1997).

2.2. Prevalência

A *B. hyodysenteriae* e a *B. pilosicoli* foram encontradas em diversos países produtores de suínos, demonstrando sua ampla distribuição e importância no cenário da sanidade mundial (Muniappa et al., 1997; Boye et al., 1998 Thomson et al., 1998; Calderaro et al., 2001). Esses agentes são descritos, principalmente no final da creche início de crescimento, porém o uso rotineiro de medicamentos no controle de doenças respiratórias nesta fase previnem também a expressão da Disenteria Suína e Colite Espiroquetal. No Brasil, além do uso de medicação no mesmo período descrito acima, a retirada destas drogas dos cevados para evitar resíduos na carcaça favorecem o aparecimento destas enfermidades nas fases finais de produção (Hampson et al., 1997).

No Brasil, Barcellos et al. (2000) avaliaram a presença de *Brachyspira* patogênicas em granjas com histórico de diarreia no Rio Grande do Sul, e encontraram uma prevalência de 35,3% para *B. hyodysenteriae* e de 41,2% para *B. pilosicoli*. Em outro estudo realizado no mesmo estado, avaliando a relação do uso de antimicrobianos na ração com prevalência das *Brachyspira* patogênicas, os autores observaram que a *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* foram detectadas respectivamente em 0% e 6,25% das granjas medicadas e 31,8% e 45,5% das granjas não medicadas (Barcellos et al., 2003). Esses valores demonstram a interferência do uso de antibióticos na ração para a detecção dessas espiroquetas.

Em amplo estudo avaliando as principais regiões produtoras de suínos no Brasil, utilizando a técnica de PCR multiplex para vários agentes de diarreias em suínos de crescimento e terminação, Baccaro et al. (2003) detectaram que a *B. pilosicoli* estava presente em 1% do rebanho e a *B. hyodysenteriae* em 1,4% como agentes únicos da doença. Porém, a *B. pilosicoli* foi encontrada em 3% quando em coinfeção com a *L. intracellularis*.

No estado de Santa Catarina avaliando os rebanhos de terminação, foram encontradas prevalências de 6% para a *B. hyodysenteriae* e de 8,8% para a *B. pilosicoli* como agentes únicos da diarreia. Porém, essa prevalência aumenta para 6,7%, quando há associação entre *B. pilosicoli*, *L.*

intracellularis e *E. coli* e 11,1% para os agentes *B. pilosicoli* e *E. coli* (Menin et al., 2008).

Em 2010, Viott realizou um estudo de prevalência no estado de Minas Gerais, utilizando-se da técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a *Brachyspira* sp. em rebanhos com histórico de diarreia. Detectou-se que somente dois rebanhos dos 46 analisados foram positivos para a *B. pilosicoli*, não sendo encontrado nenhum rebanho avaliado positivo para *B. hyodysenteriae*.

No entanto, esses valores até o momento estudados, podem estar subestimando a real prevalência desses patógenos nos rebanhos avaliados. Vários fatores são considerados potenciais interferências nos resultados obtidos, como a administração de antibióticos durante a amostragem, a idade dos animais avaliados, a presença de animais diarreicos, a composição da dieta fornecida, a resposta imune do hospedeiro (Thomsom et al., 1997; Fellstrom et al., 2001b; Barcellos et al., 2003; Lobova et al., 2011), a interferência de outros patógenos fecais inibidores do crescimento das espiroquetas (Fellstrom et al., 2001b) e, principalmente, a escolha do método de diagnóstico (Hampson e Trott, 2006).

2.3. Disenteria Suína

A Disenteria Suína é uma doença que causa colite hemorrágica com grande excreção de muco e fibrina nas fezes dos suínos afetados. Foi primeiramente descrita em 1921 por Whiting et

al., citado por Harris et al. (2006). No entanto, o agente etiológico foi isolado e descrito apenas em 1971 por Taylor e Alexander.

A doença é causada pela espécie *B. hyodysenteriae*, uma bactéria gram-negativa, com formato espiralado, anaeróbia estrita, porém com grau de tolerância ao oxigênio de até 1%. É constituída por um cilindro protoplasmático com envelope trilaminar de aproximadamente, oito μm de extensão e 0.4 μm de diâmetro. Possui de 16 a 24 flagelos periplasmáticos inseridos em cada extremidade que envolvem a célula no seu centro. Devido a esses flagelos, é uma bactéria móvel com movimento “serpentino” em meio semi-sólido. Seu cultivo em meio sólido é fastidioso, exigindo meios contendo diferentes antibióticos e atmosfera especial de anaerobiose, com característica fortemente hemolítica em ágar sangue (Glock et al., 1974; Hampson et al., 1997).

Essa bactéria coloniza o epitélio da mucosa do intestino grosso, exclusivamente, e invade células epiteliais e caliciformes causando erosão do epitélio (Kennedy et al., 1988). Além disso, interfere na absorção de água e eletrólitos, com estímulos de hipersecreção de muco, sendo este característico da doença (Liebler-Tenorio et al., 2006).

A manifestação clássica da Disenteria Suína é uma severa diarreia muco-hemorrágica aquosa e de coloração vermelha escura podendo conter traços de fibrina. No início da doença, as

fezes são acinzentadas a amarronzadas e progressivamente, exibem traços de sangue não-digerido, muco, fibrina e restos celulares. Os suínos apresentam-se prostrados, frequentemente, magros e com o flanco deprimido. Após a infecção, o animal pode ficar desidratado, fraco e morrer em aproximadamente cinco dias após a apresentação clínica. A doença tem característica intermitente com intervalos dos sintomas de três a quatro semanas. Geralmente, essas manifestações ocorrem quando o rebanho tem o primeiro contato com a doença no qual causam altas taxas de mortalidade (Kennedy et al., 1988; Hampson et al., 1997).

No entanto, com o uso contínuo de antibióticos como promotores de crescimento nas rações e a presença endêmica da doença no rebanho, a maioria dos animais recuperam-se gradualmente e sobrevivem à infecção pela *B. hyodysenteriae*. Assim sendo, os suínos permanecem na condição sub-clínica, a qual a manifestação da doença é moderada, porém ocorre a diminuição da eficiência produtiva (Hampson et al., 1997; Harris et al., 2006).

As lesões macroscópicas estão exclusivamente localizadas no intestino grosso, principalmente no cólon, mas não é distribuída uniformemente ao longo da extensão do órgão. A mucosa é coberta por muco, fibrina e traços de sangue, com focos de necrose superficial tornando-se mais extensa e severa, formando uma pseudomembrana mucofibrinosa. O conteúdo

apresenta-se variando de amolecido a líquido, avermelhado e com grande quantidade de exsudato e muco (Figura 1a) (Jacobson et al., 2004; Harris et al., 2006).

As lesões microscópicas da Disenteria Suína progridem de catarral a mucofibrinosa na fase mais aguda, para fibrinonecrótica na fase crônica da doença. Em lesões precoces, pode haver edema da lâmina própria próxima ao lúmen e acentuada hiperplasia de células caliciformes. Também há visualização de espiroquetas no interior de criptas e de células caliciformes formando grandes aglomerações (Kennedy et al., 1988), no entanto a presença das espiroquetas na lâmina própria só ocorre nas fases mais avançadas da doença. A necrose do epitélio não é um fator predisponente da invasão da *B. hyodysenteriae*, já que as células epiteliais das criptas mantêm-se intactas mesmo com grande quantidade de espiroquetas no seu lúmen (Glock et al., 1974). A hemorragia ocorre devido a áreas de erosão ou necrose do epitélio, onde os capilares ficam expostos, permitindo o extravasamento de sangue para o lúmen (Hampson et al., 1997).

2.4. Colite Espiroquetal

Em 1980, Taylor et al., descreveram a bactéria *B. pilosicoli*. Essa espiroqueta anaeróbia está associada com a Colite Espiroquetal suína, e recebeu inicialmente o nome de *Serpulina pilosicoli*, que em latim tem o significado de “pequena serpente do cólon piloso” devido à característica microscópica da lesão. A bactéria adere uma das extremidades ao epitélio da mucosa, paralelamente uma à outra, formando um aspecto “piloso” ou “falso bordo em escova” no lúmen. Comparada à *B. hyodysenteriae*, a *B. pilosicoli* é mais curta e fina, medindo aproximadamente seis µm de extensão e 0,3µm de diâmetro. Possui oito ou dez flagelos periplasmáticos, crescendo em meio anaeróbio em temperaturas de 37 a 42°C, e causa fraca hemólise em meio sólido enriquecido com sangue. Thomson et al. (1998), relatam que o grau de hemólise é mais forte quando são isoladas na primeira passagem e vão diminuindo durante as passagens subsequentes em placas de cultivo.

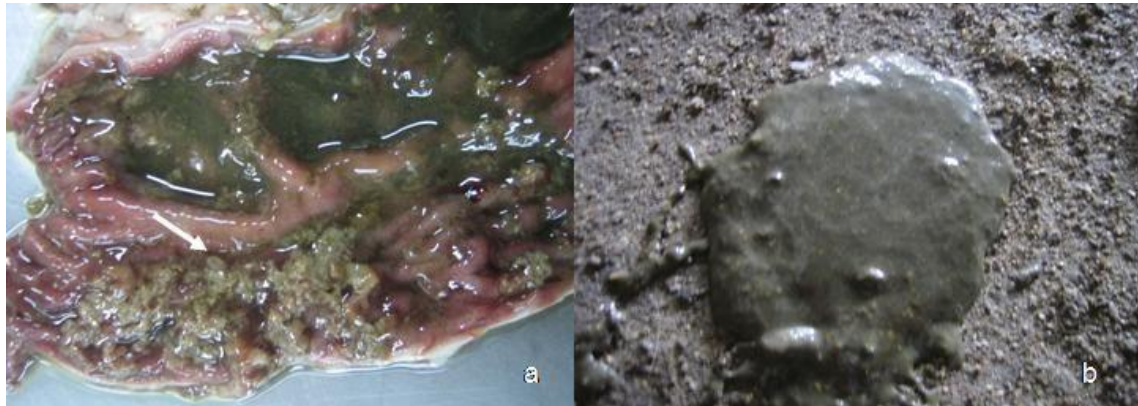


Figura 1- a) Mucosa de cólon de suíno acometido por Disenteria Suína. Nota-se a grande quantidade de muco, traços de sangue e focos de necrose superficial (seta). b) Fezes de suíno infectado com *B. pilosicoli*. Aspecto mucoso, acinzentado, semelhante a “cimento fresco”.

Os primeiros sinais da infecção são uma discreta perda da condição corporal e a apresentação de diarreia mucóide ou pastosa, acinzentada, aspecto semelhante à “cimento fresco” (Figura 1b), semelhante a outras formas de colites e a fase inicial da Disenteria Suína. Pode-se encontrar também certa quantidade de material mucoso aderido à parede do intestino grosso, mas é incomum observar traços de sangue não-digerido (Trott et al., 1996b; Thomson et al., 1997). Os animais apresentam-se apáticos, períneo sujo de fezes e contorcem o rabo ou chutam suas laterais, sugerindo dores abdominais. É uma doença considerada auto-limitante, com duração de dois a 14 dias, tornado-se crônica, podendo haver reincidências após o desaparecimento dos sinais clínicos, não sendo caracterizada por taxas de mortalidades expressivas no rebanho (Thomson et al., 1997; Hampson e Trott, 2006).

Devido à alta capacidade funcional do intestino grosso, nem todos os animais infectados apresentarão diarreia, permanecendo na condição sub-clínica da doença, ou seja, com a piora na taxa de conversão alimentar, mas com a manutenção do apetite; emagrecimento e consequente atraso em alcançar pesos ideais de abate. A absorção de líquidos reduzida pode dar origem a menores tempos de passagem no intestino grosso e, conseqüentemente, uma redução na produção e absorção de ácidos graxos voláteis. Na fase de crescimento, a produção desses ácidos fornece cerca de 25-30% das necessidades do animal para a manutenção de energia. Assim, uma alteração nesse processo pode resultar na conversão alimentar reduzida (Thomson et al., 1997; Hampson e Trott, 2006). Hampson et al. (1997), relatam que os sinais clínicos da Colite Espiroquetal podem ser reduzidos em severidade

com o uso de promotores de crescimento, porém, sem eliminar inteiramente a infecção.

Macroscopicamente, a Colite Espiroquetal pode ter graus de lesões variadas conforme a severidade da doença. Usualmente, é caracterizada pela parede intestinal flácida, com conteúdo mucoso à fluido acinzentado no ceco e cólon, e acúmulo de muco em casos mais acentuados. A mucosa apresenta-se edematosa com regiões hiperêmicas ou hemorrágicas em menor grau, e ocasionalmente ulcerações. Também são encontradas, erosões focais superficiais coalescentes com depósitos de fibrina aderidas à mucosa, juntamente com material necrótico, fezes e partículas de ração, dando um aspecto de “calçamento com paralelepípedos”. Geralmente, não há alterações na serosa, mas em lesões crônicas, observa-se uma edemaciação acentuada, com aspecto gelatinoso e translúcido por toda a superfície da serosa (Thomson et al., 1998; Hampson e Trott, 2006).

As principais lesões microscópicas da Colite Espiroquetal são as criptas alongadas, dilatadas e preenchidas com muco em excesso e ocasionalmente por espiroquetas, algumas com restos celulares e células inflamatórias, formando lesão conhecida como micro-abscesso. Há também uma hiperplasia acentuada das células caliciformes tanto das criptas quanto da superfície da mucosa resultando em aumento na produção de muco. A degeneração epitelial causada pelas espiroquetas induz aumento da taxa de mitose das

células das criptas e consequente alongamento destas, além da produção de epitélio imaturo que apresenta características cuboidais ou escamosas. Há necrose epitelial associada à discreta erosão e descamação na superfície do lúmen (Trott et al., 1996a; Thomson et al., 1998; Hampson e Trott, 2006).

Apesar das lesões macroscópicas se apresentarem de forma característica, o que induz o diagnóstico de um determinado agente, diagnósticos diferenciais de outros patógenos devem ser considerados pela sintomatologia similar em suínos nessas fases. Dentre estes diferenciais citam-se, por exemplo, *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp., PCV2, *Trichuris suis* e a “colite não-específica” aparentemente associada à granulação da ração (Hampson e Trott, 2006), a semelhança das lesões demonstra a importância de se utilizar análises laboratoriais para a identificação precisa do agente.

2.5. Fatores de virulência

A motilidade, quimiotaxia ao muco, a produção de toxinas e metabolização do oxigênio são considerados fatores importantes de patogenicidade das *Brachyspira* sp. (Kennedy et al., 1988; Stanton e Sellwood, 1999; Harris et al., 2006; Naresh e Hampson, 2010).

A *B. hyodysenteriae* é uma bactéria capaz de movimentar-se em ambientes viscosos e, associada com a “alta velocidade” desse movimento, facilita a penetração no muco

intestinal e também a lesionar as células epiteliais. A capacidade de mover-se em ambientes viscosos, como o muco, aparentemente, é uma particularidade especializada de movimento de algumas espiroquetas e outras bactérias curvas (Kennedy et al., 1988; Kennedy et al., 1996). Alguns autores provaram que a espécie patogênica *B. hyodysenteriae* apresenta maior quimiotaxia à mucina do que as espécies consideradas apatogênicas sugerindo, portanto, uma relação entre quimiotaxia, motilidade e virulência (Milner e Sellwood, 1994). Da mesma forma, a *B. pilosicoli* também apresenta quimiotaxia ao muco. Segundo alguns autores (Stanton, 2006; Naresh e Hampson, 2010), quando a espiroqueta encontra-se nesse ambiente, há um aumento na eficiência da movimentação da bactéria, em resposta ao aumento da viscosidade do meio, sugerindo que seja uma maneira de facilitar a adesão ao epitélio.

A motilidade das *B. hyodysenteriae* é atribuída aos flagelos periplasmáticos aderidos às terminações da célula e que ficam livres em seu entorno. São organelas complexas compostas por duas classes de proteínas, A e B. Em bactérias mutantes *flaA*⁻ e *flaB*⁻, houve redução de 96% do movimento, além de apresentarem movimentos “vibratórios” e erráticos, com conseqüente diminuição da capacidade de colonização da mucosa. Esses dados demonstram que essas proteínas são importantes no funcionamento e velocidade do flagelo, tipo de movimento e virulência das bactérias (Kennedy et al., 1997).

A motilidade é regulada pela quimiotaxia ao muco, e demonstra ser um mecanismo primário de associação à mucosa, pois não há um sistema específico de adesão ao epitélio, e aparenta ser o único artifício que previne a eliminação da bactéria pelo fluxo natural do muco. A ausência desse mecanismo indica que a aderência não é um pré-requisito para colonizar o intestino grosso e desenvolver a doença (Kennedy et al., 1988; Kennedy et al., 1996; Thomson et al., 1997).

A *B. hyodysenteriae* possui um sistema quimiossensor que regula sua motilidade de acordo com as condições ambientais. Avaliando o movimento *in vitro* em diferentes valores de pH, temperatura e oxigenação, observou-se a manutenção da motilidade entre valores de pH 4-10, sendo o valor 7 ótimo, à 38°C e em anaerobiose. No entanto, em aerobiose, manteve vigor considerado normal ou semelhante ao *in vivo* por até duas horas, e mostrou-se tolerante por até oito horas, sendo considerada, portanto, uma bactéria aerotolerante (Kennedy et al., 1996; Stanton et al., 1999).

A enzima NADH oxidase confere proteção a *B. hyodysenteriae* contra a toxicidade do oxigênio, pois é capaz de reduzir a molécula de O₂ em água. As hipóteses das funções dessa enzima seriam a de um mecanismo de defesa antioxidante, ou de que consiga tirar vantagens sob o O₂, usando-o em uma via alternativa de regeneração de NADH. Dessa maneira, essa enzima é essencial para o estabelecimento,

persistência, e, portanto, da patogenicidade dessa espiroqueta em seu microhabitat natural, que é o tecido da mucosa intestinal (Stanton e Jensen, 1993; Stanton e Sellwood, 1999; Stanton et al., 1999).

A toxina como a hemolisina é considerada um fator de virulência importante da *B. hyodysenteriae*. A diferença de intensidade da hemólise encontrada em ágar sangue entre a *B. hyodysenteriae* e outras *Brachyspira* sp. do gênero não está totalmente elucidada, mas alguns autores sugerem que seja ou pela composição básica dessa proteína ou pela quantidade de produção e secreção ou pela combinação de ambas (Thomson et al., 1997). A lise dos eritrócitos na presença dessa proteína está associada com a turgidez e ruptura da célula como resultado da diferença da pressão osmótica, devido a formação de poros na membrana dos glóbulos vermelhos. A presença da hemolisina na *B. pilosicoli* não foi ainda determinada, portanto não se sabe o potencial desta com fator de virulência (Thomson et al., 1997). Os lipooligossacarídeos (LOS) também são toxinas secretadas pelas *Brachyspira* sp. Estão presentes na parede celular das espiroquetas e aparentam ter características semelhantes aos Lipopolissacarídeos (LPS) de outras bactérias gram-negativas. São tóxicas às células com atividade endotóxica e quimiotáticas para os fagócitos e assim, contribuem para a inflamação e desenvolvimento da lesão (Hyatt et al., 1994; Joens, 1997).

Recentemente, foi relatada a presença de um plasmídeo no genoma da *B. hyodysenteriae* com tamanho de aproximadamente 36kb, que facilita a colonização da bactéria e desenvolvimento da doença no intestino grosso. Esse plasmídeo está envolvido na incorporação de açúcares para a formação do LOS, e aparentemente, a diferença na composição dessa estrutura pode afetar a habilidade das espiroquetas em sobreviver no ambiente ou a de interagir com o epitélio sendo esse outro fator de virulência relatado (La et al., 2011).

A *B. hyodysenteriae* possui um agente de transferência gênica (*gene transfer agent - GTA*), semelhante a um prófago, nomeado de VSH-1 (vírus da *Serpulina hyodysenteriae*), que está envolvido na transferência natural de genes e recombinação dentro espécie. A real importância dessa troca de material genético não está totalmente esclarecida, pois transfere, aleatoriamente, fragmentos de 7.5kb de DNA entre as bactérias (Motro et al., 2009). No entanto, devido ao padrão de resistência aos antimicrobianos entre as espécies serem semelhantes, Duhamel (2011) sugere dois mecanismos para tal característica. O primeiro seria a seleção natural de uma cepa mutante resistente devido a constantes exposições ao antibiótico. E, o segundo seria a obtenção horizontal do GTA, o qual possui um gene codificador de resistência a determinados tipos de antimicrobianos, que se dissemina entre as bactérias. Isso nos demonstra a importância da

implementação racional de antibióticos como promotores de crescimento, pois há um grande potencial de desenvolvimento de resistência aos antibióticos utilizados. Além disso, essa transferência também pode contribuir para a aquisição de genes envolvidos em outros fatores de virulência, como as toxinas e enzimas, pelas cepas comensais (Duhamel, 2011).

Alguns autores sugeriram que a lipoproteína nomeada de *mglB* possa ser um fator de virulência para a *B. pilosicoli*. Essa lipoproteína pode mediar o mecanismo de estabelecimento da bactéria na superfície epitelial, pois, tem alta afinidade com esta, auxiliando na adesão e conseqüentemente, na patogenicidade da bactéria Zhang et al. (2000).

2.6. Transmissão

A transmissão ocorre pela via fecal-oral, sendo que o muco das fezes de animais contaminados envolve as espiroquetas, protegendo-as do ácido estomacal, permitindo que elas alcancem o intestino grosso ainda íntegras (Kennedy et al., 1988; Taylor, 1990; Hampson e Stanton, 1997). No intestino grosso, associam-se à mucosa por quimiotaxia ao muco, que é produzido pelas células caliciformes da superfície da mucosa e também de glândulas das criptas. Após a colonização do epitélio, as espiroquetas tem um período de incubação que varia de dois a sete dias, podendo chegar a 14 dias (Kennedy et al., 1988; Kennedy et al., 1996; Thomson et al., 1997).

As bactérias são facilmente introduzidas em rebanhos não-imunes por animais carreadores de outros rebanhos, ou por aqueles que se recuperaram da doença, mas, ainda excretam as espiroquetas. Estima-se um período de excreção de até 70 dias após o término dos sinais clínicos. A transmissão entre rebanhos ocorre mecanicamente através de caminhões e rações contaminados ou pela movimentação de pessoas que possuem roupas e calçados contaminados com fezes (Hampson e Trott, 2006; Harris et al., 2006).

A persistência das *Brachyspira* sp. no ambiente também pode ser fonte de contaminação. Harris et al. (2006) relatam que a *B. hyodysenteriae* foi isolada do piso das baias de animais infectados. Em estudo realizado em laboratório simulando três diferentes tipos de microambiente, Boye et al. (2001) recuperaram a *B. hyodysenteriae* viável em cultivo por até 112 dias e a *B. pilosicoli* por 210 dias, indicando um potencial risco de reinfecção do rebanho, caso não se realize medidas sanitárias adequadas no ambiente onde os animais estão alojados. A disseminação da infecção dentro do rebanho ocorre pela drenagem deficiente, principalmente em galpões onde há comunicação das lâminas d'água, entre as baias (Hampson et al., 1997).

Além disso, há relatos de isolamento das espiroquetas em diversas espécies animais, como cães (Lee e Hampson, 1996; Oxberry e Hampson, 2003; Fellstrom et al., 2011a) pássaros selvagens (Jansson et al., 2001; Jansson et al., 2004), moscas

(Taylor, 1995; Harris et al., 2006) e roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) (Backhans et al., 2010; Backhans et al., 2011), indicando possíveis vetores biológicos e mecânicos nas granjas. Essas informações são importantes em programas de erradicação das doenças, para evitar o contato dessas espécies com suínos de granjas e assim, diminuir o potencial de transmissão das *Brachyspira* sp. patogênicas (Hampson e Trott, 2006).

2.7. Susceptibilidade

Alguns autores relatam a possível interferência de dietas altamente fermentáveis, favorecendo a infecção e aderência do microrganismo e, conseqüentemente, acentuar a lesão no intestino grosso. Isso devido à diminuição do pH, que pode lesar o epitélio tornando-se um fator predisponente para a colonização das espiroquetas (Trott et al, 1996a; Duhamel, 2005). Outros autores (Kirkwood et al., 2000; Harris et al., 2006), defendem que quanto maior for a fermentação no intestino grosso, maior será a produção de ácido graxos voláteis, diminuindo o pH, e criando um ambiente desfavorável para a sobrevivência das espiroquetas.

A adição de inulina, um carboidrato resistente a degradação enzimática do intestino delgado que torna-se fermentável no intestino grosso e diminui o pH luminal, mostrou ter efeito preventivo na colonização da *B. hyodysenteriae*

(Hansen et al., 2011a). Em outro estudo para avaliar essa relação, Kirkwood et al. (2006), compararam o uso de diferentes dietas, altamente fermentáveis, altamente digestíveis e dieta comercial para suínos e realizaram inoculação experimental para avaliar os efeitos sobre o desenvolvimento da Disenteria Suína. Os autores não encontraram nenhuma relação entre a dieta fornecida com a capacidade de proteger ou favorecer a doença.

2.8. Prevenção e Tratamento

Segundo Hampson e Trott (2006), quando a colite espiroquetar é endêmica no rebanho, é necessário a terapia com antimicrobianos para evitar aumento na morbidade, devido a introdução de animais não-imunizados, mudanças na dieta ou situações associadas ao estresse.

A adoção de estratégias de manejo como separação por idade e administração de antibióticos profiláticos, pode reduzir a incidência da Disenteria Suína nas granjas (Stanton, 2006). Em granjas com surtos, os animais devem ser medicados via água, já que diminuem o consumo de ração no início da doença. Já os animais muito afetados, deve-se utilizar a medicação parenteral, porém torna-se impraticável em grandes rebanhos (Harris et al., 2006). A única opção para propriedades positivas para Disenteria Suína a médio e longo prazo é a erradicação da

enfermidade devido às perdas causadas pela doença (Guedes e Barcellos, 2007) .

2.9. Métodos de diagnóstico

2.9.1. Isolamento

O primeiro estudo para identificar o agente etiológico da Disenteria Suína foi realizado por Taylor e Alexander (1971). As espiroquetas foram inicialmente isoladas do conteúdo do cólon de suínos diarréicos através de filtros de 0.65 mm com filtrações subsequentes em diâmetros de poros menores. O filtrado foi então inoculado sob ágar e incubado em anaerobiose para se obter colônias isoladas.

O isolamento é reconhecido como padrão ouro para identificação do agente (Kennedy et al., 1988; Fellstrom et al., 1997; Fellstrom et al., 2001b; Harris et al., 2006; Stanton, 2006), porém deve-se considerar também o histórico do rebanho, sinais clínicos, lesões macro e microscópicas, além de excluir a possibilidade de haver outros agentes envolvidos (Harris et al., 2006; La et al., 2009).

Fellstrom et al. (2001b) demonstraram que o cultivo bacteriano para *Brachyspira* sp. é um teste altamente sensível, capaz de detectar até uma bactéria quando a amostra foi mantida bem acondicionada e rapidamente inoculada em ágar. Comparando dados individuais com a utilização de *pool* de fezes de cinco animais, a sensibilidade de detecção foi de 96%, enquanto que a utilização

de um *pool* de 10 animais essa sensibilidade cai para 30%, devido ao crescimento exagerado de flora contaminante.

Porém, alguns autores citam que o isolamento pode demorar até duas semanas para se obter um diagnóstico definitivo, o que pode prejudicar o controle e erradicação da doença no rebanho. Além disso, devido à característica intermitente das doenças, o cultivo bacteriano pode não ser eficiente quando os animais estão excretando pequenas quantidades de bactérias (Corona-Barrera et al., 2004; Hampson e Trott, 2006; La et al., 2009). A importância do isolamento, no entanto, é reconhecida quando há a necessidade de se estudar a susceptibilidade das *Brachyspira* sp. aos antimicrobianos ou tipificação de cepas (Atyeo et al., 1998; Rasback et al., 2006).

Hommeiz et al. (1998) sugeriram a identificação da *B. hyodysenteriae* por exame direto em microscópio, pois seria possível distingui-las das demais pela sua morfologia e tamanho. Esse tipo de identificação tem a vantagem de não necessitar de cultivos, podendo ser executada em laboratórios com pouca infraestrutura. No entanto, utilizar-se apenas desse exame, não seria um diagnóstico confiável, pois os resultados podem ser subjetivos e permitir resultados equivocados (Novotná e Škardová, 2002).

Fellstrom et al., em 1997, classificaram as *Brachyspira* sp. em quatro grupos, de acordo com suas características bioquímicas (Tabela 1), para identificação das espécies após o isolamento das espiroquetas em suínos. Essa classificação foi realizada a partir da análise de produtos da metabolização de diversos substratos, e, de acordo com os autores, são necessários apenas dois testes

para diagnósticos de rotina quando utiliza-se o isolamento. As características bioquímicas se relacionam com a classificação filogenética das espiroquetas baseado em análises parciais das sequências do gene 16srRNA, sendo portanto, uma referência confiável para determinar as espécies de *Brachyspira* sp. (Fellstrom et al., 1995).

Tabela 1 – Patogenicidade, nome das espécies e classificação por reação bioquímica de cepas de *Brachyspira* sp.

Grupos	Reação bioquímica			Patogenicidade	Espécies
	Hemólise	Indol	Hipurato		
I	Forte	+	-	Sim	<i>B. hyodysenteriae</i>
II	Fraca	+	-	discutível	<i>B. intermedia</i>
III	Fraca	-	-	Não	<i>B. murdochii</i> , <i>B. innocens</i>
IV	Fraca	-	+	Sim	<i>B. pilosicoli</i>

Fonte: Adaptada de Fellstrom et al. (1997).

Em avaliação dos produtos metabolizados, a *B. pilosicoli* demonstrou que não produz indol, mas consegue hidrolisar o hipurato. Tem atividades α e β glucosidase negativas e atividade α galactosidase positiva. Já a *B. hyodysenteriae*, apresenta produção de indol sem a hidrólise do hipurato. As atividades das α e β glucosidase são negativas e a α galactosidase é negativa (Trott et al., 1996).

A submissão das colônias cultivadas aos testes bioquímicos deve ser realizada apenas naquelas sabidamente isoladas. E, devido à dificuldade de se obtê-las, pode haver alguma discordância entre os resultados obtidos na análise bioquímica e algum método molecular utilizado (Fellstrom e Gunnarsson, 1995). A presença de múltiplas espécies de *Brachyspira* sp. no mesmo rebanho e até no mesmo animal é comumente detectada, causando problemas no diagnóstico (Fellstrom et al., 1997). Para um diagnóstico na

rotina laboratorial mais rápido e específico, alguns autores sugerem a combinação de cultura bacteriana com o PCR, ao invés dos testes bioquímicos, para identificar a espécie da *Brachyspira* sp. (Fellstrom e Gunnarsson, 1995; Fellstrom et al, 2001b; Rasback et al., 2006).

2.9.2. Microscopia

Em cortes histológicos corados em Hematoxilina e Eosina conforme Luna (1968), na Colite Espiroquetal, há possibilidade de visualizar a presença de espiroquetas intimamente aderidas na mucosa ou no lúmen das criptas, formando a lesão de “falsa borda em escova” (Trott et al., 1996b) considerada por alguns autores como patognomônica (Talyor e Trott, 1997; Trott et al., 1997). Embora haja uma ênfase em encontrar essa lesão, esta não é sempre observada, pois se acredita que essa característica está confinada a um curto período no curso da infecção e, consequentemente, não é representativo de todos os casos (Thomson et al., 1997; Thomson et al., 1998; Duhamel, 2001). Thomson et al. (1998) relatam que a ausência de especificidade para as lesões histológicas na maioria dos casos de Colite Espiroquetal, dificulta estabelecer o diagnóstico etiológico, a menos que o agente seja visualizado. Stanton (2006) cita que a Disenteria Suína pode ser identificada pela histologia, desde que haja lesões evidentes de colite induzida pela espiroqueta.

A visualização das *Brachyspira* sp. patogênicas também pode ser feita por coloração de imuno-histoquímica, utilizando-se de anticorpos monoclonais específicos (Duhamel, 2001) ou policlonais (Paulovich et al., 2004), no entanto, estes estão indisponíveis comercialmente.

2.9.3. Métodos Sorológicos

La et al. (2009) pesquisaram a viabilidade de utilizar a proteína recombinante de membrana externa Bhlp29.7, como antígeno para testes de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). O teste foi sensível para detectar rebanhos infectados com *B. hyodysenteriae*, mas a prevalência dentro do rebanho foi baixa. Devido a isso, os autores sugeriram a possibilidade de haver reação cruzada com outras espiroquetas intestinais. A *Brachyspira innocens* é uma espécie comensal do intestino grosso, que possui o gene codificador da Bhlp29.7, embora não se saiba ao certo, se esse gene é expresso e se induz imunidade. Ainda assim, deve ser considerada como um possível elemento dessa reação-cruzada. Já Lobova et al. (2011) realizaram teste de *immunoblotting* para a detecção de anticorpos utilizando a Bhlp29.7. Nos dados do estudo, houve detecção de rebanhos positivos sem histórico de Disenteria Suína, demonstrando uma possível reação cruzada entre as bactérias. Além disso, implantar essa técnica em escala industrial pode ser inviável devido ao custo de produção do teste, além de ser uma técnica laboriosa.

Corona-Barrera et al. (2004) tentaram utilizar a separação imunomagnética para detectar as *B. hyodysenteriae* e a *B. pilosicoli*. O método consiste de microesferas magnéticas cobertas por anticorpos monoclonais, de cada bactéria, incubadas com fezes de animais suspeitos e seguinte recuperação dos microrganismos que se ligaram a microesfera. Porém, não obtiveram resultados satisfatórios quanto à sensibilidade e especificidade.

De acordo com Hampson e Trott (2006) não há testes sorológicos específicos disponíveis para as espiroquetas patogênicas que determinem os títulos de anticorpos de animais que tenham sido expostos. Quando foram aplicados a campo, os testes não apresentaram uma detecção confiável de indivíduos (Fellstrom et al., 2001b). Além disso, a utilização de determinados antígenos, como o os LOS apresentaram tendência de serem sorogrupos-específicos ou ser pouco sensíveis (La et al., 2009).

2.9.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com intuito de agilizar os diagnósticos de Disenteria Suína e Colite Espiroquetel, foram desenvolvidos testes de PCR (*polymerase chain reaction*) para cada agente causador da doença, demonstrando especificidade e sensibilidade superior ao cultivo bacteriano (Atyeo et al., 1998). Da mesma maneira, a PCR *duplex*, que é capaz de

detectar *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* simultaneamente, desenvolvido por La et al. (2003), apresentou bons resultados quanto à sensibilidade e especificidade quando aplicados em DNA extraídos de amostras fecais, além de ter a vantagem de se obter o diagnóstico em até cinco horas após a coleta. Além disso, esses autores citam que os custos do isolamento e o PCR *duplex* são comparáveis, e a vantagem desse último é em relação ao tempo de execução reduzida e necessitar de menos componentes laboratoriais.

Stanton e Sellwood (1999), sequenciando o gene *nox* de cepas de *B. hyodysenteriae* de diferentes hospedeiros e de diferentes localizações geográficas constataram que todas as sequências eram idênticas, sendo o gene altamente conservado dentro da espécie. Por isso, sugeriram que esse gene seria o melhor alvo para técnicas moleculares caso os genes *nox* das outras espécies tenham sequências suficientemente diferentes da *B. hyodysenteriae*. De acordo com estudo de Barth et al. (2011), devido a grande variedade genética entre as cepas, o único alvo molecular confiável para diagnóstico em PCR seria o gene *nox* para as *B. hyodysenteriae*.

Outra técnica molecular semelhante à PCR é a *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Segundo Townsend et al. (2005) essa se baseia na análise genética do gene *nox* para identificar sítios de restrição de endonucleases que irão produzir padrões de pesos

moleculares espécie-específicos para as cinco espécies de *Brachyspira* de suínos.

Algumas cepas podem ser classificadas como *B. hyodysenteriae* pela PCR, porém não apresentam características fenotípicas típicas nem estarem associadas com doença clínica. Por outro lado, algumas bactérias possuem todas as características fenotípicas de isolamento e sintomatologia, e não são confirmadas pelas técnicas de PCR atuais. Essa discordância ocorre devido a utilização de fatores de virulência como alvo nesses testes moleculares podendo confundir o diagnóstico (Schwartz, 2011). Além disto, demonstram a grande diversidade entre cepas de *B. hyodysenteriae*, sendo algumas de elevada e outras de reduzida patogenicidade. Outras possibilidades para esta discrepância entre isolamento, PCR e apresentação anatomo-clínica são os casos de *B. suanatina*, que induzem sintomatologia, lesões, características fenotípicas e bioquímicas semelhantes a *B. hyodysenteriae*, mas dão resultados negativos a PCR para este agente. Recentemente, nos Estados Unidos, tem sido isoladas cepas com características de detecção semelhantes à *B. suanatina*, mas diferentes desta, baseado nos testes de sequenciamento realizados, vem sendo chamadas de “*novel strongly hemolytic Brachyspira species–NSH* (NSH-*Brachyspira*)” (Gebhart e Primus, 2011).

Embora a PCR tenha incrementado o diagnóstico para as *Brachyspira* sp. patogênicas,

ele não pode ser utilizado para a identificação do patógeno *in situ*, pois estas técnicas não oferecem informações sobre a distribuição espacial dos microrganismos no tecido ou sua associação com a lesão. Em 1998, Boye et al. desenvolveram a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) que é uma técnica a qual associa a precisão molecular com a visualização do agente no tecido. Com essa técnica, foi possível detectar até uma bactéria no tecido. Além disso, apresentou-se altamente específica, sem nenhum tipo de hibridização com outros microrganismos presentes na flora intestinal. Stanton (2006) cita que a tecnologia do FISH será sem dúvida importante para a identificação dessas espiroquetas presentes no ceco e cólon.

2.9.5. Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

No procedimento histoquímico da FISH, o princípio básico é o anelamento da sonda com a sequência alvo, para a visualização em microscópio epifluorescente. Entende-se por sonda, uma sequência de oligonucleotídeos complementares e específicos marcados com substâncias fluorescentes os quais se anelarão ao alvo (Moter e Gobel, 2000; Ploeg, 2000).

De acordo com Botari et al. (2006), a FISH tem quatro procedimentos básicos: 1) fixação e permeabilização da amostra, 2) hibridização, 3) lavagem para remoção das sondas em excesso e 4) detecção pela microscopia fluorescente. Antes da hibridização, as amostras

contendo os microrganismos são fixadas para proteger o RNA da degradação de RNAses endógenas e permeabilizadas para permitir que as sondas penetrem na célula.

A maioria das aplicações da FISH tem como alvo o RNA ribossomal. A utilização deste alvo justifica-se primeiramente por todas as células necessitarem de ribossomos para a translação, portanto, estão presentes em todas as células vivas (Amann e Fuchs, 2008). A segunda razão é a seqüência do rRNA ser evolutivamente conservada em relação a outras seqüências de genes dentro de uma mesma espécie, não sendo possível desenhar uma sonda para identificar grandes domínios taxonômicos como filos, classes ou ordens. A terceira e última razão seria pela quantidade de ribossomos presentes em cada célula, sendo esse alvo naturalmente amplificado podendo atingir um número de 100.000 cópias por célula (Amann et al., 2001; Amann e Fuchs, 2008).

As sondas utilizadas em FISH são, geralmente, oligonucleotídeos entre 15 e 30 bases com única molécula fluorescente ligada covalentemente ao 5'-terminal. Segundo Moter e Gobel (2000), os fluorocromos mais utilizados em microbiologia são derivados de fluoresceína ((Fluorescein–Isothiocyanate (FITC)), derivados de rodaminas (Tetramethyl–Rhodamine–Isothiocyanate (TRITC), Texas Red) e mais recentemente, fluorocromos de cianina como Cy3 e Cy5. Os corantes derivados de carbocianinas

aumentaram muito a sensibilidade e nitidez de visualização da técnica (Amann et al., 2001).

A FISH tem uma grande variedade de aplicações dentro de diferentes campos de investigação, incluindo análise de danos cromossômicos, mapeamento genético, toxicologia molecular, genômica comparativa, biologia evolutiva, ecologia microbiana e diagnóstico de doenças (Swiger e Tucker, 1996; Volpi e Bridger, 2008). Além disso, pode ser aplicada em detecção de microrganismos em ambientes complexos como microbiota intestinal, cavidade oral, infecções do trato respiratório, hemoculturas, simbioses e em estações de tratamento de água (Moter e Gobel, 2000).

Na medicina veterinária, a FISH foi utilizada para detectar vários agentes infecciosos tais como *Tritrichomonas foetus* (Gookin et al., 2010), *Lawsonia intracellularis* (Boutrup et al., 2010; Jensen et al., 2010a), *Pasteurella multocida* (Pors et al., 2011a; Pors et al., 2011b), picornavírus (Durand et al., 2008), *Treponema* spp. (Nordhoff et al., 2008), *Coxiella burnetii* (Hansen et al., 2011b), *Mycobacterium* sp. (Lefmann et al., 2006) e bactérias do gênero *Brachyspira* (Boye et al., 1998; Jensen et al., 2010b). Esta técnica é particularmente útil para o estudo da microbiota bacteriana ainda não cultivada ou de difícil cultivo *in vitro* (Moter e Gobel, 2000).

Para o isolamento, é essencial que a amostra chegue em tempo hábil e em temperatura adequada ao laboratório de análise, já que dependemos da viabilidade dos microrganismos. No entanto, nem sempre temos uma logística que atenda essa demanda e por vezes, as amostras demoram mais de 48 horas para chegar, inviabilizando essa técnica. Assim, o FISH demonstra ser uma técnica adequada para esse problema, já que é realizada em material fixado em formol associando a detecção específica de *Brachyspira* sp. e portanto, apresentando-se como alternativa diagnóstica promissora. Outra vantagem da FISH é a facilidade e acessibilidade em sintetizar sondas específicas marcadas com fluorocromos e a possibilidade de detectar somente bactérias viáveis nos tecidos no momento da fixação associada à lesão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O estudo foi desenvolvido no setor de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, no município de Belo Horizonte.

3.2. Amostras

Foram utilizados intestino grosso e fezes de suínos na fase de recria e terminação, pertencentes a um mesmo animal, de rebanhos com histórico de diarreia e com suspeita de infecção por *Brachyspira* sp. patogênicas. Dos

casos obtidos, 33 foram em coletas em frigoríficos, no momento do abate, e seis casos que foram enviadas para diagnóstico no Laboratório de Diagnóstico Veterinário da UFMG, no período de março a novembro de 2011. As amostras de intestinos grosso e fezes foram acondicionadas sob refrigeração e, outro fragmento do segmento do cólon espiral foi fixado em formol tamponado 10%, por no mínimo 24 horas. O intervalo médio entre a coleta e o início das análises foi de 12 horas, sendo no máximo de 48 horas.

Todas as amostras foram submetidas à avaliação pelo isolamento, PCR e FISH e, qualquer delas que tenha tido resultado positivo em pelo menos um dos testes para *B. pilosicoli* ou *B. hyodysenteriae* foi incluída nesse estudo. Também, houve a análise por imuno-histoquímica de todos os casos, porém o resultado deste teste não foi critério para inclusão no estudo como amostra já que permite somente o diagnóstico do gênero *Brachyspira*. Obteve-se um total de 39 amostras positivas, sendo estas sub-divididas para análise estatística em dois grupos, amostras de *B. hyodysenteriae* e amostras de *B. pilosicoli*. Essa subdivisão se justifica pela diferença de sensibilidade de detecção entre cada espécie encontrada nos testes utilizados.

3.3. Isolamento

As amostras de intestino grosso foram semeadas através de esfregaço em placas com

meio seletivo para *Brachyspira* sp. (ágar para anaerobiose¹, 5% sangue ovino, 6,25 mg/μl rifampicina², 800 mg/μl de espectinomicina³, 25 mg/μl de vancomicina⁴, 25 mg/μl de colistina⁵) (adaptado de Novotná e Skardová, 2002) e incubadas em jarras de anaerobiose com uma atmosfera anaeróbia gerada com auxílio de bomba de vácuo e preenchido com a mistura dos gases N₂(80%), CO₂(10%) e H₂(10%) por, no mínimo, três dias, a 37°C. O ambiente anaeróbio foi confirmado por uma fita indicadora de anaerobiose⁶. As colônias milimétricas de cor branca e hemolíticas, que são compatíveis com *Brachyspira* sp., foram cuidadosamente repicadas, com auxílio de alça calibrada, em placas de ágar¹ de isolamento de anaeróbios contendo 5% de sangue ovino e incubadas em anaerobiose, por três dias, a 37°C. Para se obter colônias puras foram realizadas várias passagens com a técnica de esgotamento em placas cultivo, e avaliação das mesmas sob microscopia de contraste de fase em preparações líquidas em lâminas, para observar a presença de espiroquetas. Culturas puras de *Brachyspira* sp. foram tipificadas pelo uso de

¹ Fastidious Anaerobe Agar, Acumedia, cat n° 7531, Neogen Co, Lansing, MI, USA.

² Rifampicin, Sigma-Aldrich, cat n° R3501, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

³ Spectinomycin, Sigma-Aldrich, , cat n° S9007, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁴ Vancomycin, Sigma-Aldrich, , cat n° V2002, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁵ Colistin, Sigma-Aldrich, , cat n° C1511, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁶ Oxoid Anaerobic Indicator, Thermo Fisher, cat n° BR0055, Waltham, MA, USA.

provas bioquímicas como a hidrólise do hipurato e a produção de indol, como descrito por Fellstrom e Gunnarsson (1995).

Após a obtenção das *Brachyspira* sp. estas foram coletadas com alça calibrada uma alçada de colônia no ágar e introduzidas em 2 ml de solução salina 0,9% estéril. Essa suspensão foi transferida em 10mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) enriquecido, e incubada em anaerobiose por 24 horas à 37°C para a propagação da bactéria. Para o preparo do caldo foram utilizados TSB 0,1% de cisteína⁷, 0,2% de glicose, 5% de Soro fetal bovino, 0,0001% de resazurin⁸ e 5% de Dimetyl Sulfoxide (DMSO)⁹. Em seguida, centrifugou-se a 4.000xg por 20 minutos, para a obtenção de um *pellet*, e o ressuspendeu em 1,5mL de TSB contendo 10% de DMSO e 5% de soro fetal bovino. Essa última suspensão foi então transferida para um tubo criogênico e congelado a -80°C.

3.4. Histopatologia

Os fragmentos de intestino grosso foram processados pela técnica histológica rotineira de desidratação e inclusão em parafina. Após esse procedimento, três fragmentos do tecido foram seccionados em 3μm de espessura, e corados pela

⁷ L-Cystein-hydrochloridre-monohydrate, Sigma-Aldrich, cat n°C6852, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁸ Resazurin, , Sigma-Aldrich, cat n° 199303, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁹ Dimetyl Sulfoxide, Sigma-Aldrich, cat n° D5879, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

técnica de Hematoxilina e Eosina (Luna, 1968), para avaliação histopatológica.

3.5. Hibridização Fluorescente *in situ*

O procedimento de FISH foi executado de acordo com Jensen et al. (2000), utilizando individualmente as sondas listadas na tabela 2. Os cortes de tecido seccionados em lâminas silanizadas com 6µm de espessura, foram desparafinizados com xilol e desidratados em etanol a 99°GL por dois minutos e em seguida em etanol 96 °GL.

A hibridização foi realizada em câmaras de hibridização¹⁰ com as lâminas montadas adequadamente em utensílio próprio¹¹, e incubadas com 100 µl de tampão de hibridização (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio) e 100 ng de sonda, a 45°C por 16 horas. Após esse período, as preparações foram lavadas três vezes com tampão de hibridização pré-aquecido (45°C) e, posteriormente, mais três vezes com a solução de lavagem pré-aquecida (45°C) (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl). As amostras foram finalmente lavadas em água ultrapura durante dois minutos e secas em estufa a 45°C. Todo o procedimento foi realizado sem a incidência de luz direta. As preparações foram examinadas em microscópio de

fluorescência (Olympus, AX70, Japão) com cubo de filtro para o fluorocromo Cy3, utilizando objetiva de imersão com aumento de 40x e óleo de imersão fluorescente¹².

Como controles positivos para a técnica de FISH, foram utilizados blocos de parafina contendo fragmentos de intestino grosso sabidamente positivos para as duas espécies de *Brachyspira* sp. patogênicas do suíno, cedidos pelo Dr. Tim Jensen do Danish Veterinary Institute, Technical University of Denmark. A marcação era considerada positiva quando houve a visualização destacada de sinal fluorescente do agente no tecido, e negativa quando não houve nenhum sinal relevante.

¹⁰ Coverplate slide rack, Thermo Fisher, cat n° 73310017, Waltham, MA, USA

¹¹ Coverplates, Thermo Fisher, cat n°72110017, Waltham, MA, USA.

¹² Immersion oil type F IR=1.35, Olympus America Inc, Center Valley, PA, USA.

Tabela 2. Sondas marcadas com fluorocromo utilizadas para a hibridização fluorescente *in situ*.

Espécie	Sequência da sonda	Fluorocromo
<i>B. hyodysenteriae</i>	ctcacgatgaacctcgac	[Cy3]-
<i>B. pilosicoli</i>	gctcatcgtaagcgaaa	[Cy3]-

Fonte: Boye et al., 1998.

Todos os testes de PCR foram executados em um volume final de 25 µl por microtubo. O *mix* de PCR constituiu de: 1X de tampão para PCR (contendo 1,5 mmol⁻¹ de Mg Cl₂), 1,25 U de Taq DNA polymerase¹³, 0,1 mmol⁻¹ de cada dNTP¹⁴, 0,2 µmol⁻¹ de cada par de *primer* (H1 e H2, P1 e P2) e 2,5 µl da amostra de DNA (*template*). As condições da PCR envolveram um passo inicial de 5 minutos a 95°C para a ativação da Taq DNA polimerase, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 90 segundos e extensão a 68°C por dois minutos. O último passo constituiu de extensão final a 68°C por 10 minutos. Os produtos da PCR (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X, e marcados com brometo de etídio e revelados sob luz ultravioleta.

3.7. Imuno-histoquímica

Para a marcação por imuno-histoquímica, fragmentos de intestino grosso foram fixados em

formol tamponado 10% e processados para inclusão em parafina. Após esse procedimento, foram obtidas secções histológicas em lâminas silanizadas de 3µm de espessura. Foi utilizada a técnica da streptavidina marcada e anticorpo policlonal específico para o gênero *Brachyspira* sp. na diluição de 1:6000. A concentração utilizada foi determinada após a otimização desta em teste de diluições do anticorpo aplicados em amostras positivas para o gênero. O anticorpo policlonal foi gentilmente cedido pelo professor Dr. David Barcellos da UFRGS, Porto Alegre, Brasil. A marcação positiva foi detectada pelo cromógeno AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole)¹⁵. O protocolo da técnica utilizada está descrita em detalhes no ANEXO 1. A marcação pela imuno-histoquímica foi caracterizada em positivo quando observou-se marcação em bactérias espiraladas no tecido, independente da intensidade de marcação, ou negativo quando a marcação estava ausente.

¹³ Cenbiot, Taq. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil.

¹⁴ INVITROGEN, dNTP set, Carlsbad, CA, EUA.

¹⁵ 3-Amino-9-ethylcarbazole, cat n° A6926, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA

Tabela 3- Sequência de *primers* e tamanho dos produtos utilizados para detecção de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*.

Primers	<i>B. hyodysenteriae</i>		<i>B. pilosicoli</i>	
	H1 (5'-3')	H2 (3'-5')	P1 (5'-3')	P2 (3'-5')
Sequência	actaaagatcctgatgtattg	ctaataaacgtctgctgc	agaggaaagtttttcgcttc	gcacctatgttaaaccgcttg
Peso molecular	354 kb		823 kb	
Alvo	Gene <i>nox</i>		Segmento 16S do rRNA	

3.8. Análise estatística

Os resultados do isolamento, PCR, imuno-histoquímica e FISH foram sumarizados em tabelas 2x2 e comparados entre cada grupo, utilizando-se o método não-paramétrico de McNemar, considerando $p < 0,05$, utilizando o software BioStat 5.0¹⁶.

Na análise estatística para o grupo da *B. hyodysenteriae*, o isolamento foi o teste com menor capacidade de diagnóstico, sendo estatisticamente diferente dos demais testes, como demonstrado na tabela 4. Para o grupo da *B. pilosicoli*, o isolamento também foi o método com menor eficiência de diagnóstico, sendo apenas 10% das amostras diagnosticadas como positivas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento

Dentre todas as 39 amostras analisadas foi obtido isolados de *Brachyspira* sp. em três amostras (7,69%), sendo duas de *B. hyodysenteriae* e uma de *B. pilosicoli*. As espécies foram confirmadas através da técnica de PCR, já que não foi possível distinguir através dos testes bioquímicos sugeridos por Fellstrom et al. (1997).

¹⁶ BioEstat 5.0, Universidade do Pará, Pará, Brasil.

Tabela 4 – Detecção de amostras positivas por método avaliado em cada espécie de *Brachyspira* patogênica.

Método	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>	Total
Isolamento	(2/29) 6,9% ^a	(1/10) 10%	(3/39) 7,69%
PCR	(23/29) 79,3% ^b	(5/10) 50%	(28/39) 71,8%
FISH	(21/29) 72,4% ^b	(7/10) 70%	(28/39) 71,8%
IHQ*	-	-	(32/39) 82,0%

Valores seguidos de letras distintas diferem entre si estatisticamente, ao nível $p < 0,05$ pelo método de McNemar.

* Detecção do gênero *Brachyspira* sp., não sendo possível a distinção entre espécies nas condições deste estudo.

A PCR e a IHQ foram os métodos com a maior quantidade de amostras positivas nas duas técnicas para o grupo da *B. hyodysenteriae*, com total de 19 amostras (alta concordância). Já a IHQ e FISH detectaram juntas 17 amostras (baixa concordância), e a FISH com a PCR identificaram 15 casos (alta concordância).

A pequena quantidade de amostras isoladas nesse estudo corresponde com os relatos de Hampson e Trott (2006), que citam a dificuldade de cultivar a bactéria, por necessitar de meios específicos, longo período de incubação, particularmente se a placa inicial do cultivo apresentar crescimento abundante da flora contaminante. A sensibilidade do isolamento e análises bioquímicas estão relacionadas com a quantidade de organismos presentes na amostra, sendo que o limite de detecção no isolamento é de

10^6 UFC/g para a *B. hyodysenteriae* e de 10^5 UFC/g para a *B. pilosicoli* (Stege et al., 2000; Fellström et al., 2001). Animais com diarreias causadas por *Brachyspira* sp. excretam de 10^8 - 10^{10} UFC/g fezes, permitindo que estes organismos sejam detectados somente na fase aguda das doenças quando estão apresentando este sintoma (Neef et al., 1994). Já na fase assintomática, excretam apenas periodicamente níveis detectáveis nas fezes e, portanto, diminui a sensibilidade do teste o que dificulta a identificação das espiroquetas patogênicas (Stege et al., 2000). Embora as amostras utilizadas nesse estudo apresentassem histórico de diarreia no rebanho, não havia informações sob a condição individual das amostras coletadas e submetidas para análise.

Os medicamentos utilizados para prevenir ou tratar essas doenças, interferem negativamente na quantidade de organismos viáveis excretados, não sendo suficientemente detectáveis no cultivo (Haris et al., 2006). Neste estudo não foi considerado o uso de medicamentos para as análises, pois se intentou simular situações rotineiras de diagnóstico e também, porque as amostras foram analisadas de forma pareada entre os testes. Portanto, resultados negativos no cultivo bacteriano devem ser interpretados de forma cautelosa, para evitar diagnósticos equivocados.

A divergência encontrada entre as análises bioquímicas e os testes moleculares para determinar a espécie pode ser explicada pela dificuldade em se obter uma colônia isolada de cada amostra e pela dificuldade em obter quantidade suficiente em meio sólido para tal finalidade. O isolamento de mais de uma espécie de *Brachyspira* sp. dentro de um rebanho e até em um mesmo animal é comum causando equívocos no diagnóstico (Hampson et al., 1997). Rasback et al. (2006) relatam que a *B. pilosicoli* e a *B. innocens* não podem ser diferenciadas pela aparência da colônia, podendo causar equívocos na seleção da colônia para os teste bioquímicos, tornando-se um grande inconveniente do isolamento.

Alguns autores sugerem a utilização em conjunto do isolamento e o PCR para determinar as espécies de *Brachyspira* sp. em amostras de

fezes, pois, associam a especificidade do teste molecular à sensibilidade do cultivo devido à propagação prévia da bactéria (Fellstrom e Gunnarsson, 1995; Fellstrom et al. 1997; Fellstrom et al., 2001b). Neste estudo, essa combinação de testes foi realizada apenas para determinar a espécie de *Brachyspira* sp. isolada no cultivo bacteriano, já que a análise bioquímica não foi bem sucedida.

4.2. Histopatologia

Na microscopia as principais lesões encontradas para o grupo da *B. hyodysenteriae*, foram erosão acentuada do epitélio de revestimento da mucosa associada à necrose moderada, focos de hemorragia moderada, hiperplasia moderada de células caliciformes de criptas e infiltrado inflamatório neutrofílico moderado no lúmen de criptas com acúmulo acentuado de material basofílico amorfo, caracterizando o diagnóstico morfológico de enterite neutrofílica necrohemorrágica acentuada difusa associada a hiperplasia de células caliciformes. Estas lesões estão de acordo com as relatadas por Jacobson et al. (2004) e Harris et al. (2006) (Figura 2a). Para o grupo da *B. pilosicoli*, as principais lesões foram erosão acentuada do epitélio associada a hiperplasia acentuada de células caliciformes, acúmulo intenso de muco com dilatação de criptas e presença de bactérias na superfície do epitélio, formando a lesão conhecida como “falso bordo em escova”. Essas lesões também foram descritas por Trott et al. (1996) e

Duhamel (2001) (Figura 2b). Porém, essas alterações não foram evidentes em todos os casos, sendo encontradas em apenas duas dentre as dez avaliadas. Observou-se que a ausência dessa lesão pode ser atribuída à intensa erosão epitelial que ocorre em casos mais avançados, não permitindo, portanto a visualização do falso bordo em escova,

o que demonstra que o diagnóstico histopatológico apenas, não é suficiente para diagnosticar nenhuma das *Brachyspira* sp. e está passível de se confundir com outras formas de colite.

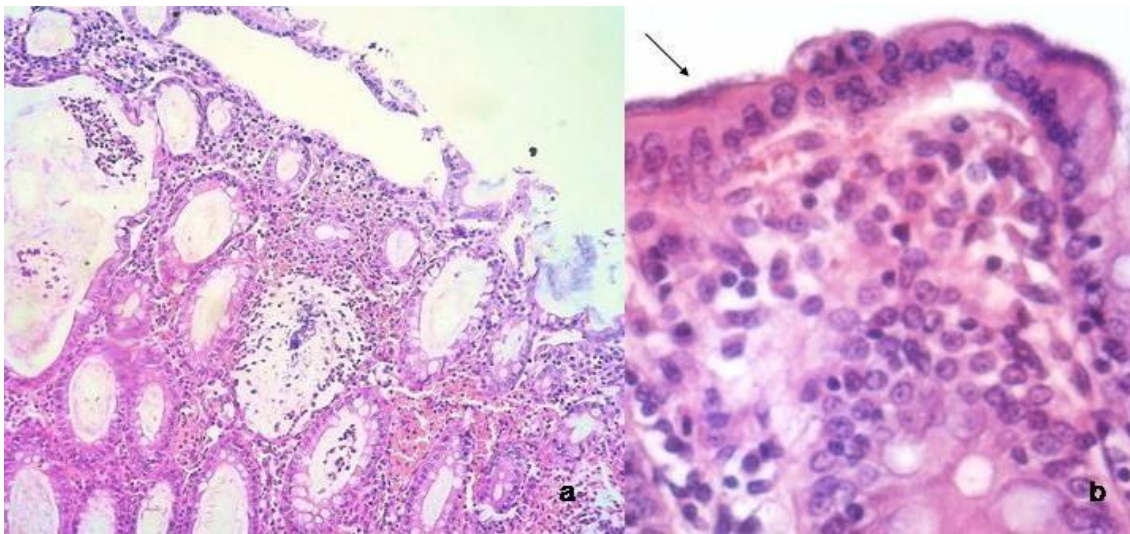


Figura 2 – a) Corte histológico de cólon de suíno acometido por Disenteria Suína. Notar a necrose superficial, acúmulo de exsudato catarral e intensa congestão da mucosa, H&E, 100x. b) Corte histológico de cólon de suíno acometido por Colite Espiroquetal. Presença de bactérias aderidas a mucosa intestinal, formando a lesão de “falso bordo em escova” (seta). H&E, 400x.

4.3. Reação em cadeia da polimerase

Na análise pela PCR, 23 dos 29 casos definidos como *B. hyodysenteriae* foram positivos para esta espécie, e 50% dos casos (5/10) foram positivos para *B. pilosicoli*, totalizando 71,7% de amostras positivas dentre as 39 incluídas no estudo (Tabela 4). Esses valores demonstram uma alta eficiência de diagnóstico, principalmente para a *B. hyodysenteriae*. A PCR foi estatisticamente

igual aos métodos de imuno-histoquímica e FISH no caso de *B. hyodysenteriae* diferindo apenas do isolamento.

La et al. (2006), com o desenvolvimento da PCR multiplex (M-PCR) para os organismos *L. intracellularis*, *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*, conseguiram aumentar a sensibilidade de diagnóstico desses organismos, com o limite de

detecção de 10^3 UFC/g de fezes, para qualquer um desses agentes, demonstrando ser mais sensível que o isolamento, o qual possui limite de 10^6 UFC/g fezes para a *B. hyodysenteriae* e de 10^5 UFC/g fezes para a *B. pilosicoli* (Stege, et al., 2000). Essa afirmação corrobora as observações deste estudo que obteve uma maior sensibilidade para a PCR, superior estatisticamente em relação ao isolamento. Ainda em relação a este último, a PCR demonstrou-se mais prática e rápida. No entanto, é importante ressaltar que para os estudos de susceptibilidade a antimicrobianos e identificação de novas espécies, o isolamento é fundamental e insubstituível (Atyeo et al., 1998; Rasback et al., 2006).

La et al. (2003), compararam a PCR duplex (D-PCR) aplicados em DNA extraídos de

fezes com DNA extraídos de uma pré-cultura, e obtiveram uma maior quantidade de detecção no primeiro, e comenta que essa vantagem é devido ao método de extração de DNA por kit, que possui uma etapa de retirada de inibidores da PCR. Dessa forma, a PCR obteve uma maior sensibilidade e maior rapidez de detecção desses agentes, semelhante à este estudo. Ainda relata que os custos das duas técnicas são compatíveis e que a economia da PCR em relação ao isolamento deve-se ao menor tempo de manipulação e de menor utilização de componentes laboratoriais. Ademais, conseguiram boa especificidade desta D-PCR, e relatam que não houve reação cruzada entre outras espécies do mesmo gênero avaliadas. Neste estudo, também se observou que a PCR duplex foi capaz de distinguir de forma eficiente ambas espiroquetas patogênicas (Figura 3).

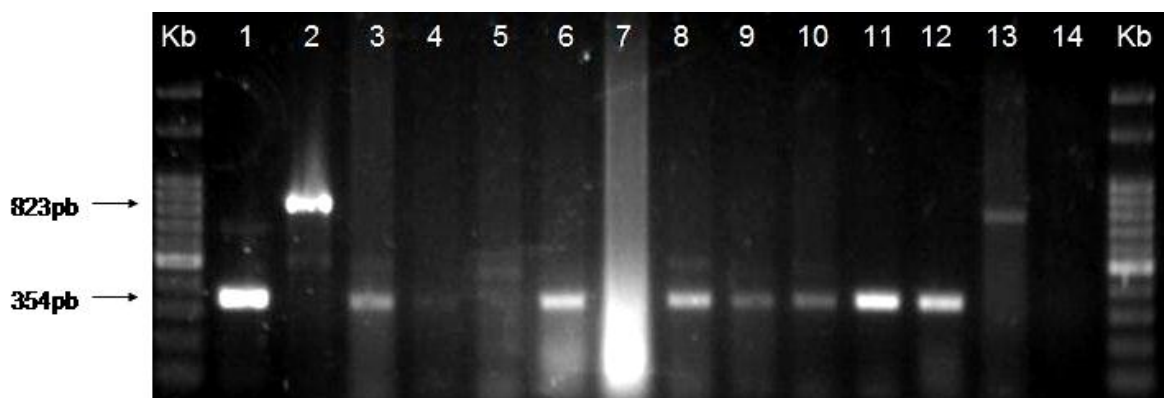


Figura 3 – Gel de agarose 1%, PCR duplex. Kb, marcadores de pesos moleculares de 100pb; 1, controle positivo de *B. hyodysenteriae* (354pb); 2, controle positivo para *B. pilosicoli* (823pb); colunas 3,4,6,8,9,10,11,12, infecção por *B. hyodysenteriae*, coluna 13, infecção por *B. pilosicoli*, coluna 5 e 7 amostras negativas, coluna 14 controle negativo.

Rasback et al. (2006) fizeram um estudo comparativo entre o isolamento e a D-PCR para a *B. hyodysenteriae* e para a *B. pilosicoli*. Seus resultados mostraram que há diferença entre os testes para cada espécie, sendo que o isolamento foi melhor para a detecção de *B. hyodysenteriae* e o D-PCR é melhor para a *B. pilosicoli*. Em nosso estudo, a PCR foi superior para detecção de ambas as espécies. A divergência encontrada no grupo da *B. hyodysenteriae* pode ser atribuída a maior experiência na execução do cultivo bacteriano encontrada nos laboratórios que já possuem a técnica otimizada e a possível interferência de resíduos de antimicrobianos nas amostras testadas em nosso estudo.

Embora a técnica de PCR tenha apresentado bons índices de detecção, ainda houve amostras que foram negativas. Segundo Boye et al. (2001), esses resultados negativos podem ser atribuídos ao dano ou quantidade insuficiente de DNA na amostra fecal. Devido à alta sensibilidade dessa técnica, Ladinig et al. (2009) citam que a PCR é uma boa ferramenta em estudos epidemiológicos, pois são capazes de identificar animais com infecções sub-clínicas. Em nosso estudo, todos os animais submetidos à avaliação apresentavam histórico de diarreia, o que pode ter contribuído com a grande quantidade de detecção encontrada.

Gebhart e Primus (2011) citam que a utilização do PCR duplex para a *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* não identificaram

mais de 70% das amostras positivas no cultivo de amostras clínicas, que apresentavam quadro de diarreia. Em análise filogenética da região 16SrDNA estas novas espécies não foram compatíveis com as espécies já estabelecidas atualmente. Estes autores acreditam que há outras espécies de *Brachyspira* sp. patogênicas, fortemente hemolíticas e associadas com doenças entéricas e que ainda não foram tipificadas, nem desenvolvido um teste molecular específico para estas. Devido ao seu potencial virulento e característica fortemente hemolítica em ágar sangue, sugeriram o nome de “*novel strongly hemolytic Brachyspira species– NSH*” (novas espécies de *Brachyspira* fortemente hemolítica). Um estudo preliminar e retrospectivo dos casos indicaram uma alta relação entre o envolvimento dessas espécies com a condição de diarreia sanguinolenta. Devido a essa recente descoberta, não há nenhum relato deste quadro no Brasil e nem um teste específico para detectá-las. Mais estudos de caracterização fenotípicas e moleculares devem ser feitos.

4.4. Hibridização fluorescente *in situ*

O diagnóstico de *B. hyodysenteriae* pela FISH foi de 72,4% (21/29) dos casos avaliados. Quando comparada aos demais testes, foi estatisticamente diferente apenas do isolamento, apresentando capacidade superior de detecção. A presença da *B. pilosicoli* foi identificada em 70% (7/10) das amostras desse grupo (tabela 4).

A visualização dos microrganismos no tecido avaliado foi facilmente detectada devido a grande distinção entre a autofluorescência do tecido em relação ao sinal de fluorescência emitido pela sonda anexada na bactéria (Figura 4). A utilização de sondas em bactérias intactas permite o reconhecimento histológico e a informação morfológica do microrganismo de

forma específica. Além disso, devido à utilização de alvos como o rRNA, as sondas somente irão permanecer anexadas em bactérias que estavam vivas no momento da fixação, o que demonstra ser uma grande vantagem da FISH sobre a PCR (Boye et al., 1998).

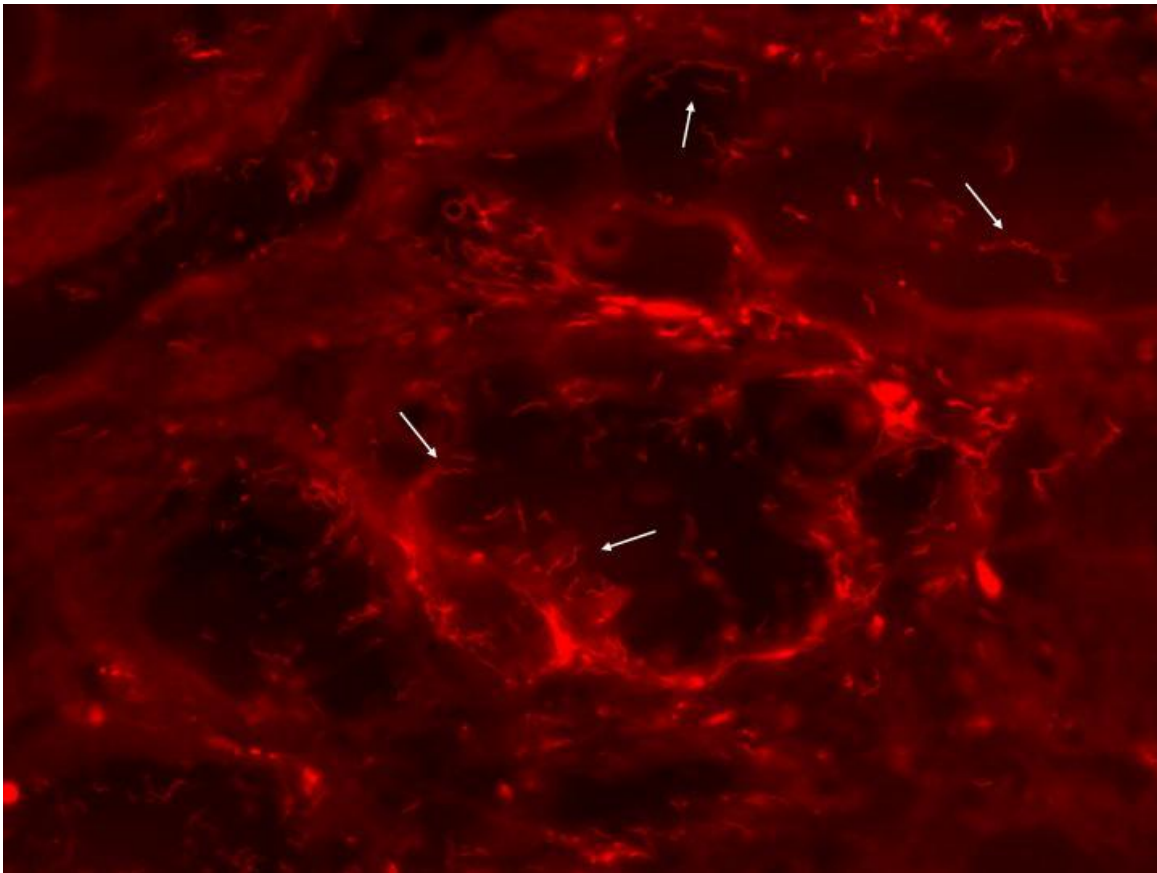


Figura 4 – Detecção específica de *B. hyodysenteriae* em suíno com Disenteria Suína, hibridizada com sonda específica marcada com Cy3. As bactérias são observadas entre as células da mucosa do cólon, 1000x (setas).

Embora as bactérias tenham alcançado limites detectáveis na FISH, houve uma dificuldade maior em diagnosticar a *B. pilosicoli*,

utilizando a sonda marcada com Cy3. Essa dificuldade também foi encontrada por Boye et al. (1998), que relatam que apesar do sinal das sondas

serem detectáveis, as imagens apareciam “ofuscadas”. Nesse estudo, para evitar equívocos na leitura da FISH quando utilizada a sonda para *B. pilosicoli*, fez-se a troca dos filtros FITC e Cy3,

pois estes são específicos para cada sonda e não emitem sinal caso esteja utilizando outro filtro (Moter e Gobel, 2000) (Figura 5).

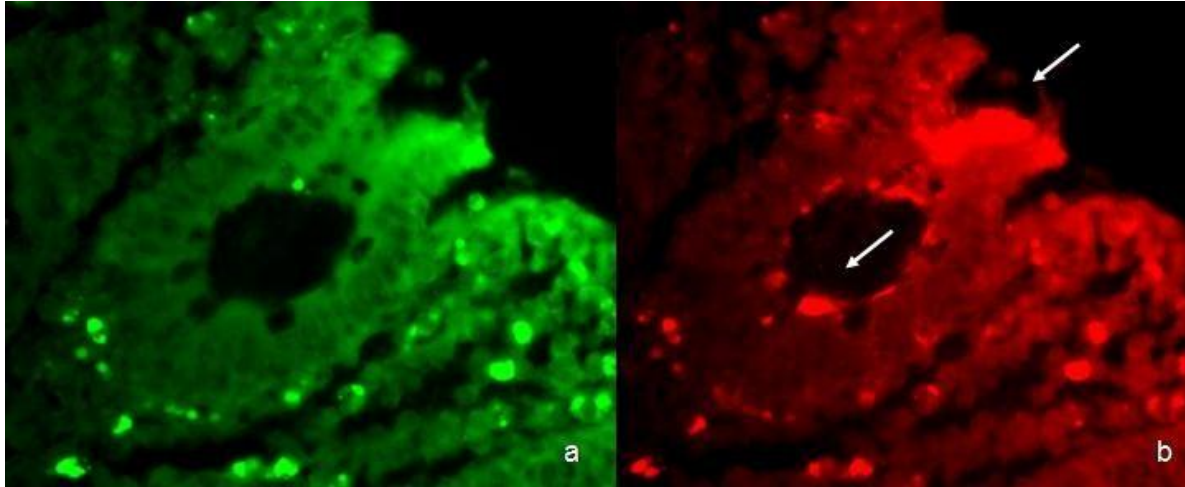


Figura 5 - Corte histológico de cólon de suíno com Colite Espiroquetal sob microscopia fluorescente, 400x a) Filtro para fluorocromo FITC sem sinal detectável. b) Filtro para fluorocromo Cy3 e a visualização de sinal forte no lúmen de cripta e na superfície epitelial (setas).

Boye et al. (1998) ainda relatam que a sensibilidade da FISH é extremamente alta, podendo detectar até uma única célula, desde que esta esteja presente no campo de exame microscópico. Porém, esses autores não tiveram problema em relação à quantidade de bactérias detectadas por campo, embora relatem que a densidade de *B. hyodysenteriae* tenha sido superior à da *B. pilosicoli*, facilitando a detecção da primeira. Nesse estudo, essa diferença entre as densidades também foi notada, porém não impediu o diagnóstico da *B. pilosicoli*. Nesses casos, é importante que o avaliador tenha conhecimento sobre as possíveis lesões das

doenças e da localização das bactérias no tecido para facilitar a detecção do sinal fluorescente.

4.5. Imuno-histoquímica

Dos 29 casos avaliados para o grupo de *B. hyodysenteriae*, 79,3% (23/29) apresentaram marcação positiva na técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpos que detectam o gênero, e 90% dos casos (9/10) no grupo de *B. pilosicoli*. No entanto, devido à não possibilidade de identificação de espécies foram considerados os valores totais de identificação do gênero em relação ao total de amostras avaliadas. Das 39 amostras, 82% dos casos (32/39) tiveram

marcação positiva, sendo o teste com maior índice de detecção dos agentes, embora não tenha tido diferença estatística em relação à FISH e a PCR (tabela 4).

Paulovich et al. (2004) fizeram um estudo comparativo entre a técnica de coloração pela prata e imuno-histoquímica com anticorpo policlonal, e observaram que a imuno-

histoquímica obteve maiores índices de detecção da *B. pilosicoli*, sem a interferência de coloração de fundo inespecífica. Neste estudo, a presença das espiroquetas foi facilmente visualizada, demonstrando ser uma técnica sensível para ambas *Brachyspira* sp. patogênicas (Figura 6).

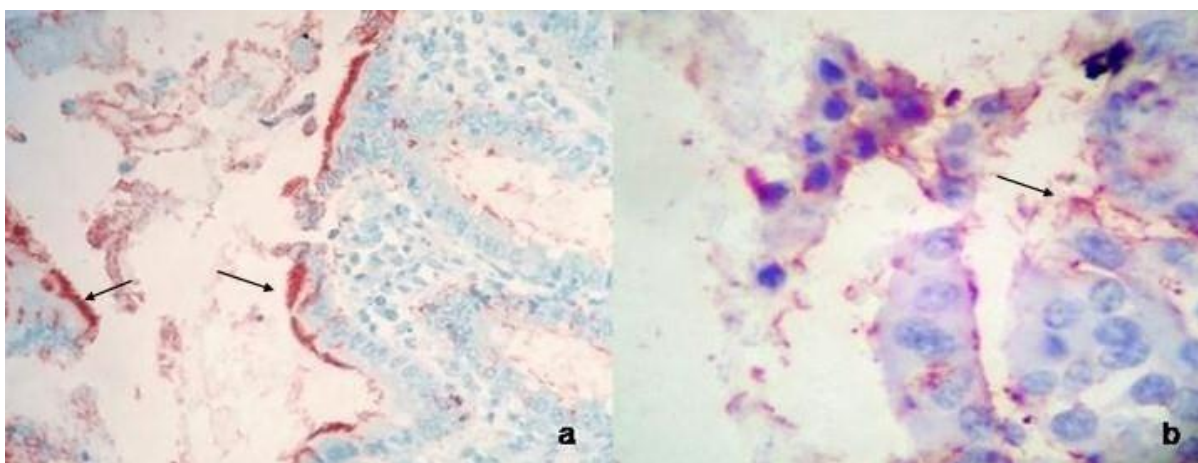


Figura 6 – Fragmentos de cólon de suínos marcados (setas) por imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal produzido em coelho (cedido pelo Prof. David Barcellos da UFRGS). Nota-se a marcação em tecido de animal infectado com a) *B. pilosicoli*, 200x e b) Suíno infectado com *B. hyodysenteriae*, 400x.

Apesar da alta sensibilidade observada na imuno-histoquímica nesse estudo, os anticorpos específicos para o gênero ou as espécies de *Brachyspira* sp. não estão disponíveis comercialmente, impedindo que essa técnica seja largamente implantada em laboratórios de diagnóstico. Sob essas circunstâncias, a FISH pode ser uma alternativa, já que a confecção de sondas é altamente disponível, de fácil acesso e custo razoável (Ladinig et al., 2008).

Comparando ainda a FISH com a imuno-histoquímica, a FISH tem a vantagem de ser mais específica e sensível, sem sofrer influência da grande variação de sensibilidade e especificidade entre os kits comerciais disponíveis, além dos erros de fixação e processamento do tecido que podem levar a resultados equivocados na imuno-histoquímica, com marcações inespecíficas ou falso-negativos. No entanto, a FISH tem a desvantagem de necessitar de equipamentos modernos e dispendiosos, como os filtros

epifluorescentes no microscópio. Além disto, as preparações não são permanentes e exige outros meios de armazenar os resultados, já que a fluorescência é limitada ao um curto período de tempo (Sui et al., 2009). Neste trabalho, todos os equipamentos necessários para o FISH estavam disponíveis e não houve nenhum impedimento, portanto para se executar a técnica.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que o isolamento é uma técnica laboriosa e passível de resultados falsos-negativos.

A técnica de imuno-histoquímica utilizando os anticorpos policlonais usados para esse estudo, apresentou-se eficiente para detecção de *Brachyspira* sp. porém não permite determinar a espécie causadora da doença. Já as técnicas de PCR e FISH foram capazes de identificar as espécies, sendo consideradas, portanto ferramentas úteis para o diagnóstico de rotina das *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* em suínos com diarreias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.; FUCHS, B.M. Single-cell identification by improved FISH. *Nature reviews Microbiology*, v.6, p.339-348, 2008. doi:10.1038/nrmicro1888.

AMANN, R.; FUCHS, B.M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence

in situ hybridisation. *Environmental biotechnology*, v. 12, p. 231–236, 2001.

ATYEO, R. F.; OXBERRY, S. L.; COMBS, B. G. et al. Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 26, p. 126–130, 1998.

BACCARO, M. R., MORENO, A. M., SHINYA, L. T. et al. Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finishing pigs. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 225-229, 2003.

BACKHANS, A.; JANSSON, D. S.; ASPAN, A. et al. Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Vet. Microbiol.*, v. 153, p. 156-162, 2011. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.023

BACKHANS, A.; JOHANSSON, K.; FELLSTRÖM, C. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from wild rodents. *Environ. Microbiol. Reports*, v. 2, n. 6, p. 720–727, 2010. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00165.x

BARCELLOS, D. E. S. N.; MATHIESEN, M. R.; UZEDA, M. et al. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet. Rec.*, v. 146, p. 398-403, 2000.

BARCELLOS, D. E. S. N.; RAZIA, L. E.; BOROWSKI, S. M. Ocorrência e identificação de espiroquetas intestinais em suínos em granjas de porte industrial de duas regiões criatórias do estado do Rio Grande do Sul, em relação à medicação da ração. *Cienc. Rural*, v. 33, n. 4, p. 725-729, 2003.

BARTH, S.; GOMMEL, M.; BALJER, G. et al. Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. *Vet. Microbiol.*, (2011) doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.032

BOTARI, B. ERCOLINI, D.; GATTI, M. et al. Application of FISH technology for microbiological. *Appl. Microbiol. Biot.*, v. 73, p. 485-494, 2006. doi: 10.1007/s00253-006-0615-z.

BOUTRUP, T. S.; BOESEN, H. T.; BOYE, M.; et al., Early Pathogenesis in Porcine Proliferative Enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Comp. Pathol.*, v.143, p.101-109, 2010. doi:10.1016/j.jcpa.2010.01.006

BOYE, M.; BALODA, S. B.; LESER, T. D. et al. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet. Microbiol.*, v. 81, p. 33-40, 2001.

BOYE, M.; JENSEN, T. K.; MØLLER, K. et al. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA in situ hybridization. *Mol. Cell. Probe.*, v. 12, p. 323–330, 1998.

CALDERARO A.; Merialdi, G; PERINI, S. et al. A novel method for isolation of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Vet. Microbiol.* v. 80, p. 47-52, 2001.

CORONA-BARRERA, E.; SMITH, D. G. E.; LA, T. et al. Immunomagnetic separation of the intestinal spirochaetes *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira hyodysenteriae* from porcine faeces. *J. Med. Microbiol.*, v. 53, p. 301–307, 2004. doi : 10.1099/jmm.0.055 00-0

DUHAMEL, G. E. Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis. *Anim. Health Res.Rev.*, v. 2, n. 1, p. 3–17, 2001. doi: 10.1079/AHRR200128

DUHAMEL, G. E. Understanding of colitis in swine improved. Section 4, *Perspectives on Swine Disease Management*, Novartis Animal Health, Basel, Switzerland, p. 1-6, 2005.

DUHAMEL, G. E. Impact of Colonic *Brachyspira* Spirochete Host Range on Transmission of Multidrug Resistant Clinical Isolates. In: CARLOS PIJOAN SYMPOSIUM ON SWINE DYSENTERY. 2011, Saint Paul. *Anais...* Saint Paul, Minnesota, 2011. p. 1-4.

DURAND, S.; MURPHY, C.; ZHANG, Z.; et al., Epithelial Distribution and Replication of Foot-and-Mouth Disease Virus RNA in Infected Pigs. *J. Comp. Pathol.*, v. 139, p. 86-96, 2008. doi:10.1016/j.jc pa.2008.05.004

FELLSTROM, C.; GUNNARSSON, A. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Res. Vet. Sci.*, v. 59, p. 1-4, 1995.

FELLSTROM, C.; PETTERSSON, B.; THOMSON, J. et al. Identification of *Serpulina* Species Associated with Porcine Colitis by Biochemical Analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, n. 2, p. 462–467, 1997.

FELLSTROM, C.; PETTERSSON, B.; UHLEN, M. et al. Phylogeny of *Serpulina* based on sequence analyses of the 16SrRNA gene and comparison with a scheme involving biochemical classification. *Res. Vet. Sci.*, v. 59, p. 5-9, 1995.

FELLSTRÖM, C.; PETTERSSON, B.; ZIMMERMAN, U. et al. Classification of *Brachyspira* spp. Isolated from Swedish dogs. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 2, n. 1, p. 75–82, 2001a. doi: 10.1079/AHRR200119

FELLSTRÖM, C.; ZIMMERMAN, U.; ASPAN, A. et al. The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 2, n. 1, p. 37–43. 2001b. doi: 10.1079/AHRR200120

GEBHART, C; PRIMUS, A. *Brachyspira* species: Diagnostic and Molecular Epidemiology. In: CARLOS PIJOAN SYMPOSIUM ON SWINE DYSENTERY. 2011, Saint Paul. Anais... Saint Paul, Minnesota, 2011. p. 15-17.

GLOCK, R. D.; HARRIS, D. L.; KLUGE, J. P. Localization of Spirochetes with the Structural Characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the Lesions of Swine Dysentery. *Infec. Immun.*, v. 9, n.1 p. 167-178, 1974.

GOOKIN, J. L; STONE, M. R.; YAEGER, M. J. et al., Fluorescence in situ hybridization for identification of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed and paraffin-embedded histological specimens of intestinal trichomonosis. *Vet. Parasitol.* v. 172, p. 139–143, 2010. doi:10.1016/j.vetpar.2010.04.014

GUEDES, R. M. C. Controle racional das diarreias de recria e terminação. *Acta Scientiae Veterinariae.* v. 38, sup. 1 1, p. 247-253, 2010.

GUEDES, R. M. C.; BARCELLOS, D. E. S. N. Disenteria suína. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. (Ed.) *Doenças dos suínos*. Goiania : Ed. Canone, 2007. p.82-88.

HAMPSON, D. J.; ATYEO, R. F.; COMBS, B. G. Swine Dysentery. In: HAMPSON, D. J.; STANTON, T. B (Ed). *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. 1. ed. Wallingford, Oxon: CAB International, 1997. cap.7, p.175-210.

HAMPSON, D. J.; TROTT, D. J. Spirochetal Diarrhea/Porcine Intestinal Spirochetosis. In: STRAW, B. E. (Ed.); ZIMMERMAN, J. J. (Ed.); D'ALLAIRE, S. (Ed.) et al. *Diseases Of Swine*. 9. ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2006. cap. 40, p. 553-562.

HANSEN, C. F.; HERNANDEZ, A.; MANSFIELD, J. et al. A high dietary concentration of inulin is necessary to reduce the incidence of swine dysentery in pigs experimentally challenged with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Br. J. Nutr.*, v. 106, p. 1506–1513, 2011a. doi:10.1017/S000711451100208X

HANSEN, M. S.; RODOLAKIS, A.; COCHONNEAU, D. et al. *Coxiella burnetii* associated placental lesions and infection level in parturient cows. *Brit. Vet. J.*, 2011b. doi: 10.1016/j.tvjl. 2010.12. 021

HARRIS, D. L.; HAMPSON, D. J.; GLOCK, R. D. Swine Dysentery. In: STRAW, B. E. (Ed.); ZIMMERMAN, J. J. (Ed.); D'ALLAIRE, S. (Ed.) et al. *Diseases Of Swine*. 9. ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2006. cap. 42, p. 579-600.

HOMMEZ, J.; CASTRYCKA, F.; HAESEBROUCKB, F. et al. Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. *Vet. Microbiol.*, v. 62, p. 163-169, 1998.

HYATT, D. R; HUURNE, A. A.; VAN DER ZEIJST, B. A. et al. Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs

against challenge with a virulent strain. *Infect. Immun.* v. 62, n. 6, p. 2244-2248, 1994.

JACOBSON, M.; FELLSTROM, C.; LINDBERG, R. et al., Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J. Med. Microbiol.*, v. 53, p. 273–280, 2004. doi 10.1099/jmm.0.05323-0

JANSSON, D. S.; BRÖJER, C.; GAVIER-WIDÉN, D. et al. *Brachyspira* spp. (*Serpulina* spp.) in birds: a review and results from a study of Swedish game birds. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 2, n. 1, p. 93–100, 2001.

JANSSON, D. S.; JOHANSSON, K.; OLOFSSON, T. et al. *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Med. Microbiol.*, v. 53, p. 293–300, 2004. doi: 10.1099/jmm.0.05488-0

JANSSON, D. S.; RASBACK, T.; FELLSTROM, C. et al. Experimental Challenge of Mallards (*Anas platyrhynchos*) with *Brachyspira hyodysenteriae* and “*Brachyspira suanatina*” Isolated from Pigs and Mallards. *J. Comp. Path.* v. 141, p. 211-222, 2009.

JENSEN, T. K.; BOESEN, H. T.; VIGRE, H. 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. *J. Comp. Pathol.*, v.142, p.1-8, 2010a. doi:10.1016/j.jcpa.2009.04.001

JENSEN, T. K.; CHRISTENSEN, A. S.; BOYE, M. *Brachyspira murdochii* Colitis in Pigs. *Vet. Pathol.*, v. 47, n. 2, p. 334-338, 2010b.

JENSEN, T. K.; MOLLER, K.; BOYE, M., et al. Scanning Electron Microscopy and Fluorescent In Situ Hybridization of Experimental *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* Infection in Growing Pigs. *Vet. Pathol.* v. 37, p. 22–32, 2000. doi: 10.1354/vp.37-1-22

JOENS, L. A. Virulence Factors Associated with *Serpulina hyodysenteriae*. In: HAMPSON, D. J.; STANTON, T. B (Ed). *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. 1. ed. Wallingford, Oxon: CAB International, 1997. cap. 6, p. 151-174.

KENNEDY, M. J.; ROSEY, E. L.; YANCEY, R. J. Characterization of flaA3 and flaB3 mutants of *Serpulina hyodysenteriae* : both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility and intestinal colonization. *Fems. Microbiol. Lett.*, v. 153, p. 119-128, 1997.

KENNEDY, M. J.; ROSNICK, D. K.; ULRICH, R. G. et al. Association of *Treponema hyodysenteriae* with Porcine Intestinal Mucosa. *J. Gen. Microbiol.*, v. 134, p. 1565-1576, 1988.

KENNEDY, M. J.; YANCEY, R. J. Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*. *Vet. Microbiol.*, v. 49, p. 21-30, 1996.

KIRKWOOD, R. N.; HUANG, S. X.; MACFALL, M. et al. Dietary factors do not influence the clinical expression of swine dysentery. *Swine Health Prod.* v. 8, n. 2, p. 73-76, 2000.

LA, T, COLLINS, A. M.; PHILLIPS N. D et al., Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 42, p. 284–288, 2006.

- LA, T.; PHILLIPS, N. D.; HAMPSON, D. J. Development of a Duplex PCR Assay for Detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in Pig Feces. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 7, p. 3372–3375, 2003.
- LA, T.; PHILLIPS, N. D.; HAMPSON, D. J. Evaluation of recombinant Bhlp29.7 as an ELISA antigen for detecting pig herds with swine dysentery. *Vet. Microbiol.*, v. 133, p. 98-104, 2009.
- LA, T., PHILLIPS, N. D.; WANCHANTHUEK, P. et al., Evidence that the 36 kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence. *Vet. Microbiol.* (2011), doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.053
- LADINIG, A.; SOMMERFELDSTUR, I.; WEISSENBOCK, H. Comparative Evaluation of Diagnostic Methods for *Lawsonia intracellularis* Infection in Pigs, with Emphasis on Cases Lacking Characteristic Lesions. *J. Comp. Path.*, v. 140, p. 140-148, 2009.
- LEE, J.; HAMPSON, D. The prevalence of intestinal spirochaetes in dogs. *Aust. Vet. J.*, v. 74, p. 466–467, 1996. doi: 10.1111/j.1751-0813.1996.tb07574.x
- LEFMANN, M.; SCHWEICKERT, B.; BUCHHOLZ, P. et al. Evaluation of Peptide Nucleic Acid-Fluorescence In Situ Hybridization for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria in Clinical Specimens and Tissue Sections. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 10, p. 3760–3767, 2006. doi:10.1128/JCM.01435-06
- LIEBLER-TENORIO E. M., POHLENZ, J. F., WHIPP S. C. Diseases of the Digestive System. In: STRAW, B. E. (Ed.); ZIMMERMAN, J. J. (Ed.); D'ALLAIRE, S. (Ed.) et al. *Diseases Of Swine*. 9. ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2006. cap.57, p.821-832.
- LOBOVA, D.; PRASEK, J.; CIZEK, A. et al. Evaluation of the use of recombinant Bhlp29.7 in immunoblotting with pig serum as a means to identify herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 53, p. 466–472, 2011.
- LUNA, L. G. *Routine Staining Procedures: Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw- Hill Book Co, 1968. p. 24-58.
- MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.. *Cienc. Rural*, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.
- MILNER, J. A.; SELLWOOD, R. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 4095-4099, 1994.
- MOTER, A.; GOBEL, U.B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.*, v. 41, p. 85–112, 2000.
- MOTRO, Y.; LA, T.; BELLGARD, M. I. et al. Identification of genes associated with prophage-like gene transfer agents in the pathogenic intestinal spirochaetes *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia*. *Vet. Microbiol.* v. 134, p. 340–345, 2009.

MÜLLER, K.; JENSEN, T. K.; JORSAL, S. E. et al. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet. Microbiol.*, v. 62, p. 59-72, 1998.

MUNIAPPA N.; MATHIESEN, M. R.; DUHAMEL, G. E. Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 9, p. 165-171, 1997.

NARESH, R.; HAMPSON, D. J. Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. *Microbiology+*, v. 156, p. 191-197, 2010. doi 10.1099/mic.0.030262-0

NEEF, N. A.; LYSONS, R. J.; TROTT, D. J. et al. Pathogenicity of Porcine Intestinal Spirochetes in Gnotobiotic Pigs. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 6, p. 2395-2403, 1994.

NORDHOFF, M.; RUHE, B.; KELLERMEIER, C. et al. Association of *Treponema* spp. with canine periodontitis. *Vet. Microbiol.* v. 127, p. 334-342, 2008. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.011

NOVOTNÁ, M.; ŠKARDOVÁ, O. *Brachyspira hyodysenteriae*: detection, identification and antibiotic susceptibility. *Vet. Med. – Czech*, v. 47, n. 4, p. 104-109, 2002.

OXBERRY, S. L.; HAMPSON, D. J. Colonisation of pet shop puppies with *Brachyspira pilosicoli*. *Vet. Microbiol.* v. 93, p. 167-174, 2003.

PAULOVICH, F. B.; BOROWSKI, S. M.; DRIEMEIER, D. et al. Avaliação da patogenicidade de amostras de *Brachyspira*

pilosicoli através de técnicas histopatológicas convencionais e por imuno-histoquímica. *Pesq. Vet. Bras.* v. 24, n. 2, p. 144-148, 2004.

PLOEG, M. Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. *Eur. J. Histochem.*, v. 44, p. 7-42, 2000.

PORS, S.E.; HANSEN, M.S.; BISGAARD, M. et al. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. *Vet. Microbiol.* v. 150, p. 160-166, 2011a. doi:10.1016/j.vetmic.2011.01.005

PORS, S. E.; CHADFIELD, M. S.; SØRENSEN, D. B. et al., Pathology, Tissue Metalloproteinase Transcription and Haptoglobin Responses in Mice after Experimental Challenge with Different Isolates of *Pasteurella multocida* Obtained from Cases of Porcine Pneumonia. *J. Comp. Pathol.*, 2011b. doi:10.1016/j.jcpa.2011.01.002

RÅSBÄCK, T.; FELLSTRÖM, C.; GUNNARSSON, A. et al. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J. Microbiol. Meth.*, v. 66, p. 347-353, 2006.

RÅSBÄCK, T.; JANSSON, D. S.; JOHANSSON, K.-E. et al. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environmental Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 983-991, 2007.

SCHWARTZ, K. Swine Dysentery: Clinical Signs and Lesions Historical vs. Current Cases. In: CARLOS PIJOAN SYMPOSIUM ON SWINE DYSENTERY. 2011, Saint Paul. Anais... Saint Paul, Minnessota, 2011. p. 7-11.

- STANTON, T. B. The Genus *Brachyspira*. In: *Prokaryotes*. 7ed., 2006, cap. 4.6, p. 330–356. doi: 10.1007/0-387-30747-8_12
- STANTON, T. B.; JENSEN, N. S. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.*, v. 175, p. 2980-2987, 1993.
- STANTON, T. B.; ROSEY, E. L.; KENNEDY, M. J. et al. Isolation, Oxygen Sensitivity, and Virulence of NADH Oxidase Mutants of the Anaerobic Spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, Etiologic Agent of Swine Dysentery. *Appl. Environ. Microb.*, v. 65, n. 11, p. 5028–5034, 1999.
- STANTON, T. B.; SELLWOOD, R. Cloning and Characteristics of a Gene Encoding NADH Oxidase, a Major Mechanism for Oxygen Metabolism by the Anaerobic Spirochete, *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Anaerobe*, v. 5, p. 539-546, 1999.
- STEGE, H.; JENSEN, T. K.; MÜLLER, K. et al. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev. Vet. Med.* v. 46, p. 279-292, 2000.
- SUI, W.; OU, M.; CHEN, J. et al. Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 7, 2009. doi:10.1186/1477-7819-7-83
- SWIGER R. R.; TUCKER J. D. Fluorescence *in situ* hybridization: a brief review. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 27, p. 245–254, 1996.
- TAYLOR, D. J. Swine dysentery. In: _____. *Pig diseases*. 5ed. Cambridge: The Burlington Press, 1990. cap. 5, p. 71-172.
- TAYLOR, D. J.; ALEXANDER, T. J. L. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br. Vet. J.* v. 127, n. 11, p. 58-61, 1971.
- TAYLOR, D. J.; SIMMONS, J. R.; LAIRD, H. M. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.* v. 106, n. 2, p. 326-332, 1980.
- TAYLOR, D. J.; TROTT, D. J. Porcine Intestinal Spirochaetosis and Spirochaetal Colitis In: HAMPSON, D. J.; STANTON, T. B (Ed). *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. 1. ed. Wallingford, Oxon: CAB International, 1997. cap.8, p.211-242.
- THOMSON, J. R.; SMITH, W. J.; MURRAY, B. P. Pathogenicity of Three Strains of *Serpulina pilosicoli* in Pigs with a Naturally Acquired Intestinal Flora. *Infect. Immun.*, v. 65, n. 9, p. 3693–3700, 1997.
- THOMSON, J. R.; SMITH, W. J.; MURRAY, B. P. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Vet. Rec.*, v. 142, p. 235-239, 1998. doi: 10.1136/vr.142.10.235
- TOWNSEND K. M.; GIANG, V. N; STEPHENS, C. Application of nox-restriction fragment length polymorphism for the differentiation of *Brachyspira* intestinal spirochetes isolated from pigs and poultry in Australia. *J. Vet. Diagn. Invest.* v. 17, p. 103–109, 2005.
- TROTT, D. J.; HUXTABLE, C. R.; HAMPSON, D. J. Experimental Infection of Newly Weaned Pigs with Human and Porcine Strains of *Serpulina*

pilosicoli. *Infec. Immun.*, v. 64, n. 11, p. 4648–4654, 1996a.

TROTT, D. J.; JENSEN, N. S.; GIRONS, I. S. et al. Identification and Characterization of *Serpulina pilosicoli* Isolates Recovered from the Blood of Critically Ill Patient *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, n. 2, p. 482–485, 1997.

TROTT, D. J.; STANTON, T. B.; JENSEN, N. S. et al. *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the Agent of Porcine Intestinal Spirochetosis. *Int. J. Syst. Bacteriol*, v. 46, n. 1, p. 206-215. 1996b.

VIOTT, A. *Prevalência de enteropatógenos em suínos de recria/terminação em Minas Gerais e desenvolvimento de modelo experimental de Lawsonia intracellularis em camundongos (Mus musculus)*. 2010. 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VOLPI, E. V.; BRIDGER, J. M. FISH glossary: an overview of the fluorescence *in situ* hybridization technique. *BioTechniques*, v.45, p.385-409, 2008. doi 10.2144/000112811.

WHITING, R. A.; DOYLE, L. P.; SPRAY, R. S. Swine dysentery. *Purdue Univ. Agric. Exp. Stn. Bul.l* v. 257, p. 3-15, 1921.

ZHANG, P.; CHENG, X.; DUHAMEL, G. E. Cloning and DNA Sequence Analysis of an Immunogenic Glucose-Galactose MglB Lipoprotein Homologue from *Brachyspira pilosicoli*, the Agent of Colonic Spirochetosis. *Infec. Immun*, v. 68, n.8, p. 4559–4565, 2000.

ZLOTOWSKI, P., DRIEMEIER, D., BARCELLOS, D. E. S. N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 36, sup. 11, p. 81-86, 2008.

Anexo 1

Protocolo de imuno-histoquímica para *Brachyspira* sp.

1. Xilol I - 20 minutos
2. Xilol II - 20 minutos
3. Álcool 100% - 2 minutos
4. Álcool 96% - 2 minutos
5. Álcool 80% - 2 minutos
6. Álcool 70% - 2 minutos
7. Água destilada
8. Peróxido de hidrogênio 3% - 5 minutos (diluir em água destilada até a concentração de 3%)
9. Lavar com TBS
10. Recuperação antigênica: tripsina 0,1% (diluída em PBS) por 10 minutos a 37°C, escorrer e deixar a lâmina em tampão citrato (pH6). Deixar por 2 minutos em microondas na potência máxima, evitando evaporar. Controlar pingando TBS quando ferver. Deixar esfriar.
11. Bloqueio de reação inespecífica: leite desnatado 5% (diluir em PBS) por 15 minutos.
12. Lavar com TBS
13. Anticorpo primário policlonal: 1/6000 diluído em PBS por 45 minutos em 37°C.
14. Lavar com TBS
15. Anticorpo secundário, 2 minutos em temperatura ambiente
16. Lavar com TBS
17. Streptoavidina, por 20 minutos em temperatura ambiente
18. Lavar com TBS
19. Solução AEC, em câmara úmida por 10 minutos em temperatura ambiente.
20. Água destilada 5 minutos
21. Água torneira 5 minutos
22. Hematoxilina de Mayer, por até um minuto
23. Água corrente 5/10 minutos
24. Montagem da lâmina com meio aquoso, (Faramount)

Tampão Citrato

- um litro de água destilada

- 2,1 gramas de ácido cítrico
- ajustar pH para 6.0 com NaOH 0,5%.

TBS

- um litro de água destilada
- 1,3 gramas de Tris base (Sigma T-1503)
- 8,7 gramas de NaCl
- 6,0 gramas de Tris HCl (Sigma T-3253)