

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Matheus Dias Araújo

Padronização da técnica de microdiluição em caldo e avaliação da sensibilidade antimicrobiana a óleos essenciais para isolados brasileiros de *Brachyspira hyodysenteriae*

Belo Horizonte

2020

Matheus Dias Araújo

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E
AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA A ÓLEOS ESSENCIAIS
PARA ISOLADOS BRASILEIROS DE *Brachyspira hyodysenteriae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte

2020

A663p Araújo, Matheus Dias, 1988 -
Padronização da técnica de microdiluição da sensibilidade antimicrobiana a óleos essenciais
brasileiros de *Brachyspira hyodysenteriae* /Matheus Dias Araújo – 2020.
56p:il.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes

Dissertação de Mestrado apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de
Minas Gerais.

1- Suíno – Doenças - Teses - 2- Suíno – Diagnósticos – Teses - 3 – Controle antimicrobianos–
Teses - 4 – Ciência Animal – Teses - I – Guedes, Roberto Maurício Carvalho 2 - Universidade
Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III- Título.

CDD – 636.089

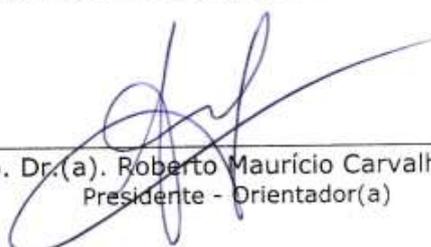
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

MATHEUS DIAS ARAÚJO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração .

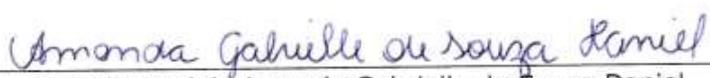
Aprovado(a) em 05 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Dr.(a). Roberto Maurício Carvalho Guedes
Presidente - Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a). Paula Roberta Giaretta



Prof(a). Dr.(a). Amanda Gabrielle de Souza Daniel

AGRADECIMENTOS

Agradecer é algo que deveríamos fazer diariamente em nossas vidas, pois a cada passo dado, recebemos o auxílio de todos aqueles ao nosso redor, mesmo que, naquele momento, acabe nos sendo “imperceptível”. E mesmo aqueles que, estando longe fisicamente, nos dão motivos para continuar diariamente nessa luta diária.

Não existe outro método de iniciar qualquer agradecimento sem antes citar Deus e sua miríade de espíritos benfeitores. Agradeço profusamente pela inspiração e força, cedidas nos momentos de dificuldade e dúvida, sempre orientando as melhores escolhas possíveis.

Aos meus pais e minha amada esposa, não tenho palavras o suficiente para descrever a gratidão que sinto por me suportar e auxiliar nesses dois anos, compreendendo minha opção de abandonar antigas escolhas e seguir aquilo que descobri como paixão. Aqui ainda aproveito para agradecer a família que me adotou no período fora do laboratório, cuja filha tirei do berço familiar para viver a centenas de quilômetros. Sem eles, jamais teria descoberto minha vontade insaciável de aprender e, mais ainda, de ensinar.

Ao grande orientador e um exemplo do que significa ser um professor, agradeço pela orientação e ensinamentos, que por si só valem mais do que qualquer pós-graduação que poderia ter feito. Aos grandes amigos, feitos na Patologia e fora dela, citando apenas alguns, como Ricardo, Amanda, Mirtha, Sóstenes (grande Sósó), Matheus, Leonardo e demais, que se fosse nominar demoraria mais tempo do que seria aconselhável, deixo não só meus agradecimentos, mas a certeza que carregarei nossas histórias por toda minha vida.

Agradeço aos irmãos que a vida me deu, Bobs, Diogo, Marcos e companhia, que mesmo em meus piores momentos, nunca deixaram de trazer a graça da situação à tona, nos fazendo rir como ninguém.

Aqui ainda cabe um agradecimento especial à Amanda, que participou grande parte no processo de me tornar um pesquisador e compreender muitas coisas a respeito da vida no laboratório, principalmente no cultivo da bactéria que ainda se mostra difícil domar e compreender, mas que aguça cada vez mais meu interesse, também alvo de agradecimento, pois sem ela eu não teria essa dissertação para defender, *Brachyspira hyodysenteriae*.

“It is not our part to master all the tides of the world, but to do what is in us for the succour of those years wherein we are set, uprooting the evil in the fields that we know, so that those who live after may have clean earth to till. What weather they shall have is not ours to rule”

John Ronald Reuel Tolkien

RESUMO

O presente trabalho buscou padronizar uma nova técnica de avaliação de sensibilidade antimicrobiana da *Brachyspira hyodysenteriae* utilizando a técnica de microdiluição em caldo e comparando ao kit comercial VetMIC™ Brachy SVA. Além disso, utilizando a técnica de microdiluição em caldo avaliou-se a sensibilidade antimicrobiana de isolados brasileiros de *B. hyodysenteriae* aos óleos essenciais carvacrol, timol e cinamaldeído. Foram utilizadas nove cepas brasileiras, isoladas entre 2012 e 2019, e uma cepa referência. Os isolados foram plaqueados em ágar TSA enriquecido com sangue, incubadas a 37°C em anaerobiose por quatro dias, ressuspendidas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) enriquecido com soro fetal bovino e mantidas em anaerobiose a 37°C em placas de 96 poços, com diluições seriadas dos antimicrobianos lincomicina, doxiciclina, tiamulina, valnemulina e tilosina e dos óleos essenciais carvacrol, timol e cinamaldeído. Após quatro dias, a sensibilidade antimicrobiana foi avaliada através da verificação do crescimento bacteriano, visível pela avaliação da turbidez do meio de cultivo. Para o teste comercial, foram seguidas as instruções do fabricante, adicionando 500 µl da suspensão de bactérias a cada um dos poços da placa, contendo diluições seriadas dos seguintes antimicrobianos lincomicina, doxiciclina, tiamulina, tilvalosina, valnemulina e tilosina. A avaliação da sensibilidade foi realizada da mesma forma da que o teste de microdiluição. Os resultados obtidos permitem afirmar que o teste de microdiluição é um bom substituto ao kit comercial, tendo boa concordância entre eles, enquanto os óleos essenciais avaliados não apresentam boa atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo necessários estudos *in vivo* para melhor caracterizar suas ações.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, nutracêuticos, MIC, controle antimicrobianos

ABSTRACT

The objective of this study was to standardize a new technique to evaluate the antimicrobial sensitivity of *Brachyspira hyodysenteriae* using the broth microdilution test comparing it to the commercial kit VetMIC™ Brachy SVA. In addition, the same broth test was used to evaluate the antimicrobial sensitivity of *B. hyodysenteriae* for the essential oils carvacrol, thymol and cinnamaldehyde. In order to do that, nine Brazilian strains, isolated between 2012 and 2019, and a reference strain, were harvested on agar, maintained under anaerobiosis atmosphere at 37°C during four days, resuspended in Brain Heart Infusion Broth with foetal bovine serum and inoculated under anaerobiosis atmosphere at 37°C during four days in 96 wells plates, doing serial dilution of the following antimicrobials: lincomycin, doxycycline, tiamulin, valnemulin and tylosin and the essential oils carvacrol, thymol and cinnamaldehyde. After four days, the antimicrobial sensitivity was evaluated by bacterial growth, visible through the media turbidity. For the commercial kit, manufacturer instructions were followed, adding 500 µl of the bacterial suspension to each plate well containing two-fold serial dilutions for lincomycin, doxycycline, tiamulin, tilvalosin, valnemulin and tylosin. The evaluation of sensitivity was performed as to the microdilution test. Our results demonstrated that the microdilution test can be a substitute to the commercial kit, having adequate similarity with each other, while the essential oils evaluated did not have satisfactory antimicrobial activity *in vitro*. Further *in vivo* studies are required to better understand their effects.

Keywords: Antimicrobial resistance, nutraceuticals, MIC, antimicrobial control

Lista de tabelas

Tabela 1. Identificação das cepas de <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> utilizadas	25
Tabela 2. Listagem dos antimicrobianos e óleos essenciais utilizados	27
Tabela 3. Valores de CIM pela técnica de microdiluição (MD) e VetMIC™ Brachy SVA em $\mu\text{g/ml}$ e CIM50 e CIM 90 para cada uma das técnicas.....	34
Tabela 4. Valores de CIM para óleos essenciais em $\mu\text{g/ml}$ e seus respectivos CIM50 e CIM90.	35
Tabela 5. Valores de CIM originais e convertidos para $\mu\text{g/ml}$	38

Lista de figuras

Gráfico 1. Número de cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> encontrado para cada diluição, em µg/ml, no teste de microdiluição.....	31
Gráfico 2. Número de cepas de <i>B. hyodysenteriae</i> encontrado para cada diluição, em µg/ml, no kit comercial	32

SUMÁRIO

Introdução.....	11
1. Revisão Bibliográfica.....	12
1.1. Disenteria Suína.....	12
1.2. Resistência antimicrobiana e o controle de antimicrobianos na alimentação animal 19	
1.3. Nutracêuticos como alternativa ao uso de antimicrobianos: óleos essenciais .	21
2. Material e métodos.....	25
2.1. Isolamento e identificação das cepas.....	25
2.2. Diluição dos antimicrobianos e óleos essenciais.....	26
2.3. Técnica de microdiluição.....	27
2.4. VetMIC™ Brachy SVA.....	28
3. Resultados.....	29
4. Discussão.....	31
5. Conclusão.....	42
6. Referências.....	43

INTRODUÇÃO

A *Brachyspira hyodysenteriae* é um dos principais agentes causadores da disenteria suína, doença caracterizada por uma diarreia mucohemorrágica aguda (HAMPSON; WANG, 2018), gerando prejuízos associados à mortalidade, redução da conversão alimentar e ganho de peso dos suínos afetados, além de custos com tratamento e prevenção (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2013).

Uma das alternativas utilizadas para o controle da disenteria suína é a utilização de antimicrobianos na água ou ração (HAMPSON; BURROUGH, 2019). Contudo, o uso de antimicrobianos na produção animal vem sendo alvo de medidas de controle rigorosas e até mesmo proibitivas em alguns países, como Estados Unidos e União Europeia, dado o crescente número de relatos de resistência bacteriana à antimicrobianos (USA FDA, 2015; UNION, 2019). Dessa forma, novas alternativas de tratamento e controle são necessárias para reduzir os prejuízos gerados pela *B. hyodysenteriae*, e o uso de produtos que possam apresentar alguma capacidade de controlar ou reduzir sintomas clínicos de alguma afecção, como os nutracêuticos, vem sendo amplamente pesquisado para o controle de afecções na suinocultura, dentre eles os óleos essenciais.

Óleos essenciais são compostos bioativos extraídos de plantas, classificados como nutracêuticos devido à sua possível ação benéfica à saúde dos animais (OMONIJO et al., 2018), sendo oferecido aos animais principalmente misturado na ração. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e seus mecanismos de ação sobre muitos patógenos ainda são desconhecidos. Além disso, a concentração dos compostos bioativos em suas plantas de origem é extremamente variada, trazendo desafios à sua aplicabilidade na suinocultura e à pesquisa, já que não existe uma padronização no método de avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.

Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar e avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de carvacrol, timol e cinamaldeído sobre a *B. hyodysenteriae* através da técnica de microdiluição.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Disenteria Suína

1.1.1. *Brachyspira hyodysenteriae*

Primeiramente descrita no ano de 1921, a disenteria suína teve sua etiologia definida há apenas 50 anos, através da inoculação de culturas puras de espiroquetas, isoladas à partir de suínos clinicamente acometidos pela doença, em suínos hígidos com consequente reprodução dos sinais clínicos típicos da doença (TAYLOR; ALEXANDER, 1971). Neste mesmo período, foi identificado o agente causador da disenteria suína, primeiramente denominado *Treponema hyodysenteriae* (HARRIS, 1972) e, posteriormente, classificado no gênero *Brachyspira* (OCHIAI; ADACHI; MORI, 1997) através de técnicas moleculares.

A *Brachyspira hyodysenteriae* é uma bactéria Gram-negativa flagelada, anaeróbia com certa resistência à oxigênio, móvel, da família das *Brachyspiraceae*, filo Spirochaetes (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2013), medindo aproximadamente 8 a 10µm de comprimento, 0,3 a 0,4µm de diâmetro e possuindo 14 a 18 flagelos periplasmáticos (BURROUGH, 2017). Inicialmente, eram classificadas de acordo com a antigenicidade de lipooligossacarídeos presentes em sua membrana. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação, demonstrou-se que o gênero *Brachyspira* apresenta imensa diversidade genética, podendo inclusive apresentar variantes dentro de uma mesma propriedade (HAMPSON; BURROUGH, 2019).

O genoma da *B. hyodysenteriae* possui cerca de três milhões de pares de base, com 2122 *open reading frames* (ORF) codificadoras de proteínas putativas, das quais 1387 tiveram suas funções designadas a partir da análise do sequenciamento genômico (BELLGARD et al., 2009). Dentre os genes relacionados, as proteínas com funções determinadas, 11 genes decodificam características estruturais de um agente de transferência de genes profago-like (GTA), chamado VSH-1 (vírus *Serpulina hyodysenteriae*), capaz de transferir fragmentos aleatórios de DNA bacteriano entre cepas da mesma espécie (HUMPHREY et al., 1997; MOTRO et al., 2009). Esses VSH-1 são específicos para cada

espécie de *Brachyspira* e podem ter sua expressão estimulada por alguns antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (STANTON et al., 2008). Dos 314 genes putativos de virulência da *B. hyodysenteriae* (BELLGARD et al., 2009), como hemolisinas e fosfolipases, alguns apresentam grande conservação entre as diferentes cepas e isolados, como os genes relacionados à motilidade e digestão das células do hospedeiro, reconhecimento e ligação à cromatina, proteases entre outros (BLACK et al., 2015). Existem indícios que apontam a participação de um plasmídeo de aproximadamente 36 mil pares de base (BELLGARD et al., 2009) na virulência da *B. hyodysenteriae*. Suínos experimentalmente inoculados com uma cepa australiana que não apresentava esse plasmídeo apresentaram menores índices de diarreia e de lesões histopatológicas quando comparados à uma cepa onde o plasmídeo estava presente (LA et al., 2011).

1.1.2. Epidemiologia

A transmissão da *B. hyodysenteriae* ocorre pela via oral, com um período de incubação variável entre um a quatro dias antes do aparecimento de sinais clínicos, (HAMPSON; BURROUGH, 2019). A disenteria suína é uma doença de distribuição mundial (BURROUGH, 2017), acometendo principalmente animais no período de recria e terminação (ALVAREZ-ORDÓÑEZ, 2018), porém existem poucos estudos de prevalência (CARVAJAL et al., 2006; BIKSI et al., 2007; LÖBERT et al., 2016; VADILLO et al., 2017). No Brasil, um dos primeiros relatos sobre a prevalência da *B. hyodysenteriae* indicou aproximadamente 35% de granjas positivas no estado do Rio Grande do Sul (BARCELLOS et al., 2000). Estes dados foram melhor abordados em estudo posterior, onde avaliou-se, também em granjas do RS, além da presença da bactéria, a presença de antimicrobianos na ração, detectando-se assim uma prevalência de aproximadamente 31% para granjas sem medicação na ração, enquanto granjas medicadas não apresentavam detecção do agente (BARCELLOS; RAZIA; BOROWSKI, 2003). Em estudos realizados no Espírito Santo e Mato Grosso, a prevalência de *B. hyodysenteriae* foi baixa ou inexistente (FILHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2016), provavelmente devido à utilização de antimicrobianos na ração. Por fim, no estado de

Minas Gerais, não houve detecção da *B. hyodysenteriae* nos rebanhos suínos amostrados, também possivelmente devido ao uso de antimicrobianos na ração (VIOTT et al., 2013). Nos últimos anos, têm-se notado o aumento do número de casos de disenteria suína no Brasil (DANIEL, 2014), principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, principais produtoras de suínos do país, sendo que só a região Sul abate aproximadamente 70% desses suínos (DANIEL et al., 2013; ABPA, 2018), com surtos nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Mato Grosso e Minas Gerais (SATO; DANIEL; GUEDES, 2015). No ano de 2012, um novo surto ocorreu no oeste do estado de Santa Catarina, região Sul do país, aparentemente relacionados à comercialização de fêmeas de reposição contaminadas, mas clinicamente saudáveis, para várias unidades de produção de leitões de diferentes integradoras, o que permitiu a entrada do agente em granjas susceptíveis (SATO; DANIEL; GUEDES, 2015). Além disso, só nos anos de 2018 e 2019 foram isoladas 22 novas cepas de *B. hyodysenteriae* de casos clínicos sugestivos de disenteria suína remetidas ao laboratório de patologia molecular da Escola de Veterinária da UFMG, principalmente da região Sul e Sudeste, demonstrando que ainda há circulação da bactéria.

1.1.3. Patogenia

A patogenia da *B. hyodysenteriae* ainda não é bem elucidada (BURROUGH, 2017), mas a lesão decorrente da infecção pode ser caracterizada como colite muco-hemorrágica ou fibrino-hemorrágica e necrotizante, neutrofílica aguda associada à dilatação e alongamento de criptas (WILCOCK; OLANDER, 1979; BURROUGH, 2017), com aumento do número de células caliciformes e perda da característica estriada da camada de muco devido às alterações das mucinas produzidas, havendo uma redução da produção da mucina MUC4 e aumento da MUC5AC, normalmente encontrada em outras mucosas do trato gastrointestinal mas não no cólon (WILBERTS et al., 2014; QUINTANA-HAYASHI et al., 2015; QUINTANA-HAYASHI et al., 2017). Através de técnicas histológicas de coloração pela prata, é possível visualizar as espiroquetas associadas ao

muco e próximas às células caliciformes, incluindo no lúmen das criptas (WILCOCK; OLANDER, 1979).

As alterações causadas pela resposta inflamatória e pela presença de neutrófilos estimulam a produção de mucinas intestinais com conformação alterada, que por sua vez, devido à essa alteração estrutural nas mucinas, melhoram a capacidade de ligação da *B. hyodysenteriae* às mesmas. Essa ligação está associada à diferentes perfis das mucinas, principalmente por um resíduo chamado NeuGc, associado ao ácido siálico (QUINTANA-HAYASHI et al., 2019). Porém, existem evidências de que a composição dessas mucinas variam para cada animal (QUINTANA-HAYASHI et al., 2015). A diarreia nos suínos infectados por *B. hyodysenteriae* ocorre devido à perda ou redução da capacidade de absorção de íons do lúmen intestinal, não estando relacionada à reações secundárias à inflamação causada pela *B. hyodysenteriae* ou mesmo às lesões epiteliais (HAMPSON; BURROUGH, 2019). Existem alguns fatores ainda não desvendados a respeito da colonização da *B. hyodysenteriae* em suínos, já que animais gnotobióticos experimentalmente inoculados não desenvolveram quadros de disenteria suína (BRANDENBURG et al., 1977), levantando assim a hipótese que um ou mais microrganismos da microbiota intestinal podem ser importantes para sua colonização e desenvolvimento.

Conforme mencionado anteriormente, foram identificados 314 genes da *B. hyodysenteriae* que podem estar relacionados à virulência (BELLGARD et al., 2009). Dentre esses, sete potenciais hemolisinas, quatro descritas anteriormente (TER HUURNE et al., 1994) (*tlyA*, *tlyB*, *tlyC* e *hlyA*) e três hemolisinas putativas (duas hemolisinas III e um domínio contendo a proteína hemolisina CBS). Dos fatores de virulência supostamente relacionados à patogenia da *B. hyodysenteriae*, as hemolisinas apresentam um papel de destaque, já que algumas cepas mutantes negativas para hemolisinas apresentam menor virulência (HYATT et al., 1994), induzindo lesões intestinais menos intensas quando comparadas às cepas padrão em ensaios *in vivo* (TER HUURNE et al., 1992).

Outro fator importante na virulência da *B. hyodysenteriae* está relacionado à sua quimiotaxia e motilidade (KENNEDY et al., 1988), já que outras espiroquetas não patogênicas e cepas de pouca ou nenhuma virulência de *Brachyspira* apresentam baixa ou nenhuma quimiotaxia para mucinas (MILNER; SELLWOOD, 1994; KENNEDY; YANCEY, 1996). Outra evidência que suporta a importância das flagelinas na colonização é apresentada quando cepas mutantes para os genes *flaA1* e *flaB1* apresentaram menor capacidade de colonização (KENNEDY; ROSEY; YANCEY, 1997).

Os possíveis mecanismos de lesão relacionados à interação patógeno-hospedeiro ainda não estão muito bem descritos, nem mesmo a importância da resposta imune na geração da lesão. Contudo, durante o quadro de disenteria suína é possível observar uma maior reatividade de linfócitos T CD4+, que, ao serem desafiados com antígenos de *B. hyodysenteriae in vitro*, apresentavam fenótipos de células T CD4+ de memória/ativados (HONTECILLAS et al., 2005). Essa condição demonstra assim a antigenicidade e resposta imune adquirida contra o patógeno, que numa segunda exposição teria sua aderência às células epiteliais intestinais reduzida pela ação de anticorpos contra as suas proteínas de membrana externa (GÖMMEL et al., 2013).

1.1.4. Diagnóstico

Dados clínicos e histórico de quadros de diarreia muco-hemorrágica podem ser de extrema valia no diagnóstico da disenteria suína, contudo o isolamento ainda é o padrão-ouro para diagnóstico dessa enfermidade, mesmo que o mesmo seja fastidioso e exija meios de cultura seletivos (ACHACHA; MESSIER, 1992; OLSON, 1996; CALDERARO et al., 2005). Existem fatores que podem melhorar ou reduzir o sucesso do isolamento da *Brachyspira* como um todo, como amostragem correta, agilidade no envio ao laboratório de diagnóstico e histórico de uso de antibióticos na ração, por exemplo (BURROUGH, 2017). Outro método de diagnóstico que pode ser aplicado às amostras submetidas é a extração de DNA bacteriano e subsequente reação em cadeia da polimerase (PCR), podendo esta ser padronizada para detecção de uma ou várias espécies

de *Brachyspira* (LA; PHILLIPS; HAMPSON, 2003; LA et al., 2006; BORGSTRÖM et al., 2017). Caso as amostras intestinais estejam fixadas em formol e incluídas em parafina, é possível realizar a marcação de espiroquetas através da técnica de impregnação pela prata e pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH), um método mais específico utilizando sondas espécie-específicas marcadas com um fluorocromo, adicionadas ao corte histológico que se ligam ao RNA ribossomal bacteriano (BOYE et al., 1998; BURROUGH et al., 2013; NEVES; GABARDO; GUEDES, 2015).

O uso de técnicas imunológicas para o diagnóstico da disenteria suína é desafiador, dada grande variabilidade interespecífica das bactérias do gênero *Brachyspira*, com diversos sorotipos e sorogrupos, que apresentam relativa reatividade cruzada entre si, além de algumas cepas pertencerem à um mesmo sorogrupo, porém pertencentes a outro sorotipo (HERBST et al., 2017). Esforços foram feitos para tentar desenvolver testes de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção da exposição do suíno ao agente, contudo, mesmo apresentando bons resultados para as cepas testadas (SONG et al., 2015; HAMPSON et al., 2016), é difícil afirmar que tais testes teriam aplicabilidade fora do país onde foram desenvolvidos ou para sorogrupos/sorotipos diferentes daqueles testados. Da mesma forma, o desenvolvimento de vacinas contra a disenteria suína é extremamente desafiador, graças a essa imensa variabilidade (HERBST et al., 2017). Novos estudos genômicos e de potenciais proteínas capazes de estimularem o sistema imune a produzir anticorpos protetores ainda não obtiveram sucesso (CASAS et al., 2016). Estudos recentes, avaliando uma cepa de *B. hyodysenteriae* que apresentou hemólise fraca, indicam que a mesma é apatogênica e poderia ser utilizada como uma vacina viva, atenuando as lesões causadas (LA et al., 2019).

1.1.5. Tratamento e controle

O tratamento e controle da disenteria suína baseia-se geralmente no uso de antimicrobianos, que podem ser adicionados à ração ou à água (HAMPSON; BURROUGH, 2019). Diversos antimicrobianos já foram utilizados ao redor do mundo (gentamicina, virginiamicina, carbadox) como agentes profiláticos ou terapêuticos da

disenteria suína, mas grande parte desses antimicrobianos teve sua utilização proibida em animais de produção (HAMPSON; BURROUGH, 2019). Apesar de os mecanismos de resistência bacteriana à antimicrobianos ainda não estarem totalmente elucidados, mutações vêm sendo encontradas na espécie *B. hyodysenteriae*. Mutações essas que conferem resistência a um ou mais grupos de antimicrobianos, como pleuromutilinas e lincosamidas, contudo, a transferência desses genes de resistência entre as cepas ainda não foi relatada (CARD et al., 2018; LUCA et al., 2018). Uma mutação no gene 16S do RNA ribossomal pode conferir resistência à doxiciclinas, enquanto a resistência para lincomicina, tilosina e tilvalosina pode estar relacionados à mutações no gene 23S do RNA ribossomal (MAHU et al., 2017). Pringle et al. (2012) avaliaram a sensibilidade antimicrobiana da *B. hyodysenteriae* em isolados suecos obtidos entre 1990 e 2010 utilizando um kit comercial (VetMIC™ Brachy SVA - National Veterinary Institute, Uppsala, Suécia). Através de seus resultados, foi possível sugerir valores de corte para os antimicrobianos avaliados (*cutoff*), que posteriormente ficaram conhecidos como *Ecological cutoff* (ECOFF) ao serem comparadas com a cepa de campo histórica.

Atualmente, existem poucos antimicrobianos que ainda são utilizados no controle da *B. hyodysenteriae* (HAMPSON; BURROUGH, 2019), como as pleuromutilinas. Um dos primeiros relatos de resistência para *B. hyodysenteriae* foi para a tilosina, durante tentativa de erradicação na Alemanha (HAMPSON et al., 2019), contudo, vários relatos de aumento de resistência podem ser encontrados, principalmente relacionados às pleuromutilinas (LOBOVÁ; SMOLA; CIZEK, 2004; RUGNA et al., 2015; DANIEL et al., 2017; CARD et al., 2018; GARCÍA-MARTÍN et al., 2018). Para evitar o desenvolvimento desses mecanismos, a determinação da sensibilidade microbiana através da técnica de concentração inibitória mínima (CIM) pode ser uma ferramenta primordial (HAMPSON; BURROUGH, 2019).

Estudos buscando identificar o perfil de resistência a antimicrobianos da *B. hyodysenteriae* são feitos desde o final da década de 1970 (MESSIER; HIGGINS; MOORE, 1990). Até 2003, o método mais comum para a determinação do CIM se baseava no método de diluição em ágar (NOVOTNÁ; ŠKARDOVÁ, 2002), uma

metodologia laboriosa e cara para se utilizar na rotina, já que exigia que o laboratório preparasse inúmeras placas de petri contendo diferentes concentrações de ágar com o antimicrobiano testado, independentemente do número de cepas a serem avaliadas. Uma nova técnica, padronizada em 2003, permite que cada cepa fosse avaliada individualmente (KARLSSON et al., 2003) em placas de 48 poços cultivadas em caldo, facilitando e reduzindo custos de sua execução, já que numa mesma placa poderiam ser avaliados até seis antimicrobianos com sete a oito diluições para cada um deles. Esse teste foi a base para a criação do kit comercial VetMIC™ Brachy SVA (National Veterinary Institute, Uppsala, Suécia), comercializado até o final de 2018.

1.2. Resistência antimicrobiana e o controle de antimicrobianos na alimentação animal

Resistência antimicrobiana pode ser definida como microrganismos resistentes a antimicrobianos aos quais eram previamente susceptíveis (SEMRET; HARAOU, 2019). Nos últimos anos esse tema tem sido objeto de pesquisa tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana (MCEWEN; COLLIGNON, 2017; XIONG; SUN; ZENG, 2018; LEKAGUL; TANGCHAROENSATHIEN; YEUNG, 2019), onde todos alertam sobre a necessidade de controlar tal resistência e descobrir novos métodos de controle de enfermidades bacterianas. Alguns novos conceitos buscam mudar o modo como são avaliadas as complexas interações entre hospedeiros, patógenos e ambiente, como o Saúde Única, que trata a saúde humana, animal e ambiental como interdependentes (MCEWEN; COLLIGNON, 2017). Uma das maiores justificativas para tal preocupação se encontra no fato de que, depois da década de 1970, poucas bases farmacológicas foram descobertas, enquanto em um único ano diversas cepas de *Staphylococcus aureus* se tornaram resistentes à penicilina (FERRI et al., 2017).

Um dos mecanismos propostos para o desenvolvimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos está relacionado ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal (XIONG; SUN; ZENG, 2018; LEKAGUL; TANGCHAROENSATHIEN; YEUNG, 2019), que nada mais são do que

antimicrobianos em doses sub-terapêuticas na ração ou na água (LEKAGUL; TANGCHAROENSATHIEN; YEUNG, 2019). Ao se aplicar doses sub-terapêuticas dos antimicrobianos há uma seleção darwiniana de microrganismos que possuam algum mecanismo de resistência àquela base farmacêutica, que então pode ser repassado à outros microrganismos através de plasmídeos (XIONG; SUN; ZENG, 2018), ou mutações que possam conferir essa resistência (BOWER; DAESCHEL, 1999) ou ainda através de mecanismos ainda não elucidados, como no caso da *B. hyodysenteriae* (CARD et al., 2018). Outro mecanismo proposto é que mesmo que essa seleção não ocorra no animal, os dejetos desses animais, contendo baixas concentrações de antimicrobianos, em contato com bactérias ambientais induziriam a seleção de genes de resistência (XIONG; SUN; ZENG, 2018).

Por esse motivo, nas últimas décadas, países e organizações internacionais como Estados Unidos e União Europeia iniciaram políticas para, a partir de 2003 (UNION, 2003; USA FDA, 2015), controlar e regulamentar a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento e profiláticos na alimentação animal, incluindo recentemente o controle dessas substâncias também na ração de animais de companhia (UNION, 2019).

Inicialmente, a União Europeia realizou um controle da comercialização desses produtos, exigindo que os mesmos só pudessem ser vendidos sob prescrição de um médico veterinário (UNION, 2003). Além disso, essa mesma legislação prevê o banimento de promotores de crescimento à partir de janeiro de 2006, não permitindo mais que os mesmos fossem registrados em toda a União Europeia. A mesma cascata de eventos iniciou-se em outros países do mundo, como os Estados Unidos, que desde 2015 exigem o controle de alimentação animal medicada através de receituário de médicos veterinários cadastrados e credenciados. O mesmo acontece para países como Japão e México (MARON; SMITH; NACHMAN, 2013).

No Brasil, o controle e uso de antimicrobianos está sujeito à aprovação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta esse uso através de instruções normativas (IN). A primeira IN relativa ao controle de rações medicadas é a IN 65/2006, alterada pela IN 14/2016, que aborda as medidas necessárias para a

fabricação dessas rações, empregando ações visando principalmente a identificação dessas rações e aplicando-se programas de limpeza para evitar a contaminação de rações não-medicadas com traços de medicamentos (BRASIL, 2006, 2016a). Contudo, o prazo para a regulamentação entrar em vigor vem sendo constantemente adiada, agora previsto para entrar em vigor em julho de 2020 (BRASIL, 2019). Outras medidas adotadas pelo MAPA incluem a proibição da utilização do sulfato de colistina como promotor de crescimento em todo território nacional (BRASIL, 2016b), bem como eritromicina e espiramicina (BRASIL, 2012).

1.3. Nutracêuticos como alternativa ao uso de antimicrobianos: óleos essenciais

Nutracêuticos podem ser definidos como alimentos que possam suplementar deficiências da dieta e/ou auxiliar no controle e tratamento de alguma afecção (KALRA, 2003). Nesse sentido, óleos essenciais podem ser classificados como nutracêuticos, uma vez que são compostos bioativos retirados de plantas (folha, flor, caule, raiz, fruto) (OMONIJO et al., 2018), constituídos de diversos componentes e princípios, em sua maioria terpenoides e fenilpropanoides (OMONIJO et al., 2018) e, geralmente, dois ou três compostos em maior quantidade são associados à atividade daquele óleo (BRENES; ROURA, 2010). Existe uma grande variabilidade na composição dos óleos essenciais entre plantas (OMONIJO et al., 2018), além da variabilidade gerada por épocas de colheita, estação do ano, qualidade do solo, métodos de extração e de qual material foi feita a extração (planta inteira, folha, fruto, flor, raiz, semente) (BRENES; ROURA, 2010; ZHAI et al., 2018) que acabam por alterar a composição final de óleos essenciais disponíveis. Acredita-se que a produção desses óleos se dê como resposta à fatores estressantes, como baixa pluviosidade, ataque de insetos, entre outros (CALO et al., 2015). Usando como exemplo o índice pluviométrico, um período de seca moderada favorece a floração e acúmulo de óleos essenciais nas sementes de cominho (*Cuminum cyminum*) (BETTAIEB REBEY et al., 2012).

Os mecanismos de ação antimicrobiana acerca dos óleos essenciais ainda não são bem elucidados, tendo uma melhor ação sobre bactérias Gram-positivas do que Gram-

negativas, já que a membrana externa das bactérias Gram-negativas as protegem da entrada de compostos hidrofóbicos como os óleos essenciais (OMONIJO et al., 2018). Acredita-se que os óleos essenciais causem uma alteração de permeabilidade da membrana celular bacteriana, o que por sua vez alteraria diversas atividades celulares, dentre elas a produção e transporte de energia, montagem de proteínas citoplasmáticas e outras funções regulatórias (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016). Além disso, os óleos essenciais poderiam quelar metais, reduzindo sua disponibilidade para o crescimento bacteriano, inibir enzimas bacterianas e a captação e utilização de glicose como meio de obtenção de energia, formação de biofilmes, produção de cápsula ou até mesmo agindo sinergicamente com antimicrobianos e outros óleos essenciais (GILL; HOLLEY, 2004; UPADHYAY et al., 2014; OMONIJO et al., 2018). Contudo, existem relatos de modulação do microbioma intestinal pelos óleos essenciais, que resulta na alteração da capacidade de colonização de bactérias potencialmente patogênicas (WANG et al., 2019), principalmente da família das enterobactérias, quando comparados os grupos tratados com óleos essenciais e antimicrobianos, além de um aumento de bactérias do grupo dos *Lactobacillus*, consideradas benéficas à saúde intestinal em suínos, principalmente nos segmentos mais aborais do intestino (NAMKUNG et al., 2004; CASTILLO et al., 2006; WEI et al., 2017; CAIRO et al., 2018). Contudo, ainda são necessários estudos mais abrangentes que utilizem tecnologias mais atuais para que se tenha uma real noção do impacto desses produtos no microbioma intestinal (OMONIJO et al., 2018).

Outras possíveis aplicações para o uso de óleos essenciais na alimentação animal envolvem melhoria de índices zootécnicos e palatabilidade da ração, apesar dos estudos não apresentarem boa concordância entre si (YANG et al., 2015). Neill et al. (2006) não encontraram eficácia em relação ao desempenho dos animais na utilização de orégano (*Origanum vulgare*) na concentração de 50 mg/kg quando comparado à associação de neomicina e oxitetraciclina (154 mg/kg de cada). Já Zeng et al. (2015) encontraram diferenças quando comparadas dietas de baixo valor energético suplementadas com óleos essenciais de timol e cinamaldeído. Em estudo recente avaliando os efeitos da suplementação com óleo essencial de pimenta vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

da dieta de leitões, Cairo et al. (2018) não encontraram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados, exceto no escore de diarreia, menor para o grupo suplementado com o óleo essencial e na avaliação da microbiota intestinal, com maior contagem de *Lactobacillus*. Outro estudo, avaliando uma mistura do extrato de cinco plantas diferentes (trigo sarraceno, tomilho, cúrcuma, pimenta preta e gengibre), encontrou melhores índices zootécnicos de ganho de peso diário e consumo diário para o grupo tratado com diferentes níveis de inclusão desse extrato (YAN; MENG; KIM, 2011). Da mesma forma, avaliações de digestibilidade são igualmente conflitantes (UPADHAYA; KIM, 2017) e a falta de padronização de metodologias, níveis de inclusão, origem e pureza dos óleos essenciais torna ainda mais difícil a comparação entre os dados.

Dentre os óleos essenciais mais utilizados na medicina veterinária que podemos citar o timol, carvacrol e cinamaldeído, com alguns estudos avaliando eugenol e capsaicina (OMONIJO et al., 2018; ZHAI et al., 2018).

1.3.1. Timol

O 2-isopropyl-5-methylphenol (timol) é um fenol monoterpeno, de odor desagradável e baixa palatabilidade que possui diversos usos, desde a indústria cosmética até como conservante de alimentos (MARCHESE et al., 2016). É encontrado principalmente no tomilho (*Tymus vulgaris* L.), mas também pode ser extraído das folhas de alecrim-da-chapada (*Lippia gracilis*) (MARCHESE et al., 2016), e em menores concentrações das folhas e partes aéreas do orégano (*Origanum vulgare*) e segurelha-dos-jardins (*Satureja hortensis*) (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016).

Dos óleos essenciais, o timol é um dos mais avaliados em relação ao seu efeito como antimicrobiano, tanto para bactérias Gram-negativas quanto positivas, incluindo cepas de *Staphylococcus* multirresistentes, *B. hyodysenteriae* e *Salmonella* (MARCHESE et al., 2016; SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016; OMONIJO et al., 2018), com valores de CIM variando de 1280 µg/ml a 80 µg/ml para as diferentes espécies bacterianas.

1.3.2. Carvacrol

Carvacrol (2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol) é um isômero do timol, sendo um fenol monoterpreno, mudando apenas a posição de sua hidroxila no anel aromático, sendo encontrado principalmente no orégano (*Origanum vulgare*) (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015), cravo (*Eugenia caryophyllata*), alecrim-da-chapada (*Lippia sidoides*), segurelha-dos-jardins (*Satureja hortensis*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016). Assim como o timol, apresenta diversas aplicabilidades, dentre elas controle de população e repelente de mosquitos, tratamentos dentários e preservativo de alimentos (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).

Como antimicrobiano o carvacrol apresenta atividade contra diversos patógenos, dentre eles *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015; SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016; OMONIJO et al., 2018).

1.3.3. Cinamaldeído

Retirado da casca e folhas do *Cinnamomum zeylancium* (Árvore de canela), o cinamaldeído é um dos principais metabólitos secundários produzido pelo gênero *Cinnamomum*, sendo que o óleo essencial mais comum é o trans-cinamaldeído ((E)-3-phenylprop-2-enal) (FRIEDMAN, 2017; VASCONCELOS; CRODA; SIMIONATTO, 2018). Pode ser encontrado em praticamente todas as plantas da família Lauraceae (*Cinnamomum*, *Laurus*, *Persea*, *Licaria*, etc.) (CHEN et al., 2016) e também nas flores do cravo (*Eugenia caryophyllata*) (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016). Possui atividade antifúngica (SHREAZ et al., 2016), induz apoptose em células tumorais de pulmão (WU et al., 2017) e reduz estresse oxidativo (KIM; AHN; KIM, 2017).

Para patógenos de importância em suíno, o cinamaldeído foi avaliado contra *E. coli*, *Salmonella*, *B. hyodysenteriae* (OMONIJO et al., 2018), *Streptococcus suis* de diferentes sorotipos (AGUIAR et al., 2018), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*,

Bordetella bronchiseptica, *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* e *Pasteurella multocida* (LEBEL et al., 2019).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento e identificação das cepas

Para a avaliação dos efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais em bactérias da espécie *B. hyodysenteriae*, foram utilizadas nove cepas previamente isoladas no laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da UFMG e uma cepa de referência (B204 ATCC® 31212™). As cepas foram isoladas em diferentes anos e regiões geográficas do Brasil, desde 2012 a 2019 (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação das cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* utilizadas

Número da cepa	Identificação cepa	Ano de isolamento	Estado de origem
1	6	2018	SP
2	132A	2012	ND*
3	CP2	2018	RS
4	HK240	2018	SP
5	F19/19-08	2019	PR
6	B204	NA**	NA
7	493/13	2013	ND*
8	415/12	2012	MG
9	F28/19-TP3	2019	PR
10	F28/19-3650W	2019	PR

* ND – Não disponível; **NA – Não se aplica

As cepas foram isoladas a partir de fezes e/ou fragmentos de intestino grosso com sinais clínicos de disenteria suína, semeados em placas de ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*) enriquecido com sangue ovino ou equino a 5% e suplementado com 6,25 µg/µl rifampicina (Rifampicin, Sigma-Aldrich® cat n° R3501, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), 800 µg/µl de espectinomicina (Spectinomycin, Sigma-Aldrich®, cat n° S9007, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), 25 µg/µl de vancomicina (Vancomycin, Sigma-Aldrich®, cat n° V2002, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), 25 µg/µl de colistina (Colistin, Sigma-Aldrich®, cat n° C1511, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) (adaptado de NOVOTNÁ; ŠKARDOVÁ, 2002) e mantidas em jarra de anaerobiose (Oxoid Anaerobic Indicator, Thermo Fisher®, cat n° BR0055, Waltham, MA, USA) por quatro dias em estufa a 37°C. A anaerobiose foi gerada utilizando bomba de vácuo e aplicada mistura de gases composta de 80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂. Foi utilizada uma fita indicadora de anaerobiose para controle da geração de anaerobiose. As cepas foram repicadas nesse meio até que não houvessem contaminantes na avaliação por microscopia de contraste de fase em preparações líquidas em lâminas. As amostras consideradas puras foram cultivadas em ágar TSA enriquecido com 5% de sangue ovino ou equino por quatro dias.

Todas as amostras foram identificadas previamente como *B. hyodysenteriae* por PCR *duplex*, conforme descrito na literatura (DANIEL et al., 2017).

2.2. Diluição dos antimicrobianos e óleos essenciais

Foram utilizados cinco antimicrobianos para a padronização da técnica de microdiluição (Tabela 2). Esses foram diluídos em água na concentração inicial (solução de trabalho) de 12800 µg/ml e mantidos congelados a -20°C até sua utilização.

Para a avaliação dos óleos essenciais, foram selecionados três produtos mais comumente usados (MICHIELS et al., 2009; BOSKOVIC et al., 2015; VANDE MAELE et al., 2016; OMONIJO et al., 2018), listados na tabela 2, diluídos na concentração de 12800 µg/ml em etanol e mantidos congelados a -20°C até sua utilização.

Tabela 2. Listagem dos antimicrobianos e óleos essenciais utilizados

Produto	Origem
Lincomicina	Lincomycin Hydrochloride Monohydrate; Vetranal™, Sigma-Aldrich, nº 31727
Doxiciclina	Doxycycline Hyclate; Vetranal™, Sigma-Aldrich, nº 33429
Valnemulina	Valnemulin Hydrochloride; Vetranal™, Sigma-Aldrich, nº 32375
Tiamulina	Tiamulin Fumarate; Vetranal™, Sigma-Aldrich, nº 46959
Tilosina	Tylosin Tartrate; Vetranal™, Sigma-Aldrich, nº33847
Carvacrol	Carvacrol; Sigma-Aldrich, W224502
Cinamaldeído	4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde; Sigma-Aldrich, D4506
Timol	Thymol; Sigma-Aldrich, T0501

2.3. Técnica de microdiluição

Para a técnica de microdiluição, foi utilizado caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, CM1135, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante e acondicionado sob refrigeração à 8°C por no máximo 30 dias.

As placas contendo isolados puros de *B. hyodysenteriae* foram lavadas com 2ml de caldo BHI enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco, nº 12657029, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), para recuperação das colônias. Em seguida, esse lavado foi adicionado à 50ml do mesmo caldo até alcançar a escala de McFarland de 0,5, sendo essa suspensão o inóculo para a execução da técnica de microdiluição.

Em uma placa estéril de 96 poços, foram adicionados 150µl do inóculo previamente preparado em cada poço e, na primeira coluna, foram adicionados mais 144µl do mesmo. Em seguida, foi adicionado 6µl das soluções previamente preparadas de antimicrobianos e óleos essenciais, perfazendo um total de 300 µl na primeira coluna de poços, em triplicata para cada princípio ativo. Após a adição, os mesmos foram homogeneizados e 150µl foram retirados e homogeneizados à coluna seguinte, mantendo-se as linhas da

placa, até a penúltima coluna, da qual foram retirados 150 µl e descartados para se manter o mesmo volume em todos os poços. Dessa forma, as concentrações variaram de 256 µg/ml a 0,25 µg/ml em base dois. O último poço da última coluna foi adicionado caldo BHI sem a adição de bactérias para servir como controle branco do crescimento bacteriano. Em cada placa foi mantida uma linha sem a adição de nenhum composto para servir como controle positivo do crescimento bacteriano. Nas placas onde foi adicionado os óleos essenciais, uma segunda linha foi mantida sem os mesmos, sendo adicionado etanol como controle da ação do etanol sobre o crescimento bacteriano.

Após a diluição dos princípios ativos, as placas foram acondicionadas em jarra de anaerobiose, seguido o mesmo protocolo para geração da anaerobiose descrito anteriormente e mantidas em estufa a 37°C sob agitação por 4 dias. As placas foram avaliadas visualmente a cada 2 dias quanto ao crescimento bacteriano e anaerobiose. Após a incubação, as placas foram avaliadas quanto à turbidez de cada diluição para cada princípio ativo, indicando o crescimento bacteriano. A última concentração onde não houve turbidez foi considerada a concentração mínima inibitória para aquele princípio ativo. Todas as análises foram realizadas em duplicata, em períodos diferentes de tempo, para melhorar a acurácia do teste. Caso houvesse divergência entre as duplicatas, a análise foi repetida até que houvesse concordância entre elas.

O princípio ativo tilvalosina não foi utilizado por não haver disponibilidade comercial do composto na época do ensaio.

2.4. VetMIC™ Brachy SVA

Como controle para os valores de CIM das cepas avaliadas, foi utilizado o kit comercial VetMIC™ Brachy SVA (National Veterinary Institute, Uppsala, Suécia) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foi preparada uma suspensão de bactérias em caldo BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino, padronizado na escala de 0,5 de McFarland. Em seguida, 500 µl dessa suspensão foi adicionada a cada poço da placa, onde cada linha correspondia a um antimicrobiano (lincomicina, doxiciclina, tiamulina,

tilvalosina, valnemulina e tilosina) e mantida sob agitação em jarra de anaerobiose e estufa a 37°C.

3. RESULTADOS

Foi avaliada a susceptibilidade antimicrobiana de dez cepas de *B. hyodysenteriae* através da técnica de microdiluição através da comparação de resultados com o kit comercial VetMIC™ Brachy SVA. Além disso, foi avaliada a concentração antimicrobiana mínima dessas 10 cepas frente a três óleos essenciais utilizando essa mesma técnica de microdiluição. Os resultados da técnica de microdiluição e do kit VetMIC™ Brachy SVA estão listados na tabela 3 e nos gráficos 1 e 2. Foram considerados iguais os valores de CIM que tivessem uma diluição acima ou abaixo em relação aos resultados do kit comercial.

Os resultados para a lincomicina entre as duas técnicas foi similar, sendo que seis cepas apresentaram resultados iguais para ambas as técnicas, enquanto outras três cepas apresentaram valores de CIM uma concentração abaixo dos encontrados no kit comercial. Uma única cepa (CP2) apresentou valores discrepantes entre as duas técnicas, com resultados duas diluições acima da encontrada no kit comercial. As concentrações máxima e mínima para a técnica de microdiluição no presente estudo estão entre 256 µg/ml e 0,25 µg/ml, enquanto o kit apresenta limites menores, variando de 64 µg/ml a 0,5 µg/ml. Já para a doxiciclina, a técnica de microdiluição apresentou resultados uma diluição abaixo do controle, exceto para as cepas 132A e F19/19-08, que apresentaram resultados duas diluições abaixo do controle. Os valores máximo e mínimo do kit comercial para a doxiciclina estão entre 16 µg/ml e 0,125 µg/ml, uma diluição a mais do que o limite inferior da técnica de microdiluição (0,25 µg/ml).

Para a valnemulina, o teste de microdiluição em caldo apresentou oito cepas com resultados similares ao kit comercial. Destas, quatro apresentavam valores de CIM acima da maior concentração disponível no teste comercial (4 µg/ml), apresentando um valor de CIM de 8 µg/ml. Contudo, a cepa F19/19-08 apresentou resultados fora dos limites pré-

estabelecidos, estando duas diluições acima do controle no teste de microdiluição. A cepa B204 apresentou resultados abaixo dos valores mínimos para ambas as técnicas, sendo que os valores máximo e mínimo variam entre 4 µg/ml e 0,031 µg/ml para o kit comercial e 256 µg/ml e 0,25µg/ml na técnica de microdiluição.

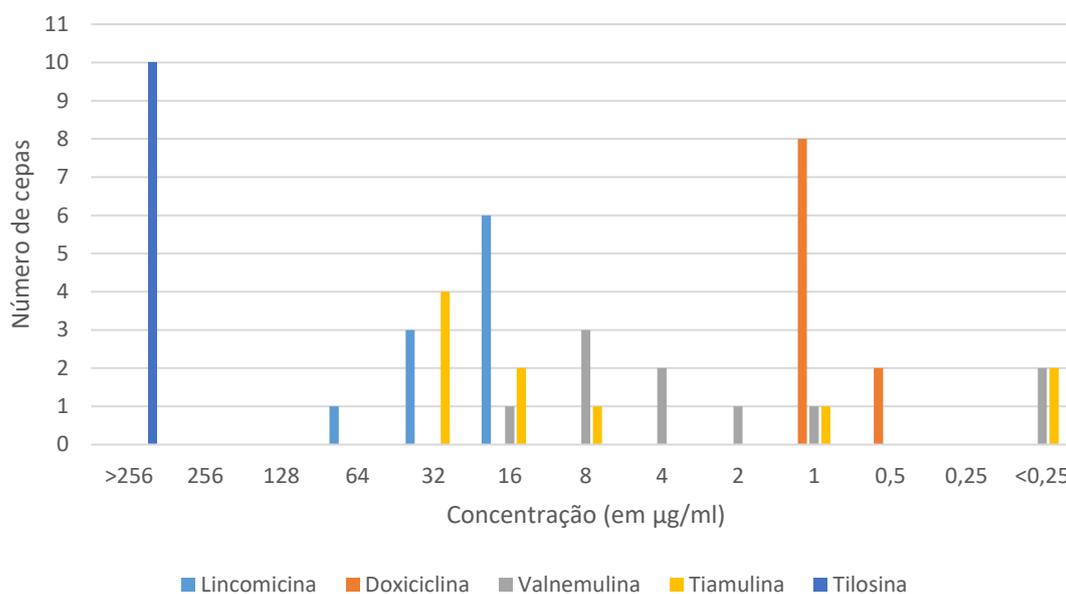
No teste da VetMIC™ Brachy SVA a maior concentração disponível para a tiamulina é de 8 µg/ml, e sete cepas apresentaram valores acima ou igual a esse limite. Já no teste da microdiluição, a maior concentração disponível é de 256 µg/ml, sendo que, para cinco dessas sete cepas, o resultado da microdiluição apresentou valores de CIM mais elevados (entre 32 e 16 µg/ml). A cepa B204 apresentou o menor valor de CIM para a tiamulina (<0,063 µg/ml), o que se repete para na técnica de microdiluição, já que sua concentração menor concentração disponível (0,25 µg/ml) é mais alta quando comparada à da VetMIC™ Brachy SVA (0,063 µg/ml). A cepa 493/13 apresentou valor de CIM similar em ambos os testes, enquanto a cepa 415/12 apresentou valor de CIM abaixo da menor concentração no teste de microdiluição (<0,25 µg/ml) e no kit comercial, o valor de CIM foi duas diluições acima (0,5 µg/ml), mesma diferença encontrada para a cepa F19/19-08. A maior diferença entre os métodos foi encontrada para a cepa 132A na avaliação da tiamulina, com valores de CIM para o teste de microdiluição 3 diluições abaixo do encontrado no método controle (1 e 8 µg/ml, respectivamente). Para a tilosina, todas as cepas foram altamente resistentes em ambos os testes, com valores de CIM acima da maior concentração disponível.

Os resultados para óleos essenciais estão listados na tabela 4. Para o carvacrol, os valores de CIM variaram entre 64 µg/ml e 256 µg/ml. Dentre todas as cepas avaliadas, a F28/19-TP3 foi a que apresentou o menor valor (64 µg/ml) de CIM para este componente, sendo curiosamente uma das cepas com resultados de CIM intermediários quanto à resistência a antimicrobianos.

Dos óleos essenciais avaliados, o timol apresentou os maiores resultados de CIM, já que nenhuma diluição abaixo de 128µg/ml demonstrou atividade antimicrobiana. Para o cinamaldeído, os resultados foram similares ao carvacrol, com a mesma cepa apresentando valor de CIM de 64 µg/ml. Apesar da forte coloração amarelada do

cinamaldeído diluído em etanol e a consequente alteração da coloração do caldo, não houve interferência na avaliação de CIM para este óleo essencial, já que a alteração da cor não interfere na avaliação da turbidez, que é a base de avaliação do método de microdiluição.

Gráfico 1. Número de cepas de *B. hyodysenteriae* encontrado para cada diluição, em µg/ml, no teste de microdiluição.

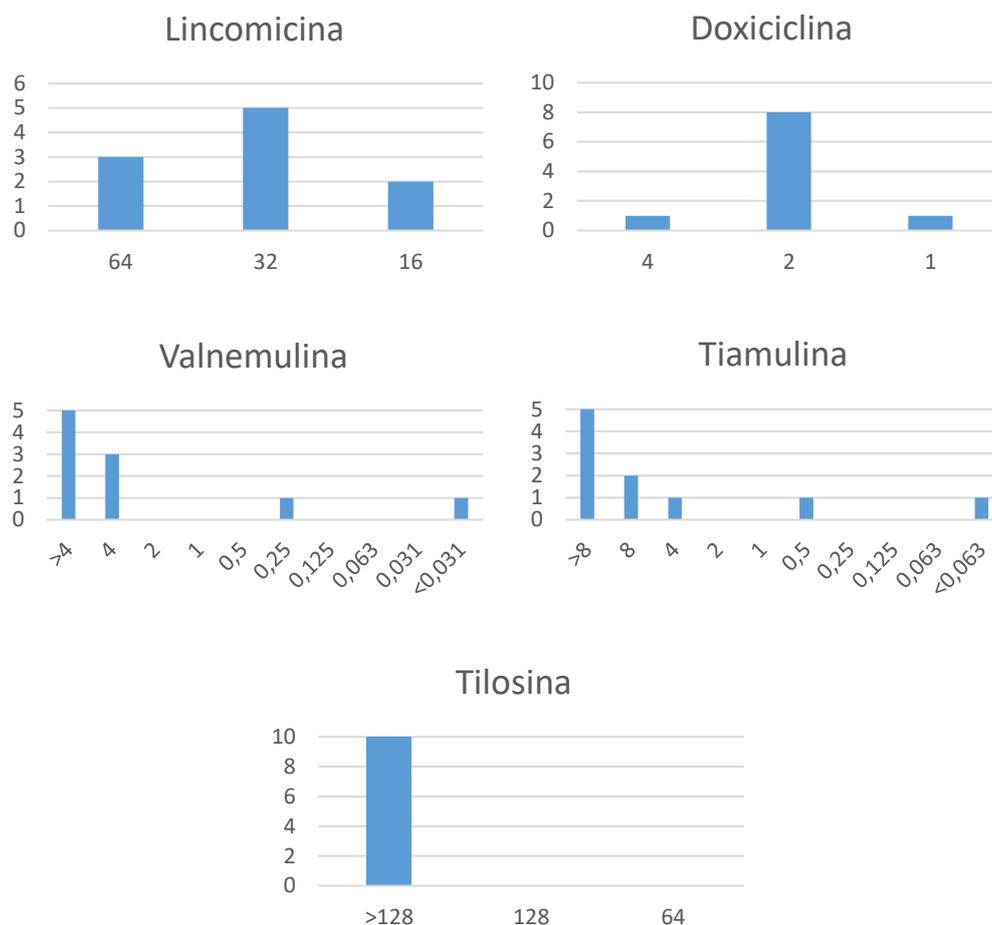


4. DISCUSSÃO

Este estudo foi pioneiro na avaliação da sensibilidade antimicrobiana de cepas brasileiras de *B. hyodysenteriae* frente à óleos essenciais, bem como o primeiro a padronizar um teste de sensibilidade usando a técnica de microdiluição, comparando-o com uma técnica já padronizada e validada pela literatura, no Brasil (KARLSSON; OXBERRY; HAMPSON, 2002; KARLSSON et al., 2003). Vale lembrar que esse teste comercial (VetMIC Brachy - SVA - National Veterinary Institute, Uppsala, Suécia) possuía menor número de diluições, princípios ativos pré-estabelecidos e em número limitado por placa, até ser descontinuada no final do ano de 2018, o que tornou a necessidade de desenvolver

e padronizar novas técnicas de avaliação da sensibilidade antimicrobiana da *B. hyodysenteriae* ainda mais urgente.

Gráfico 2. Número de cepas de *B. hyodysenteriae* encontrado para cada diluição, em µg/ml, no kit comercial



Ao se avaliar os resultados obtidos pela técnica de microdiluição, observou-se que os resultados encontrados foram consistentes com aqueles encontrados na técnica comercial VetMIC Brachy SVA, com variação máxima de uma diluição para mais ou para menos. Essa variação é considerada aceitável para comparação entre as técnicas de diluição em ágar e a técnica padrão (KARLSSON; OXBERRY; HAMPSON, 2002).

A resistência das cepas de *B. hyodysenteriae* ante a tilosina foram consistentes com dados publicados anteriormente (KARLSSON et al., 2004), e se devem, principalmente, à grande utilização desta base na suinocultura no passado na tentativa de controlar quadros de disenteria suína.

Para a tiamulina e valnemulina, cinco cepas apresentaram valores de CIM acima do limite de detecção do kit comercial, em concordância com os valores encontrados na técnica de microdiluição. Estes altos valores poderiam ser justificados pelo surgimento de um gene que confere resistência à pleuromutilinas na *B. hyodysenteriae*, denominados *tva(A)*, que codifica uma proteína que age como protetora ao ribossomo bacteriano (CARD et al., 2018). As cepas testadas no presente estudo não foram avaliadas quanto à presença dessa mutação, contudo, outros relatos corroboram o desenvolvimento de resistência às pleuromutilinas (KARLSSON; GUNNARSSON; FRANKLIN, 2001; LOBOVÁ; SMOLA; CIZEK, 2004; PRINGLE et al., 2004; RUGNA et al., 2015). Curiosamente, uma das cepas de *B. hyodysenteriae* (132A) apresentou valores de CIM na técnica de microdiluição três diluições abaixo da encontrada no VetMIC™ Brachy SVA para tiamulina, enquanto uma segunda cepa (F19/19-08) apresentou valores de CIM duas diluições acima da considerada padrão. Dentre as demais cepas, duas apresentaram valores abaixo do da maior diluição do teste de microdiluição, sendo uma a cepa referência (B204) e outra um isolado do ano de 2012 (415/12). Esses valores são esperados para a cepa referência, se levarmos em consideração que esta foi isolada por volta dos anos 1980, provavelmente não tendo a oportunidade de desenvolver essa resistência a campo. Contudo, esses resultados não eram esperados para a cepa de 2012. Para esta cepa, esperava-se a detecção de algum grau de resistência, uma vez que amostras isoladas em período próximo, como a cepa 493/13, apresentou resultados elevados de CIM para as pleuromutilinas, além do fato de que estudo anterior demonstrou que aproximadamente 91% das cepas brasileiras avaliadas apresentavam elevados níveis de CIM para pleuromutilinas (DANIEL et al., 2017).

Tabela 3. Valores de CIM pela técnica de microdiluição (MD) e VetMIC™ Brachy SVA em µg/ml e CIM50 e CIM 90 para cada uma das técnicas.

Cepas	Lincomicina		Doxiciclina		Valnemulina		Tiamulina		Tilosina	Tilvalosina	
	MD	VetMIC™ Brachy SVA	MD	VetMIC™ Brachy SVA	MD	VetMIC™ Brachy SVA	MD	VetMIC™ Brachy SVA	MD	VetMIC™ Brachy SVA	VetMIC™ Brachy SVA
6	32	64	1	2	8	>4	32	>8	>256	>128	32
132A	16	32	0,5	2	2	4	1	8	>256	>128	16
CP2	16	64	1	2	8	>4	32	>8	>256	>128	32
HK240	16	32	0,5	1	4	>4	32	>8	>256	>128	8
F19/19-08	64	64	1	4	16	4	32	8	>256	>128	32
B204	16	16	1	2	<0,25 ^A	<0,031	<0,25	<0,063	>256	>128	2
493/13	16	16	1	2	4	4	8	4	>256	>128	8
415/12	32	32	1	2	<0,25 ^A	0,25	<0,25	0,5	>256	>128	8
F28/19-TP3	32	32	1	2	8	>4	16	>8	>256	>128	8
F28/19-3650W	32	32	1	2	8	>4	32	>8	>256	>128	16

Antimicrobiano	MD		VetMIC™ Brachy SVA	
	CIM50	CIM90	CIM50	CIM90
Lincomicina	16	32	32	64
Doxiciclina	1	1	2	2
Valnemulina	4	8	4	>4
Tiamulina	16	32	>8	>8
Tilosina	>256	>256	>128	>128

Resultados em negrito: Valores iguais ou abaixo ao ECOFF (Ecological Cut-Off) (PRINGLE et al., 2012)

Resultados seguidos da letra A: ECOFF abaixo do limite de detecção

Tabela 4. Valores de CIM para óleos essenciais em µg/ml e seus respectivos CIM50 e CIM90.

Cepas	Óleo Essencial		
	Carvacrol	Timol	Cinamaldeído
6	128	128	128
132A	256	256	128
CP2	256	256	128
HK240	128	128	128
F19/19-08	128	128	128
B204	256	256	128
493/13	128	128	128
415/12	256	256	256
F28/19-TP3	64	128	64
F28/19-3650W	256	128	128

Óleo Essencial	CIM50	CIM90
Carvacrol	128	256
Timol	128	256
Cinamaldeído	128	128

Os resultados obtidos através da técnica de microdiluição para a doxíciclina foram, em geral, uma diluição abaixo do valor encontrado para o teste controle. Apenas duas cepas apresentaram duas diluições abaixo quando comparadas ao controle, e serão discutidas posteriormente. Mesmo apresentando os menores valores de CIM para a grande maioria das cepas em relação aos demais antimicrobianos, apenas duas cepas podem ser consideradas sensíveis a doxíciclinas, de acordo com seu ECOFF (PRINGLE et al., 2012; HAMPSON et al., 2019). Esses dados corroboram resultados encontrados anteriormente para cepas brasileiras (DANIEL et al., 2017), onde menos de 10% das cepas avaliadas apresentavam valores iguais ou abaixo do ECOFF para doxíciclina. Os mecanismos de resistência da *B. hyodysenteriae* para a doxíciclina estão relacionados à uma mutação no gene do RNA ribossomal 16S, que levaria à uma falha de ligação entre as tetraciclina e seu sítio de ação no ribossomo bacteriano (PRINGLE; FELLSTRÖM; JOHANSSON, 2007). Essa mutação ainda não foi avaliada no Brasil, contudo estudos feitos na Bélgica, Suíça e Reino Unido revelam que todas as cepas que apresentaram valores de CIM acima do ECOFF a possuíam (MAHU et al., 2017; CARD et al., 2018; GARCÍA-MARTÍN et al., 2018).

A lincomicina apresentou diluições iguais ou uma diluição abaixo quando comparado o teste de microdiluição em relação ao controle. Uma única cepa (CP2), que apresentou duas diluições abaixo do controle para o teste de microdiluição, será discutida posteriormente. Os resultados obtidos no CIM para as cepas avaliadas foi, em geral, menor do que aqueles encontrados por outros autores ao redor do mundo, incluindo o Brasil (HAMPSON et al., 2019), mas ainda estão muito acima do ECOFF (DANIEL et al., 2017), sugerindo que as mesmas possuem, provavelmente, mecanismos de resistência à esse antimicrobiano. Por ter sido um dos primeiros antimicrobianos empregados no controle à disenteria suína, o longo período de exposição possivelmente causou o aparecimento de mecanismos como mutações no gene do RNA ribossomal 23S (MAHU et al., 2017) ou mesmo a presença de um gene de resistência específico para lincomicina no transposon MTnSag1, denominado *lnu(C)* (LUCA et al., 2018).

Karlsson; Oxberry; Hampson (2002) consideram variações de uma diluição acima ou abaixo do valor de controle como aceitável para a padronização da técnica de CIM em caldo quando comparada à diluição em ágar. Contudo, no teste de microdiluição, algumas cepas apresentaram variações acima do limite proposto, chegando à um máximo de três diluições de amplitude (Tabela 3). Até a presente data, não existem estudos avaliando o efeito de sucessivas passagens em ágar de cultivo na resistência antimicrobiana para *B. hyodysenteriae*, contudo, Karlsson; Gunnarsson; Franklin (2001) relataram o desenvolvimento de resistência para pleuromutilinas após sucessivas passagens em ágar contendo concentrações crescentes de tiamulina. Em nosso estudo, não foi possível realizar o teste de microdiluição e o controle ao mesmo tempo, por limitações físicas de espaço e equipamentos, o que levou a diferenças no número de passagens de algumas cepas entre repetições e entre a técnica de CIM em microdiluição e do kit comercial, por vezes chegando a mais de dez passagens. Não temos condições de afirmar se esse aspecto interferiu nos resultados obtidos.

Até a presente data, este é o quarto estudo avaliando a sensibilidade antimicrobiana da *B. hyodysenteriae* para óleos essenciais ou extratos de origem vegetal no mundo. Vande Maele et al. (2016) foram um dos primeiros a testar essa sensibilidade, utilizando uma

técnica de diluição em caldo em placas de 48 poços, para eugenol, carvacrol, timol e cinamaldeído, além de ácidos orgânicos, para três cepas de *B. hyodysenteriae* (dois isolados de campo e uma cepa referência). Além de avaliar isoladamente, avaliaram também a combinação de dois produtos, encontrando resultados promissores para sinergismo apenas para carvacrol e timol (VANDE MAELE et al., 2016), o que, contudo, pode ser justificado pela similaridade molecular dos dois compostos.

Em outro estudo foi avaliada a sensibilidade à um extrato de tomilho, produzido *in house* e em várias concentrações, contra a *B. hyodysenteriae*, através de uma técnica de difusão em ágar (KUTASI et al., 2016). Nesse estudo, mediu-se o halo de inibição de crescimento da *B. hyodysenteriae* e foi realizada classificação em três categorias: sensível, moderadamente sensível e resistente. Foram encontrados resultados de sensibilidade em quase todas as diluições, exceto na menor (1:20000), onde o resultado variou entre resistente e moderadamente sensível de acordo com a filtragem do extrato. Já em outro estudo (DE NOVA et al., 2017) foi avaliada a atividade de extrato de frutas cítricas, produzido comercialmente no Brasil, sobre a *B. hyodysenteriae*, utilizando o teste de microdiluição em placa, similar ao realizado no presente estudo.

A comparação entre resultados no presente estudo e os demais é dificultada pelas diferentes metodologias aplicadas. Enquanto o presente estudo utilizou placas de 96 poços e uma única solução estoque de óleos essenciais, Vande Maele et al. (2016) utilizaram várias soluções, cada uma com a concentração a ser avaliada, em placas de 48 poços, em um volume três vezes maior do que o utilizado no presente estudo. Kutasi et al. (2016) avaliaram através da técnica de difusão em ágar um extrato onde o princípio ativo responsável pela suposta ação encontrada é desconhecido. Já De Nova et al. (2017) utilizaram uma técnica similar (alterando apenas a forma de diluição e contagem bacteriana), mas usando um produto comercial cujo principal componente por eles indicado é o ácido ascórbico. Entretanto, não há indicação da concentração desse princípio, nem mesmo afirmação se é este o princípio responsável pela ação, já que alguns cítricos, como limão, apresentam complexa constituição de óleos essenciais e potenciais princípios ativos (BEN HSOUNA et al., 2017).

Tabela 5. Valores de CIM originais e convertidos para µg/ml

Princípio ativo	CIM Original		CIM transformado		Fonte
	pH 7,2	pH 6,0	pH 7,2	pH 6,0	
Carvacrol	1,25mM	0,63mM	187,77µg/ml	94µg/ml	(VANDE MAELE et al., 2016)
Timol	1,25mM	0,63mM	187,77µg/ml	94µg/ml	(VANDE MAELE et al., 2016)
Cinamaldeído	0,31mM	0,31mM	41µg/ml	41µg/ml	(VANDE MAELE et al., 2016)
Extrato de cítricos	128-32ppm		12-32µg/ml		(DE NOVA et al., 2017)

Outra diferença entre os estudos que dificulta a comparação dos resultados está relacionada às escalas de trabalho escolhidas (em um estudo foi utilizado ppm, outro em mM, e outro apenas a razão de diluição), e por este motivo, no presente trabalho optamos por realizar a transformação das escalas apresentadas por outros autores (mM e ppm em µg/ml), quando possível, para fins de comparação, presentes na tabela 5. Por fim, a falta de informações no que tange a origem, pureza ou método de extração (caso tivessem realizado a extração dos óleos *in house*) torna inviável qualquer tentativa de consideração a respeito dos resultados, haja vista a impossibilidade em afirmar qual o princípio ativo pode estar relacionado àquele resultado.

O óleo essencial carvacrol é um fenol comumente encontrado em plantas dos gêneros *Origanum*, *Satureja* e *Thymus* e possui diversas aplicações tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana, sendo utilizado desde cosméticos até como preservadores de comida (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015). Como antimicrobiano, o carvacrol já teve sua ação estudada para alguns patógenos de suínos, como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (SI et al., 2006), sendo encontrados valores de CIM entre 100 µg/ml e 283 µg/ml para a *E. coli* e de 167 µg/ml para *Salmonella* spp. Avaliando sua ação sobre patógenos respiratórios de suínos à partir de extratos obtidos diretamente de plantas de *Origanum* e *Thymus*, Lebel et al. (2019) encontraram valores de CIM variando entre 0,039% a 0,625%, contudo as concentrações dos princípios ativos não eram constantes. Para a *B. hyodysenteriae* o valor de CIM para o carvacrol ficou entre 1,25 mM (187,77

µg/ml) e 0,63 mM (94 µg/ml), para os pH 7,2 e 6,0, respectivamente (VANDE MAELE et al., 2016). No presente estudo, as concentrações de carvacrol que apresentaram ação antimicrobiana ficaram entre 128 µg/ml e 256 µg/ml, valores que se aproximam daqueles encontrados para *Salmonella* spp, *E. coli* e *B. hyodysenteriae* no pH neutro (SI et al., 2006; VANDE MAELE et al., 2016), mas que são maiores do que os encontrados para o extrato de cítricos (32 µg/ml a 128 µg/ml) (DE NOVA et al., 2017).

Outra ação descrita para o carvacrol é a sua capacidade de reduzir a motilidade da *Salmonella* Typhimurium em doses consideradas sub-terapêuticas (entre 0,4 mM e 0,6 mM) (INAMUCO et al., 2012), porém sem alterar a presença de flagelos na bactéria. A avaliação de motilidade não foi realizada no presente estudo, contudo, este pode ser um mecanismo de redução dos quadros de disenteria suína, já que estudos demonstraram a importância da motilidade na patogenicidade da *B. hyodysenteriae* (KENNEDY; YANCEY, 1996; KENNEDY; ROSEY; YANCEY, 1997).

O timol pertence à mesma classe do carvacrol, sendo mais frequentemente isolado de plantas dos gêneros *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum*, e *Monarda* e vem sendo utilizado como saborizante e preservativo de alimentos há anos (MARCHESE et al., 2016). Apresenta ação antimicrobiana contra alguns enteropatógenos como *Salmonella* spp e *E. coli*, possuindo valores de CIM de 233 µg/ml e 100 µg/ml a 166 µg/ml, respectivamente (SI et al., 2006). Para patógenos respiratórios, apresentou os mesmos valores do que seu isômero, carvacrol, variando entre 0,039% e 0,625%, (LEBEL et al., 2019), o mesmo ocorreu para a *B. hyodysenteriae*, ficando entre 1,25 mM (187,77 µg/ml) e 0,63 mM (94,63 µg/ml) nos pH 7,2 e 6,0, respectivamente (VANDE MAELE et al., 2016). Avaliando a sua ação sobre *S. aureus* isolados de suínos, Lofa et al. (2019) encontraram valores de CIM variando entre 0,01% e 0,02%. No presente estudo, os valores de CIM para o timol sobre a *B. hyodysenteriae* foram os mesmos encontrados para o carvacrol (entre 128 µg/ml e 256 µg/ml), aproximando-se daqueles encontrados para outros enteropatógenos. Dado o maior número de cepas de *B. hyodysenteriae* avaliadas, os valores de CIM encontrados no presente trabalho refletem com maior clareza a real eficácia dos princípios ativos timol e carvacrol sobre a *B. hyodysenteriae*.

O cinamaldeído é um dos compostos bioativos produzidos por árvores do gênero *Cinnamomum*, principalmente, apresentando, junto com o trans-cinamaldeído diversas ações, dentre elas antimicrobiana, antitumoral, antifúngica e antidiabética (VASCONCELOS; CRODA; SIMIONATTO, 2018). Como antimicrobiano, apresentou valores de CIM de 133 µg/ml para *E. coli* e de 100 µg/ml para *Salmonella* spp (SI et al., 2006), enquanto para patógenos respiratórios de suínos apresentou resultados de CIM entre 0,0195% e 0,039% (LEBEL et al., 2019). Para a *B. hyodysenteriae*, apresentou resultado de CIM de 0,31 mM (aproximadamente 41 µg/ml) (VANDE MAELE et al., 2016), sendo o mais eficiente dentre os óleos essenciais avaliados para a *B. hyodysenteriae*. De forma similar, apenas uma das cepas avaliadas no presente estudo apresentou valor de CIM para o cinamaldeído acima de 128 µg/ml, enquanto para os demais óleos essenciais pelo menos quatro cepas apresentaram valores de CIM acima de 128 µg/ml (Tabela 4). Os valores encontrados estão mais próximos daqueles descritos para *Salmonella* spp. e *E. coli* (SI et al., 2006). Assim, mesmo apresentando valores de CIM acima daqueles encontrados por Vande Maele et al (2016), dos óleos essenciais avaliados no presente trabalho, o cinamaldeído apresentou menor valor de CIM90, indicando que este poderia ser o óleo essencial de eleição para um possível controle profilático da *B. hyodysenteriae*.

Discute-se, atualmente, que a real importância de óleos essenciais na substituição dos antimicrobianos não seja simplesmente pela sua ação antimicrobiana, e sim pelo conjunto de ações modulatórias que produzem no microbioma, imunidade e funções intestinais (OMONIJO et al., 2018). O efeito antioxidante de alguns óleos essenciais como carvacrol e timol (KAČÁNIOVÁ et al., 2012; ZOU et al., 2016) pode auxiliar na redução de danos causados pelo estresse oxidativo, como perda de desempenho, perda de qualidade de carne, necrose hepática, entre outros (OMONIJO et al., 2018).

O efeito dos óleos essenciais sobre o microbioma intestinal ainda é pouco conhecido, existindo alguns estudos que demonstram a alteração na composição bacteriana, contudo, não há qualquer definição sobre os reais impactos nessa alteração de composição do microbioma intestinal sobre a proteção ou predisposição à colonização por algum

enteropatógeno (NAMKUNG et al., 2004; CASTILLO et al., 2006; MICHIELS et al., 2009; ZENG et al., 2015; WEI et al., 2017; CAIRO et al., 2018; WANG et al., 2019). Dessa forma, novas técnicas, mais recentes, são necessárias para avaliar a importância dessa alteração de microbiota em decorrência da aplicação de óleos essenciais na ração e, possivelmente, realizar estudos *in vivo* para que se possa ter a real resposta do efeito protetivo desses óleos essenciais para as infecções por *B. hyodysenteriae*.

Outro possível mecanismo de ação protetiva dos óleos essenciais para enteropatógenos é a modulação da resposta imune, reduzindo a inflamação por manipular a via NF- κ B e Nrf2, responsável pela ativação de fatores nucleares para a produção de interleucinas e quimiocinas, e defesa contra o estresse oxidativo (KROISMAYR et al., 2008; ZOU et al., 2016). Efeitos esses geralmente associados aos óleos essenciais carvacrol e timol. O cinamaldeído apresenta ação reduzindo lesões devido à inflamação causada por lipopolissacarídeos (OMONIJO et al., 2018). Assim sendo, a ação dos óleos essenciais *in vitro* seria de menor importância, já que a sua ação direta sobre a bactéria não necessariamente traria os benefícios esperados, mas sim a soma dos mecanismos protetivos anti-inflamatórios e da modulação do microbioma intestinal, o que poderia reduzir a capacidade de colonização da *B. hyodysenteriae*, e, mesmo havendo colonização, não haveriam lesões relacionadas à resposta inflamatória gerada. Contudo, a avaliação *in vitro* ainda deveria ser realizada, dado seu baixo custo e facilidade de interpretação dos resultados quando comparado ao modelo *in vivo*. Dessa forma, a técnica *in vitro* poderia funcionar como um método de triagem para a seleção de possíveis agentes antimicrobianos e padronização das doses a serem avaliadas no modelo *in vivo*.

A suinocultura representa uma parcela considerável da economia brasileira e mundial, movimentando milhões de dólares ao ano. A disenteria suína é uma doença grave, com considerável índice de mortalidade e perdas produtivas nos rebanhos acometidos, principalmente naqueles que não possuem um sistema de controle da doença, gerando prejuízos diretos e indiretos ao produtor. Nos últimos anos houve um aumento do número de relatos de cepas resistentes aos principais antimicrobianos utilizados para o seu controle, como pleuromutilinas e lincosamidas. Dessa forma, a escolha correta de um

antimicrobiano eficaz é de suma importância, utilizando-o em dose e período necessários para tentar evitar o desenvolvimento dessa resistência, e a melhor forma de se saber essa sensibilidade é através da técnica de concentração mínima inibitória (CIM). Contudo, as técnicas em ágar são extremamente laboriosas e permitem a avaliação de apenas um antimicrobiano por vez, enquanto o kit comercial VetMIC™ Brachy SVA permitia a avaliação de até seis antimicrobianos, previamente estabelecidos. Porém, a produção comercial desse kit foi encerrada em meados de 2018, sendo necessárias novas técnicas para avaliar a sensibilidade antimicrobiana. Por essa razão, padronizou-se a técnica de microdiluição, que além de substituir com confiabilidade e segurança o kit VetMIC™ Brachy SVA, permite a avaliação de diferentes princípios ativos e outros produtos, por exemplo, substitutos aos antimicrobianos convencionais, como os óleos essenciais.

Dessa forma, países e comunidades econômicas como Estados Unidos e União Europeia lideram as restrições ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, visando controlar o desenvolvimento da resistência antimicrobiana, gerando assim uma pressão na busca e desenvolvimento de antimicrobianos alternativos, como os óleos essenciais e ácidos orgânicos, que atualmente são os mais pesquisados, porém através de metodologias diferentes e conseqüentemente resultados díspares e incomparáveis entre si. Com isso em mente, buscamos um método de avaliação de sensibilidade à esses óleos essenciais baseado em nossos resultados na técnica de microdiluição, e assim, propõe-se que a técnica de microdiluição passe a ser utilizada como metodologia padrão na avaliação de sensibilidade microbiana, tanto para óleos essenciais quanto para demais produtos, incluindo antimicrobianos, dada facilidade de execução da técnica e aplicabilidade a praticamente qualquer bactéria que possua crescimento em caldo.

5. CONCLUSÃO

O teste de microdiluição, proposto no presente estudo, apresenta-se como uma alternativa viável ao kit comercial, uma vez que obteve resultados similares ao kit, além de ser um teste de fácil execução, prático e com maiores possibilidades de avaliação de diferentes

concentrações e princípios ativos. Futuros estudos são necessários para melhorar a acurácia do teste e compará-lo ao método de diluição em ágar.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os óleos essenciais carvacrol, timol e cinamaldeído apresentam baixa atividade *in vitro* no controle da *B. hyodysenteriae*. Até o presente momento, este é o quarto trabalho avaliando a sensibilidade *in vitro* de *B. hyodysenteriae* à óleos essenciais no mundo, e o primeiro utilizando a técnica de microdiluição. Mais estudos são necessários para avaliar a real eficácia dos óleos essenciais contra cepas de *B. hyodysenteriae* em experimentos *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

ABPA. **Relatório Anual 2017**, 2018. . Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2018>>.

ACHACHA, M.; MESSIER, S. Comparison of six different culture media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 249–251, 1992.

AGUIAR, F. C. de et al. Antimicrobial activity of selected essential oils against *Streptococcus suis* isolated from pigs. **Microbiology Open**, n. February, p. 1–6, 2018.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Swine dysentery: Aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 5, p. 1927–1947, 2013.

BARCELLOS, D. E.; 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. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 725–729, 2003.

BARCELLOS, D. E. S. N. et al. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. **Veterinary Record**, v. 146, n. 14, p. 398–403, 2000.

BELGARD, M. I. et al. Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete

Brachyspira hyodysenteriae reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.

BEN HSOUNA, A. et al. Citrus lemon essential oil: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2017.

BETTAIEB REBEY, I. et al. Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 238–245, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.09.013>>.

BIKSI, I. et al. Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 55, n. 2, p. 219–227, 2007.

BLACK, M. et al. Analysis of multiple *Brachyspira hyodysenteriae* genomes confirms that the species is relatively conserved but has potentially important strain variation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.

BORGSTRÖM, A. et al. A novel multiplex qPCR targeting 23S rDNA for diagnosis of swine dysentery and porcine intestinal spirochaetosis. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2017.

BOSKOVIC, M. et al. Antimicrobial Activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 18–21, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.005>>.

BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 33–44, 1999.

BOYE, M. et al. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA *in situ* hybridization. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, n. 5, p. 323–330, 1998.

BRASIL. Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento: INSTRUÇÃO

NORMATIVA Nº 14, DE 17 DE MAIO DE 2012. **Diário Oficial da União**, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento: INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 45, DE 22 DE NOVEMBRO DE 2016. **Diário Oficial da União**, v. 229, 2016b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento: INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 17 DE JULHO DE 2019. **Diário Oficial da União**, 2019.

BRANDENBURG et al. Swine dysentery: inoculation of gnotobiotic pigs with *Treponema hyodysenteriae* and *Vibrio coli* and a *Peptostreptococcus*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 41, n. 3, p. 294-301, 1977.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1–2, p. 1–14, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>>.

BURROUGH, E. R. et al. Fluorescent *in situ* hybridization for detection of “*Brachyspira hamptonii*” in porcine colonic tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 3, p. 407–412, 2013.

BURROUGH, E. R. Swine Dysentery: Etiopathogenesis and Diagnosis of a Reemerging Disease. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 1, p. 22–31, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0300985816653795>>.

CAIRO, P. L. G. et al. Effects of dietary supplementation of red pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil on performance, small intestinal morphology and microbial counts of weanling pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 2, p. 541–548, 2018.

CALDERARO, A. et al. Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 3–4, p. 229–234, 2005.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>>.

CARD, R. M. et al. Identification of a new antimicrobial resistance gene provides fresh insights into pleuromutilin resistance in *Brachyspira hyodysenteriae*, aetiological agent of swine dysentery. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1183, 2018.

CARVAJAL, A. et al. Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. **Veterinary Record**, v. 158, p. 700–701, 2006.

CASAS, V. et al. The Exposed Proteomes of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1103, 2016. Disponível em <dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01103>.

CASTILLO, M. et al. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2725–2734, 2006.

CHEN, B.-J. et al. Cinnamaldehyde Analogues as Potential Therapeutic Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 33–43, 2016.

DANIEL, A. G. de S. et al. Infecção por *Brachyspira* sp. em suínos no Brasil. (D. E. Barcellos et al., Eds.) In: VIII SINSUI - Simpósio Internacional de Suinocultura, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: 2013.

DANIEL, A. G. de S. Determinação dos padrões de Concentração Mínima Inibitória (MIC) e caracterização genotípica de cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos com quadros clínicos de disenteria suína no Brasil. 2014. UFMG, 2014.

DANIEL, A. G. S. et al. Minimum inhibitory concentration of Brazilian *Brachyspira hyodysenteriae* strains. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 331–338, 2017.

DE NOVA, P. J. G. et al. *In vitro* susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to a commercial citrus fruit extract. **Research in Veterinary Science**, v. 115, n. April, p. 318–324, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.06.010>>.

FERRI, M. et al. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2857–2876, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>>.

FILHO, J. X. de O. et al. Ocorrência de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Salmonella* sp. em suínos com diarreia na região norte do estado do Mato Grosso. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 4, p. 218–223, 2010.

FRIEDMAN, M. Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 48, p. 10406–10423, 2017.

GARCÍA-MARTÍN, A. B. et al. Predominance of a macrolide-lincosamide-resistant *Brachyspira hyodysenteriae* of sequence type 196 in Swiss pig herds. **Veterinary Microbiology**, v. 226, n. July, p. 97–102, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.007>>.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. a. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5750–5755, 2004.

GÖMMEL, M. et al. Adherence of *Brachyspira hyodysenteriae* to porcine intestinal epithelial cells is inhibited by antibodies against outer membrane proteins. **Current Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 286–292, 2013.

HAMPSON, D. J. et al. *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from apparently healthy pig herds following an evaluation of a prototype commercial serological ELISA. **Veterinary Microbiology**, v. 191, p. 15–19, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.016>>.

HAMPSON, D. J. et al. Antimicrobial resistance in *Brachyspira* – An increasing problem for disease control. **Veterinary Microbiology**, v. 229, p. 59–71, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.019>>.

HAMPSON, D. J.; BURROUGH, E. R. Swine Dysentery and Brachyspiral Colitis. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Ed.). **Diseases of Swine**. 11. ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2019. p. 951–970.

HAMPSON, D. J.; WANG, P. Colonic Spirochetes: What Has Genomics Taught Us?

Current Topics in Microbiology and Immunology, v. 415, p. 273–294, 2018.

HERBST, W. et al. An update of *Brachyspira hyodysenteriae* serotyping. **Research in Veterinary Science**, v. 111, p. 135–139, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.02.015>>.

HONTECILLAS, R. et al. CD4+ T-cell responses and distribution at the colonic mucosa during *Brachyspira hyodysenteriae*-induced colitis in pigs. **Immunology**, v. 115, n. 1, p. 127–135, 2005.

HUMPHREY, S. B. et al. Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hyodysenteriae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 323–329, 1997.

HYATT, D. R. et al. Reduced of virulence *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2244–2248, 1994.

INAMUCO, J. et al. Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella Typhimurium* motility and invasion of porcine epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 200–207, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.021>>.

KAČÁNIOVÁ, M. et al. Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* essential oils. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 2, n. 1, p. 263–271, 2012.

KALRA, E. K. Nutraceutical - Definition and introduction. **AAPS Journal**, v. 5, n. 3, p. 1–2, 2003.

KARLSSON, M. et al. Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2596–2604, 2003.

KARLSSON, M. et al. Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 281–285, 2004.

- KARLSSON, M.; GUNNARSSON, A.; FRANKLIN, A. Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 59–66, 2001.
- KARLSSON, M.; OXBERRY, S. L.; HAMPSON, D. J. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 1–2, p. 123–133, 2002.
- KENNEDY, M. J. et al. Association of *Treponema hyodysenteriae* with Porcine Intestinal Mucosa. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 1565–1576, 1988.
- KENNEDY, M. J.; ROSEY, E. L.; YANCEY, R. J. Characterization of *flaA*- and *flaB*-mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: Both flagellin subunits, *flaA* and *flaB*, are necessary for full motility and intestinal colonization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, n. 1, p. 119–128, 1997.
- KENNEDY, M. J.; YANCEY, R. J. Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*. **Veterinary Microbiology**, v. 49, n. 1–2, p. 21–30, 1996.
- KIM, N. Y.; AHN, S. G.; KIM, S. A. Cinnamaldehyde protects human dental pulp cells against oxidative stress through the Nrf2/HO-1-dependent antioxidant response. **European Journal of Pharmacology**, v. 815, n. February, p. 73–79, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.004>>.
- KROISMAYR, A. et al. Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, n. 9, p. 377–387, 2008.
- KUTASI, J. et al. The *in vitro* effect of garden thyme (*thymus vulgaris* l.) extract on *Brachyspira hyodysenteriae*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 63, n. 4, p. 467–473, 2016.
- LA, T. et al. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 284–288, 2006.

LA, T. et al. Evidence that the 36kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 150–155, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.053>>.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3372–3375, 2003.

LA, T. et al. An atypical weakly haemolytic strain of *Brachyspira hyodysenteriae* is avirulent and can be used to protect pigs from developing swine dysentery. **Veterinary Research**, v. 50, n. 47, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s13567-019-0668-5>>.

LEBEL, G. et al. Antibacterial activity against porcine respiratory bacterial pathogens and *in vitro* biocompatibility of essential oils. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 6, p. 833–840, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-019-01655-7>>.

LEKAGUL, A.; TANGCHAROENSATHIEN, V.; YEUNG, S. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. **Veterinary and Animal Science**, v. 7, n. January, p. 100058, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>>.

LÖBERT, S. et al. Occurrence of *Brachyspira hyodysenteriae* in multiplier pig herds in Switzerland. **Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2016.

LOBOVÁ, D.; SMOLA, J.; CIZEK, A. Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 287–291, 2004.

LOFA, A. et al. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains of swine origin: molecular typing and susceptibility to oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) extract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, p. 1048–1056, 2019.

LUCA, S. De et al. Transposon-associated lincosamide resistance *lnu(C)* gene identified in *Brachyspira hyodysenteriae* ST83. **Veterinary Microbiology**, v. 214, n. November

2017, p. 51–55, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.003>>.

MAHU, M. et al. Presence and mechanisms of acquired antimicrobial resistance in Belgian *Brachyspira hyodysenteriae* isolates belonging to different clonal complexes. **Veterinary Microbiology**, v. 207, n. May, p. 125–132, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.022>>.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>>.

MARON, D. F.; SMITH, T. J. S.; NACHMAN, K. E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization and Health**, v. 9, n. 48, p. 1–11, 2013. Disponível em: <Globalization and Health>.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 1–26, 2017. Disponível em: <www.chathamhouse.org>.

MESSIER, S.; HIGGINS, R.; MOORE, C. Minimal inhibitory concentrations of five antimicrobials against *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 4, p. 330–333, 1990.

MICHIELS, J. et al. *In vitro* characterisation of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. **Animal Feed Science and Technology**, v. 151, p. 111–127, 2009.

MILNER, J. A.; SELLWOOD, R. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: Potential role in intestinal colonization. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 9, p. 4095–4099, 1994.

MOTRO, Y. et al. Identification of genes associated with prophage-like gene transfer agents in the pathogenic intestinal spirochaetes *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia*. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3–4, p. 340–345, 2009.

- NAMKUNG, H. et al. Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 4, p. 697–704, 2004.
- NEILL, C. R. et al. Effects of oregano oil on growth performance of nursery pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 14, n. 6, p. 312–316, 2006.
- NEVES, S. M. N.; GABARDO, M. de P.; GUEDES, R. M. C. Hibridização *in situ* fluorescente para diagnóstico de *Brachyspira hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 275–288, 2015.
- NOVOTNÁ, M.; ŠKARDOVÁ, O. *Brachyspira hyodysenteriae*: Detection, identification and antibiotic susceptibility. **Veterinarni Medicina**, v. 47, n. 4, p. 104–109, 2002.
- OLIVEIRA, B. R. et al. Investigação de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos com diarreia no Espírito Santo, Brasil. v. 38, n. 3, p. 287–291, 2016.
- OLSON, L. D. Enhanced isolation of *Serpulina hyodysenteriae* by using sliced agar media. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2937–2941, 1996.
- OMONIJO, F. A. et al. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 126–136, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>>.
- PRINGLE, M. et al. Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1295–1306, 2004.
- PRINGLE, M. et al. Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 54, 2012.
- PRINGLE, M.; FELLSTRÖM, C.; JOHANSSON, K. E. Decreased susceptibility to doxycycline associated with a 16S rRNA gene mutation in *Brachyspira hyodysenteriae*. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 1–3, p. 245–248, 2007.

QUINTANA-HAYASHI, M. P. et al. The Levels of *Brachyspira hyodysenteriae* binding to porcine colonic mucins differ between individuals, and binding is increased to mucins from infected pigs with De Novo MUC5AC synthesis. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1610–1619, 2015.

QUINTANA-HAYASHI, M. P. Neutrophil Elastase and Interleukin 17 *Brachyspira hyodysenteriae* Infection Synergistically with the Pathogen Induce Increased Mucus Transport Speed and. v. 85, n. 8, p. 1–16, 2017.

QUINTANA-HAYASHI, M. P. et al. Role of sialic acid in *Brachyspira hyodysenteriae* adhesion to pig colonic mucins. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 7, 2019.

RUGNA, G. et al. Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003-2012. **Veterinary Journal**, v. 203, n. 1, p. 115–119, 2015.

SATO, J. P. H.; DANIEL, A. G. de S.; GUEDES, R. M. C. Evolução da infecção por *Brachyspira hyodysenteriae* nos últimos anos no Brasil e medidas de controle adotadas. In: IX SINSUI - Simpósio Internacional de Suinocultura, **Anais...**2015.

SEMRET, M.; HARAOU, L. P. Antimicrobial Resistance in the Tropics. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 231–245, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.009>>.

SHREAZ, S. et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 112, p. 116–131, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016>>.

SI, W. et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 296–305, 2006.

SONG, Y. et al. Development of a serological ELISA using a recombinant protein to identify pig herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. **Veterinary Journal**, v. 206, n. 3, p. 365–370, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.021>>.

STANTON, T. B. et al. Collateral Effects of Antibiotics: Carbadox and Metronidazole Induce VSH-1 and Facilitate Gene Transfer among *Brachyspira hyodysenteriae* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 10, p. 2950–2956, 2008.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304–318, 2015.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. December, 2016.

TAYLOR, D. J.; ALEXANDER, T. J. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. **The British veterinary journal**, v. 127, n. 11, p. 58–61, 1971. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)37282-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1935(17)37282-2)>.

TER HUURNE, A. A. H. M. et al. Inactivation of a *Serpula (Treponema) hyodysenteriae* hemolysin gene by homologous recombination: Importance of this hemolysin in pathogenesis of *S. hyodysenteriae* in mice. **FEMS Microbiology Letters**, v. 92, n. 1, p. 109–113, 1992.

TER HUURNE, A. A. H. M. et al. Characterization of three putative *Serpulina hyodysenteriae* hemolysins. **Microbial Pathogenesis**, 1994. .

UNION, T. E. P. A. T. C. O. T. E. I (Legislative acts) REGULATIONS REGULATION (EU) 2019/4 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 11 December 2018 on the manufacture, placing on the market and use of medicated feed, amending Regulation (EC) No 183/2005 of the European Parliament. p. 1–23, 2019. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0004&from=EN>>.

UPADHAYA, S. D.; KIM, I. H. Efficacy of phytogetic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals - A review. **Annals of Animal Science**, v. 17, n. 4, p. 929–948, 2017.

UPADHYAY, A. et al. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

VADILLO, S. et al. Isolation of *Brachyspira* species from farmed wild boar in Spain. **Veterinary Record**, v. 181, n. 6, p. 5–8, 2017.

VANDE MAELE, L. et al. *In vitro* susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to organic acids and essential oil components. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 2, p. 325–328, 2016.

VASCONCELOS, N. G.; CRODA, J.; SIMIONATTO, S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, n. April, p. 198–203, 2018.

VIOTT, A. M. et al. The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 145–151, 2013.

WANG, L. et al. Effects of orange essential oil on intestinal microflora in mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 8, p. 4019–4028, 2019.

WEI, H. et al. A carvacrol – thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. **Animal**, v. 11, n. 2, p. 193–201, 2017.

WILBERTS, B. L. et al. Comparison of Lesion Severity, Distribution, and Colonic Mucin Expression in Pigs With Acute Swine Dysentery Following Oral Inoculation With “*Brachyspira hamptonii*” or *Brachyspira hyodysenteriae*. **Veterinary Pathology**, V. 51, n. 6, p. 1096-1108, 2014.

WILCOCK, B. P.; OLANDER, H. J. Studies on the Pathogenesis of Swine Dysentery. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 5, p. 567–573, 1979.

WU, C. et al. Cinnamaldehyde induces apoptosis and reverses epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ β -catenin pathway in non-small cell lung cancer.

International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v. 84, p. 58–74, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.01.005>>.

XIONG, W.; SUN, Y.; ZENG, Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 18377–18384, 2018.

YAN, L.; MENG, Q. W.; KIM, I. H. The effect of an herb extract mixture on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. **Livestock Science**, v. 141, n. 2–3, p. 143–147, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2011.05.011>>.

YANG, C. et al. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: Potentials and challenges in application. **Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 137–156, 2015.

ZENG, Z. et al. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 3, p. 279–285, 2015.

ZHAI, H. et al. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 179–186, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>>.

ZOU, Y. et al. Oregano Essential Oil Induces SOD1 and GSH Expression through Nrf2 Activation and Alleviates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in IPEC-J2 Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.