

Amanda Gabrielle de Souza Daniel

**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**

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

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2014

Daniel, Amanda Gabrielle de Souza, 1987-  
D184d 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 / Amanda Gabrielle de Souza Daniel. – 2014.

39p. : il.

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

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

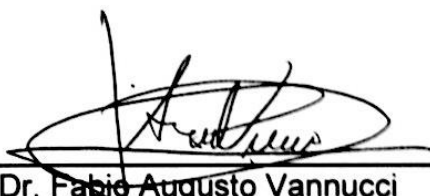
CDD – 636.408 96

Dissertação defendida e aprovada em 23 de janeiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



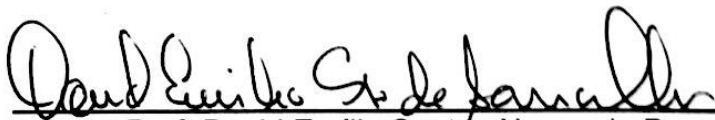
---

Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Presidente - Orientador



---

Dr. Fábio Augusto Vannucci  
Laboratório Microvet



---

Prof. David Emilio Santos Neves de Barcellos  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Dedico à minha família pelo  
amor eterno acima de tudo.  
Meu alicerce.  
Minha inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Ninguém é feliz e realizado sozinho, por trás de todo sonho, todo trabalho existem pessoas que mesmo de forma indireta são essenciais para nossa caminhada. Primeiramente agradeço a Deus e Nossa Senhora que me acompanham e me iluminam a cada passo, não me deixando abater diante das dificuldades.

Meus pais, Conceição, Paulo e Graça por acreditarem em mim acima de tudo, por me amarem e simplesmente serem a razão da minha caminhada. Meus irmãos Matheus, Thamara, Pollyanna, Michelle, Vanusa e Rodrigo, por existirem, me fazendo rir e chorar, porém sempre ao meu lado me ajudando a levantar.

Aos meus amigos, novos e antigos que passaram a todas as etapas comigo, dividiram minhas incertezas, apelos e vitórias. Em especial Cynthia, Jú, Laís, Priscilla, Eliana, Talita e Michelle.

Aos meus irmãos da Patologia que participaram em grande parte da minha vida, me ajudaram, nas horas difíceis, no momento em que precisei de um abraço, um conforto. Aos meus irmãos dos suínos, Michelle, Talita, Carlos, Sato, Eliana, Saira, Luiza, Gabriella, Patrícia, Rafaela, Lucas, Priscilla e Matheus pelo apoio em tudo que eu precisei, pela amizade, companheirismo, pelos conselhos, conversas e pela convivência essencial para todo trabalho.

Queria agradecer em especial a Michelle Gabardo e Talita Resende que além de amigas e fonte do meu crescimento pessoal, foram minhas eternas companheiras durante todo experimento. Ao Rodrigo Macedo por me salvar muitas vezes durante esse período, e estar sempre disposto a me ajudar acima de tudo.

Ao professor David Barcellos e Fábio Vannucci pelo apoio e auxílio durante a execução do meu trabalho.

Ao professor Roberto Maurício Carvalho Guedes pela maravilhosa oportunidade de desenvolver esse trabalho, pelo grande auxílio, seus ensinamentos e ser um exemplo profissional a ser seguido.

Agradeço a minha cachorrinha Melissa que me acompanha já há muitos anos na minha vida, minha eterna companheira e sempre será mesmo quando partir.

E finalmente, porém não menos importante agradeço as *Brachyspira* sp., que viraram minha paixão, fonte de conhecimento que despertam em mim a sede do saber.

Quando achas um diamante  
que não é de ninguém, ele é teu.

Quando achas uma ilha  
que não é de ninguém, ela é tua.  
Quando tens uma idéia primeiro,  
tu a fazes registrar: ela é tua.

E quanto a mim,  
eu possuo as estrelas,  
pois ninguém antes de mim  
teve a ideia de as possuir.

**(O Pequeno Príncipe)**  
**Antoine de Saint-Exupéry.**

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO</b> .....	10
	<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
2.1	HISTÓRICO.....	11
2.2	DISENTERIA SUÍNA.....	12
2.3	PATOGÊNESE.....	12
2.4	LESÕES.....	13
2.5	DIAGNÓSTICO.....	13
2.6	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	14
2.7	PREVALÊNCIA.....	14
2.8	USO DE ANTIMICROBIANOS PARA CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA DISENTERIA SUÍNA.....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1	LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	17
3.2	AMOSTRAS.....	17
3.3	ISOLAMENTO BACTERIANO.....	17
3.4	HISTOPATOLOGIA.....	17
3.5	PCR DUPLEX PARA <i>B. hyodysenteriae</i> e <i>B. pilosicoli</i> .....	17
3.6	NOX-PCR E SEQUENCIAMENTO.....	19
3.7	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	19
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	19
4.1	AMOSTRA.....	19
4.2	IDENTIFICAÇÃO POR ISOLAMENTO BACTERIANO E PCR DUPLEX.....	20
4.3	ALTERAÇÕES NATOMOPATOLÓGICAS.....	20
4.3.1	Macroscopia.....	20
4.3.2	Histopatologia.....	20
4.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	21
4.5	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	21
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	28
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b> .....	37



---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Classificação taxonômica do gênero <i>Brachyspira</i> sp. ....	12
Tabela 2 -	Listagem de rebanhos amostrados nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul no período de 2011 a 2013.....	18
Tabela 3 -	Número e percentagem de isolados de <i>Brachyspira</i> sp. obtidos por estado.....	18
Tabela 4 -	Distribuição por estados brasileiros de amostras avaliadas para Concentração Inibitória Mínima (MIC – Minimum Inhibitory Concentration).....	23
Tabela 5 -	Mediana, moda, valor de concentração inibitória mínima para a qual 50% e 90% dos isolados de <i>B. hyodysenteriae</i> sensíveis (MIC 50, 90) para os diferentes antibióticos testados.....	23
Tabela 6 -	Pontos de corte microbiológicos e pontos de corte clínicos de MIC antimicrobianos comumente utilizados, comparados com valores de (MIC 90) dos isolados no presente estudo.....	23
Tabela 7 -	Comparativo entre os resultados de MIC50 e MIC90 encontrados na literatura para técnica de diluição em caldo em relação ao presente estudo.....	24

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 -	(A) Placa de ágar sangue (TSA): colônias puras de <i>B. hyodysenteriae</i> , evidenciando hemólise forte em áreas de crescimento das colônias. (B) <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> visualizadas sob contraste de fase 600x.....	20
Figura 2 -	Árvore filogenética baseada em sequências do gene NOX de uma população de 30 <i>Brachyspira</i> sp. isoladas e alinhadas (596 pb). O alinhamento foi criado usando o cálculo de distância (Kimura) e Neighbour-joinng. Isolados com asteriscos representam as amostras do presente estudo. .....	22
Figura 3 -	Susceptibilidade antimicrobiana. Distribuição do MIC de seis agentes antimicrobianos para 22 isolados de campo brasileiros de <i>B. hyodysenteriae</i> . As setas pretas indicam valores do corte em relação a estirpe selvagem (Pringle et al. 2012). .....	25

---

## LISTA DE ANEXOS

---

Anexo 1 -	Nomes das espécies e origem das cepas de referência de <i>Brachyspira</i> sp., com 100% de identidade com as amostra consultadas pelo GenBank (C7003).....	37
Anexo 2 -	Nomes das espécies e origem das cepas de referência de <i>Brachyspira</i> sp., com 100% de identidade com as amostra consultadas pelo GenBank.....	38

## RESUMO

Objetivou-se a caracterização molecular e avaliação de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil. Foram executadas avaliações de concentração inibitória mínima de 22 isolados brasileiros de *B. hyodysenteriae* recuperados entre 2011 e 2013 frente as drogas tilosina, tiamulina, valnemulina, lincomicina e tilvalosina. Os surtos de disenteria suína foram diagnosticados com base na apresentação clínica, lesões macro e microscópicas, PCR duplex para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* e sequenciamento do gene *Nox*. Os valores encontrados foram consistentemente elevados em relação ao ponto de corte microbiológico descrito na literatura para todos antimicrobianos testados sob o método de diluição em caldo. As MICs 50 e 90 encontradas por droga testada foram, respectivamente, 2 µg/ml e 8 µg/ml para doxiciclina 2 µg/ml e >4 e µg/ml para vanemulin, 8µg/ml e 8 µg/ml para tiamulina, 16 µg/ml e 32 µg/ml para tilvalosina, 64 µg/ml e >64 µg/ml para lincomicina e >128 µg/ml e >128 µg/ml para tilosina. Estes resultados assemelham-se à literatura, exceto os referentes à tiamulina, doxiciclina e tilvalosina que se mostraram mais elevados no presente estudo. As amostras submetidas a análise filogenética baseada no gene *Nox* mostraram-se idênticas entre si, com 100% de identidade para *B. hyodysenteriae*, com exceção de uma amostra confirmada como *B. murdochii* e excluída da análise de sensibilidade antimicrobiana.

**Palavras-chave:** disenteria suína, MIC, diarreia, antimicrobianos, sequenciamento gene *Nox*.

## ABSTRACT

*The objectives of this study were to characterize molecularly Brachyspira hyodysenteriae isolates obtained from pigs in Brazil and to evaluate their antimicrobial susceptibility profiles based on Minimal Inhibitory Concentration test (MIC). The MICs of 22 Brazilian isolates of B. hyodysenteriae from 2011 to 2013 were performed using the following antimicrobial molecules: tylosin, tiamulin, valnemulin, lincomycin and tilvalosin. Outbreaks of swine dysentery were diagnosed based on clinical presentation, gross and microscopic lesions, duplex PCR for B. hyodysenteriae and B. pilosicoli and Nox gene sequencing. All MIC values were consistently higher or equal than the microbiological cutoff described in the literature. MICs 50 and 90 for the tested drugs were, respectively, 2 µg / ml and 8 µg / ml for doxycycline 2µg / ml and > and 4µg / ml for valnemulin, 8µg/mL and 8 µg / ml for tiamulin, 16 µg / ml and 32 µg / ml for tyvalosin , 64 µg / ml and > 64 µg / ml for lincomycin and > 128 µg / ml and > 128µ g / ml for tylosin. These results largely corroborate the literature, except the highest scores found for tiamulin, doxycycline and tilvalosin. All samples submitted to phylogenetic analysis based on the Nox gene sequence were similar among themselves, with 100 % identity to B. hyodysenteriae. One of the Brachyspiras isolates was confirmed to be B. murdochii by Nox gene sequence analysis, therefore was excluded from antimicrobial susceptibility Analysis.*

**Key words:** swine dysentery, MIC, diarrhea, antimicrobial, Nox gene sequencing.

## 1. INTRODUÇÃO

*Brachyspira. hyodysenteriae* é o agente primário da disenteria suína, que é caracterizada por diarreia mucohemorrágica grave com alta morbidade podendo ser fatal em animais não tratados (Taylor & Alexander, 1971). A partir de 2007, foi observado um aumento no número de casos clínicos dessa enfermidade, principalmente nos Estados Unidos e Canadá.

No Brasil, desde 2010, foram dezoito novos surtos de disenteria suína diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal da UFMG, fato preocupante e de grande importância, dado ao histórico anterior ligado apenas a casos esporádicos de baixo impacto econômico. Atualmente grandes regiões produtoras de suínos do país possuem casos confirmados de disenteria suína correspondendo aproximadamente a 2/3 da produção nacional.

Uma explicação dada para a elevação de número de casos em muitos países é a diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento e controle desta enfermidade. A existência de cepas de *Brachyspira* sp. com reduzida resposta aos antimicrobianos, anteriormente eficazes, é uma questão preocupante, uma vez que, estudos em diversos países demonstram que a resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento da infecção por *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* é um problema crescente. Dessa forma, a avaliação da resistência em isolados clínicos é essencial para o completo entendimento do quadro atual.

Apesar de sua importância clínica, não existem dados sobre a sensibilidade antimicrobiana de isolados brasileiros de *Brachyspira* sp. Desta forma, diretrizes quanto ao uso de antimicrobianos para o tratamento e controle da Disenteria Suína e Colite Espiroquetal no Brasil vem sendo baseadas na literatura internacional (Guedes, 2010).

Sendo assim, propõe-se neste estudo a caracterização das cepas de *B. hyodysenteriae* circulantes no Brasil e a determinação de padrões brasileiros de concentração inibitória mínima para amostras isoladas de suínos com doença clínica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Dentre os principais agentes causadores de diarreia em suínos de recria e terminação encontram-se as bactérias do gênero *Brachyspira*, sendo as espécies *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* patogênicas para suínos (Taylor & Alexander, 1971; Taylor et al., 1980) e já descritas na América Latina. Além das espécies anteriormente citadas, outras têm sido encontradas no trato gastrointestinal dos animais e seres humanos, como *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, *B. suanatina*, *B. alvinipulli* e *B. aalborgi*. Com exceção das duas últimas, as demais são encontradas no intestino de suínos (Stanton, 2006; Rasback et al., 2007).

As *Brachyspiras* são bactérias anaeróbias de crescimento fastidioso e crescem bem entre 37 a 42°C em ágar sangue, e, no caso da *B. hyodysenteriae* ocorre produção de forte beta hemólise em ágar sangue (Lemcke et al., 1979; Hampson et al., 2006). No Brasil até o momento, *B. hyodysenteriae* tem sido o agente responsável pelos casos de disenteria suína reportados (Daniel et al., 2013).

### 2.1 Histórico

O primeiro relato ligado à infecção por espiroquetas associado à diarreia em suínos foi no ano de 1921 (Whittig et al., 1921, APUD Hampson & Trott, 1995). Ao longo dos anos, o papel das espiroquetas foi sendo caracterizado quanto aos sinais clínicos e lesões específicas. No início da década de 70, Taylor & Alexander (1971) e Harris et al. (1972) demonstraram que bactéria do gênero *Treponema*, atual *B. hyodysenteriae*, era o agente etiológico da disenteria suína.

Além da *B. hyodysenteriae*, foram encontradas espiroquetas, porém fracamente beta hemolíticas em ágar sangue, presentes no intestino grosso de suínos doentes e sadios (Taylor, 1972; Hudson et al., 1976). De um caso de colite em suíno, foi isolada uma espiroqueta (cepa P43/6/78) que quando propagada e inoculada em animais susceptíveis, induzia diarreia mucoide. Este novo agente foi

classificado como *B. pilosicoli* (Taylor et al., 1980; Trott et al., 1996).

A classificação atual no gênero nomeada *Brachyspira* foi proposta por Ochiai et al. (1997), utilizando a classificação baseada em métodos moleculares.

**Tabela 1 Classificação taxonômica do gênero *Brachyspira* sp.**

<b>Reino:</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Filo:</b>	<i>Spirochaetes</i>
<b>Classe:</b>	<i>Spirochaetes</i>
<b>Ordem:</b>	<i>Spirochaetales</i>
<b>Família:</b>	<i>Brachyspiraceae</i>
<b>Gênero:</b>	<i>Brachyspira</i>

## 2.2 Disenteria Suína

A Disenteria Suína é uma enfermidade que acomete principalmente suínos a partir de 4 semanas de idade. É causada pela *B. hyodysenteriae*, uma bactéria móvel, Gram-negativa, espiralada e anaeróbia. Os sinais clínicos são caracterizados por diarreia mucoide com sangue, ocasionalmente com fibrina, associada à anorexia e morte em poucos dias após o início dos sinais clínicos em animais não tratados (Glock et al., 1974; Hampson et al., 1997; Guedes, 2005).

O período de incubação é variável, muitas vezes influenciado pelo status imunológico do animal, virulência da cepa e carga infectante. Geralmente os sinais clínicos são observados após 10 a 14 dias em suínos naturalmente infectados (Hampson et al., 2006).

## 2.3 Patogênese

A patogênese relacionada à disenteria suína não é completamente conhecida. A diarreia observada ocorre devido à interferência na absorção de água e eletrólitos, devido à disfunção dos canais transportadores de íons sódio e cloreto, associado a estímulos de hipersecreção de muco (Argenzio et al., 1980; Liebler-Tenorio et al., 2006). Sabe-se que, ao colonizar o epitélio do intestino grosso, por ação esfoliativa, há erosão da mucosa e estímulo à hiperplasia de células caliciformes em resposta a lesão, aumentando a produção de muco (Kinyon et al., 1980; Kennedy et al., 1988).

A ocorrência disenteria suína pode ser influenciada por múltiplos fatores como idade dos animais, quantidade de secreção ácida produzida no estômago, estirpe bacteriana e concentração do agente infeccioso exposto (Olson, 1974; Kinyon et al, 1977; Wilcock & Olander, 1979; Raynaud et al, 1980; Savage, 1980).

Alguns trabalhos revelam que a presença de determinadas espécies da microbiota do ceco e cólon influenciam a capacidade de colonização da *B. hyodysenteriae* por ação sinérgica entre as mesmas (Whipp et al., 1979; Joens et al., 1981).

Além dos fatores descritos acima, a dieta fornecida é imprescindível para o surgimento dessa enfermidade uma vez que, dependendo do tipo de alimento fornecido, há colonização de microrganismos sinérgicos à *B. hyodysenteriae* predispondo o aparecimento da disenteria suína (Siba et al., 1996).

Prohászka & Lukács (1984) relataram que uma dieta a base de silagem de milho inibe o crescimento da *B. hyodysenteriae* impedindo o desenvolvimento da disenteria suína por reduzir o pH no intestino grosso. Outro componente protetor à colonização da *B. hyodysenteriae* são os alimentos à base de proteína animal e arroz cozido (Siba ET al, 1996; Durmic et al, 1998).

Em contraste, dietas a base de soja funcionam como fator predisponente a diarreia (Nabuurs, 1986; Dewey, 1993). Certas proteínas presentes na soja têm capacidade de desencadear reações imunológicas no intestino delgado, e possui ainda fatores antinutricionais, tais como inibidores de tripsina, fitatos e lectinas, considerados como indutores de diarreia (Huisman & Jansman, 1991; Li et al, 1991; Dreau et al, 1994). No entanto, estas substâncias são destruídas em tratamentos à base de etanol e calor (Dreau et al, 1994; Reddy & Pierson, 1994). Dietas contendo 40% de soja induzem a proliferação de estirpes de *E. coli*, provavelmente através de uma alteração do equilíbrio da microbiota comensal no intestino grosso podendo desempenhar um papel na patogênese da colite e, em conjunto com outros agentes patogênicos, causando diarreia clínica (Neef et al., 1994).

Propõe-se também que polissacarídeos não amiláceos favorecem a fermentação microbiana e produção de ácidos graxos voláteis (AGV) no intestino grosso predispondo à disenteria (Siba et al., 1996).

## 2.4 Lesões

As lesões macroscópicas são limitadas ao intestino grosso, com linha de demarcação quase sempre evidente na junção ileocecal. Fatores como a presença de muco que mantém a tensão de oxigênio baixa, associada à microbiota atuando de forma sinérgica, permitem a colonização no ambiente colônico (Hampson et al., 2006; Naresh & Hampson, 2010). A alteração macroscópica básica é uma enterite muco-hemorrágica ou fibrino-hemorrágica. Macroscopicamente na fase aguda é observada hiperemia acentuada da mucosa, edema de mesocólon, linfonodos mesentéricos reativos e aumentados, além de conteúdo rico em muco e fibrina associado ou não a sangue. Em lesões mais crônicas geralmente é observado exsudato fibrinoso superficial associado à necrose acentuada (Hampson et al., 2006).

As lesões histopatológicas significativas são encontradas no ceco e cólon. Há hiperplasia das células caliciformes e as espiroquetas podem ser observadas no interior das células caliciformes e enterócitos. Há necrose com desprendimento do epitélio e infiltrado inflamatório neutrofílico acentuado na lâmina própria. Nas lesões crônicas evidencia-se o acúmulo de fibrina, muco e restos celulares sobre a mucosa intestinal e interior das criptas. Necrose superficial é comumente encontrada e lesões ulcerativas profundas são consideradas raras (Sobestiansky et al., 2001).

## 2.5 Diagnóstico

Para um diagnóstico efetivo da disenteria suína é necessária a obtenção de dados clínicos, verificação de alterações macroscópicas e histopatológicas, além do isolamento bacteriano e estudos moleculares.

O isolamento é reconhecido como padrão ouro para identificação do agente (Fellstrom et al., 2001; Stanton, 2006). Fellstrom et al. (2001) demonstraram ser o isolamento bacteriano um teste altamente sensível, sendo efetivo mesmo na presença de apenas uma bactéria, em condições de conservação ideais. O isolamento bacteriano além de ser um diagnóstico confiável, permite a posterior avaliação da sensibilidade aos

antimicrobianos através da MIC (Vannucci & Gebhart, 2013).

Baseado em análises fenotípicas como as provas bioquímicas e avaliação do grau de hemólise em ágar sangue é possível a identificação das espécies do gênero *Brachyspira*. Os testes bioquímicos são realizados a partir da análise dos produtos da metabolização de determinados substratos. São comumente realizadas as provas do indol e hidrólise do hipurato (Fellstrom & Gunnarsson, 1995; Fellstrom et al., 1997).

A evidenciação de espiroquetas no corte histológico pode ser feita por coloração pela prata e/ou imuno-histoquímica. A coloração pela prata é uma técnica que permite a visualização da morfologia da bactéria indicando tratar-se de uma espiroqueta. A imuno-histoquímica somente permite a detecção do gênero *Brachyspira*, sem diferenciação entre espécies patogênicas ou apatogênicas (Paulovich et al., 2004; Hampson et al., 2006). Ambas são técnicas inespecíficas, sendo este o fator limitante das mesmas.

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH - Fluorescent *in situ* hybridization) é uma alternativa efetiva para detecção específica e definitiva de agentes infecciosos em cortes histológicos. Sondas específicas marcadas com fluorocromo são utilizadas para identificação de diferentes espécies de *Brachyspiras* (Jensen et al, 1998 e 2000). A técnica de FISH para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* comparada à técnica de PCR convencional apresentou elevados índices de concordância (Neves, 2012).

Técnicas moleculares são largamente utilizadas no diagnóstico de bactérias do gênero *Brachyspira*, pois são rápidas e de fácil execução (Guedes & Barcellos, 2012). Foram desenvolvidos testes de PCR (polymerase chain reaction) individuais para cada agente, e técnicas de amplificação dupla ou múltipla associada aos agentes entéricos comumente relatados (Atyeo et al., 1998; La et al., 2003 e 2006).

Recentemente, o sequenciamento de genes específicos (Multilocus sequence typing-MLST) foi desenvolvido como método alternativo para a análise da estrutura da população bacteriana e para a discriminação entre as linhagens de *Brachyspira* sp. O MLST mede diretamente as variações na sequência do

DNA de um conjunto de genes caracterizando as cepas por seus perfis alélicos (Maiden et al., 1998; Urwin & Maiden, 2003).

Um procedimento muito utilizado atualmente e de grande importância epidemiológica é a técnica de PCR para o gene *Nox* seguido do sequenciamento genômico do produto amplificado. O sequenciamento do gene *Nox* é utilizado principalmente para a caracterização genotípica da *Brachyspira* sp., pois através das sequências obtidas é possível a comparação entre as cepas identificando o grau de identidade entre as mesmas (Bellgard et al., 2009).

## 2.6 Epidemiologia da doença

*B. hyodysenteriae* possui distribuição mundial, ocorrendo principalmente nas regiões com maior densidade de sistemas de produção de suínos (Muniappa et al., 1997; Boye et al., 1998; Thomson et al., 1998; Calderaro et al., 2001).

Suínos de todas as idades são susceptíveis a doença, sendo mais comum em animais de recria e terminação (Hampson et al., 2006). Nos casos de disenteria suína, a morbidade encontrada chega a 37% e a mortalidade pode atingir até 30% em animais não tratados (Hampson et al., 2006; Stanton, 2006).

A infecção ocorre por ingestão de fezes contaminadas. A introdução do agente no rebanho se deve pelo contato com animais subclínicos introduzidos ao plantel ou por aqueles que se recuperaram da doença e permanecem excretando após o término dos sinais clínicos. A transmissão mecânica ocorre principalmente através de caminhões e rações contaminados ou pela movimentação de pessoas que possuem roupas e calçados contaminados (Hampson & Trott, 2006).

Considerando as espécies de animais carreadores da bactéria, como vetores biológicos e mecânicos, foram isoladas espiroquetas em aves selvagens (Jansson et al., 2001; Jansson et al., 2004), cães (Oxberry & Hampson, 2003; Fellstrom et al., 2001), roedores (Hampson et al. 1991) e moscas, espécies que indiretamente podem coexistir nos sistemas de produção de suínos, sendo de controle importante nos programas de erradicação (Hampson et al., 2006). Roedores, em especial os camundongos, possuem a

capacidade de eliminar a *B. hyodysenteriae* nas fezes por mais de seis meses no ambiente, sendo assim um mantenedor do microrganismo por longos períodos e responsável por episódios de recontaminação e disseminação do patógeno nas propriedades (Joens, 1980).

*Brachyspira* sp. no ambiente é uma importante fonte de contaminação. Em estudo realizado *in vitro*, simulando três diferentes tipos de microambientes, foram recuperadas cepas de *B. hyodysenteriae* viáveis em cultivo por até 112 dias, indicando um potencial risco de reinfecção do rebanho (Boye et al., 2001).

## 2.7 Prevalência

Na Europa, especialmente nas regiões com grande concentração de granjas próximas, as infecções por *B. hyodysenteriae* são comuns. Na Grã-Bretanha, na década de 1990, um estudo detectou a *B. hyodysenteriae* como agente causador de diarreia em 7% das propriedades, estando associada a outros agentes em 3,5% dos casos (Thomson et al., 1998). Anos depois, em um trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, este agente foi encontrado em 13% das propriedades com colite clínica, e associado a infecções mistas em 16% das unidades (Thomson et al., 2001). Na Suécia, de 72 granjas com casos clínicos de diarreia, em 14% delas a causa era infecção por *B. hyodysenteriae* (Moller et al., 1998). *B. hyodysenteriae* foi isolada como agente causador de diarreia na Dinamarca em 14% dos casos estudados (Moller et al., 1998). Na Polônia (Plawinska et al., 2004) e Espanha (Carvajal et al., 2003) a prevalência foi elevada chegando a 38,8% e 45,4%, respectivamente.

Embora a disenteria suína tenha estado ausente nos rebanhos suínos norte americanos nos últimos 20 anos, principalmente devido a tecnificação dos sistemas de produção, inúmeros casos desta enfermidade têm sido reportados nos Estados Unidos e no Canadá desde 2008 (Chander et al., 2012). Clothier e colaboradores (2011) relatam um aumento de casos de *Brachyspira* sp., detectados no laboratório de diagnóstico veterinário em Iowa State University. Foi verificado um aumento de 3 isolados em 15 casos testados em 2005, para 466 isolados em 3.465 casos durante os primeiros 9 meses do ano de 2010. Este resurgimento de enfermidades causadas por espiroquetas tem sido acompanhada de

inúmeras pesquisas e identificação de novas espécies patogênicas de *Brachyspira* em suínos nomeadas inicialmente como “Novel Strong Hemolytic–*Brachyspira*” (NSH-*Brachyspira*) e, recentemente, como *Brachyspira hampsonii* (Chander et al., 2012).

No Brasil, a disenteria suína já foi relatada nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo nas décadas de 1980 e 1990 (Mores & Sobestiansky, 1984 APUD Barcellos et al., 2010; Warth, 1985 APUD Barcellos et al., 2010; Barcellos et al., 1995; Baccaro et al., 1999). Os relatos eram esporádicos, de pouca importância epidemiológica ou ligada à padronização de técnicas diagnósticas (Barcellos et al., 2010).

No sul do país, Barcellos et al. (2000) avaliaram a presença de *Brachyspiras* patogênicas em granjas de subsistência com histórico de diarreia no Rio Grande do Sul e encontraram uma prevalência de 35,3% para *B. hyodysenteriae* e de 41,2% para *B. pilosicoli*. Em estudo posterior, avaliando a interferência do uso de antimicrobianos como promotor de crescimento em relação à prevalência da *Brachyspira* sp. (Barcellos et al., 2003), os autores observaram que a *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* foram detectadas, respectivamente, em 0% e 6,25% das granjas medicadas e em 31,8% e 45,5% das granjas não medicadas, demonstrando a interferência do uso de antibióticos na ração sobre a presença das espiroquetas. No estado de Santa Catarina foi feito um estudo de prevalência em animais de terminação, sendo que 6% foram positivos para *B. hyodysenteriae* e 8,8% para a *B. pilosicoli* como agente único (Menin et al., 2008).

Em um estudo feito em diferentes regiões produtoras de suínos no Brasil (Baccaro et al., 2003), avaliando a presença de agentes causadores de diarreia nas fases finais de produção, foram encontrados 1,4% amostras positivas para *B. hyodysenteriae* e 1% para *B. pilosicoli*, como agentes únicos, e 3% para *B. pilosicoli* associados a *Lawsonia intracellularis*.

Entre os anos de 2008 e 2009, foi realizado um estudo de prevalência de enteropatógenos em suínos de recria e terminação em 46 rebanhos no estado de Minas Gerais. Neste estudo não foi detectado nenhuma granja positiva para *B. hyodysenteriae* e apenas dois rebanhos positivos para *B. pilosicoli* (Viott, 2010; Viott et al., 2013).

Apesar de poucos relatos anteriores, de 2010 até a presente data foram diagnosticados no laboratório de Patologia Animal da UFMG, dezoito novos casos de disenteria suína nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. Estes estados localizam-se nas regiões que concentram uma porcentagem significativa da produção nacional de suínos provocando altos impactos econômicos na cadeia produtiva (Daniel et al., 2013).

Os surtos em Santa Catarina parecem estar relacionados à contaminação de uma granja multiplicadora terceirizada no oeste Catarinense que forneceu fêmeas de reposição clinicamente sadias, mas infectadas, para várias Unidades de Produção de Leitões (UPLs) de diferentes empresas de integração. A manifestação clínica foi detectada inicialmente nas marrãs entregues e, posteriormente, também na granja de origem destas fêmeas. Situações de contaminação de granjas por agentes infecciosos importantes com histórico semelhante não são raras, dada ao estresse promovido pelo deslocamento e troca de dieta, levando à manifestação clínica de forma mais rápida (Daniel et al., 2013).

Sendo assim, estudos filogenéticos e a respeito da sensibilidade frente aos antimicrobianos são essenciais para controle e erradicação desta doença reemergente no país.

## **2.8 Uso de antimicrobianos para controle e erradicação da disenteria suína**

Os antimicrobianos são largamente utilizados nos sistemas de produção animal. Na suinocultura geralmente são utilizados nas rações de forma profilática e terapêutica para tratamento de diversas enfermidades.

Para o tratamento da disenteria suína os antimicrobianos mais frequentemente utilizados são a tiamulina, valnemulina, doxiciclina, carbadox, tilvalosina, tilosina e lincomicina (Cizek et al., 1998; Duhamel et al., 1998; Homme et al., 1998; Fossi et al., 1999; Karlsson et al., 2004; Clothier et al., 2011; Hidalgo et al., 2011). O carbadox demonstra valores de MIC satisfatórios, no entanto, seu uso é permitido em poucos países, sendo proibido Brasil (Ministério da Agricultura, 2005). O carbadox interage diretamente com o DNA bacteriano, causando mutações e quebras no ácido nucléico (Beutin et al., 1981). Além de

ação carcinogênica, é comprovado que o carbadox induz a transferência lateral de genes de resistência antimicrobiana no fago VSH-1 presente em espécies de *Brachyspira hyosyenteriae* (Stanton et al., 2008).

O aumento da resistência aos antimicrobianos na medicina veterinária é bem relatado e ocorre em várias espécies animais. Os primeiros relatos do aparecimento da resistência de antimicrobianos ligados a produção animal ocorreu na década de 70 (Mateu & Martin, 2001). Um fator preocupante observado é a coexistência de microrganismos que apresentam resistência aos antimicrobianos de uso humano podendo transferir genes resistência tanto para bactérias patogênicas e comensais (Srinivisan et al., 2007).

Nos últimos anos o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos para as cepas de *B. hyodysenteriae* tornou-se um problema relevante. Em muitos países foi observada uma diminuição da susceptibilidade à tiamulina (Karlsson et al., 2004; Lobova et al., 2004; Duinof et al., 2008; Sperling et al., 2011; Pringle et al., 2012). Outros medicamentos habitualmente utilizados, como a tilosina e lincomicina, possuem elevados níveis de resistência (Hommez et al., 1998; Karlsson et al., 2002).

Os mecanismos de resistência são respostas evolutivas desenvolvidas pelas bactérias e podem ser classificados como constitutivos ou intrínsecos, ou seja, propriedade natural da bactéria de não susceptibilidade ao mecanismo de ação de certos princípios ativos, ou adquiridos, que são os mais relevantes epidemiologicamente. Em geral, os mecanismos de resistência são originados de mutações cromossômicas ou aquisição horizontal de elementos genéticos que as torna resistentes e a partir daí inicia-se a multiplicação de uma linhagem bacteriana resistente a certo composto antimicrobiano (Songer & Post, 2005).

Com o objetivo de quantificar padrões de susceptibilidade e resistência aos antimicrobianos, o método mais eficaz utilizado para o gênero *Brachyspira* e anaeróbios em geral é o MIC (Andrews, 2001; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004; Rasback et al., 2005). O MIC é definido como a concentração mais baixa que irá inibir o crescimento visível de um microrganismo (Andrews, 2001; Rasback et al., 2005). É

considerado “padrão ouro” para determinar a sensibilidade desses organismos aos antimicrobianos e, portanto, usado para julgar o desempenho de todos os outros testes de sensibilidade (Andrews, 2001).

A perda de eficácia clínica destas drogas cria um risco potencial de propagação de cepas resistentes, com o surgimento de clones com alto potencial patogênico (Duinof et al., 2008). Dessa forma, o monitoramento da resistência em isolados clínicos tornou-se altamente recomendável (Karlsson et al., 2002; Rohde et al., 2004).

Um fator agravante é o aumento da resistência provocado pelo uso indiscriminado de promotores de crescimento (Bower & Daeschel, 1999). Esta prática pode selecionar microrganismos resistentes a antibióticos e exercer pressão seletiva sobre eles, promovendo o desenvolvimento de resistência às drogas (Manie et al., 1997).

O fato é que o desenvolvimento de resistência por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas (Coghlan, 1996).

A resistência é encontrada especialmente entre estirpes de *B. hyodysenteriae*, mas a tendência também tem sido observada para *B. pilosicoli* (Duhamel et al., 1998; Fossi et al., 1999; Karlsson et al., 2001 e 2004; Lobová et al., 2004; Rohde et al., 2004). Cepas resistentes e sua possível propagação promovem redução na disponibilidade de drogas para o controle medicamentoso. Uma provável explicação foi revelada em uma análise populacional de *B. hyodysenteriae* (Lee et al., 1993). Neste estudo foi observada grande diversidade e numerosas estirpes geneticamente distintas na espécie (Fossi et al., 2003).

Duhamel (2011) sugere dois mecanismos para a diminuição da resposta aos antimicrobianos. O primeiro seria a seleção natural de uma cepa mutante resistente, devido a constantes exposições ao antibiótico. E o segundo seria a obtenção horizontal de resistência via bacteriófagos conhecidos como VSH-1. Esse bacteriófago tem importância na transferência de genes entre as células hospedeiras e pode contribuir para alteração gênica das cepas através da transdução de novas sequências de genes entre espécies ou estirpes de *Brachyspira* (Humphrey et al., 1997; Bellgard et al., 2009; Hampson & Ahmed,



2009). Essas alterações podem alterar as propriedades fenotípicas, potencialmente modificando a susceptibilidade aos antimicrobianos, sua colonização, ou virulência. Assim, a importância de plasmídeos ou outros elementos genéticos possivelmente transferíveis para a difusão de genes de resistência a antibióticos em *Brachyspira* sp. não é clara e precisa ser investigada (Duhamel, 2011).

O uso de concentrações sub-inibitórias também é considerado um fator agravante, uma vez que, do ponto de vista genético e evolutivo, uma resposta bacteriana a exposição sub-inibitória promove a ativação de elementos móveis realizadas por bactérias como prófagos, transposons (Stanton et al., 2008).

Apesar da disenteria suína estar presente nos rebanhos suínos do país há muito tempo, sua crescente relevância em relação as demais enfermidades que cursam com diarreia em animais de recria e terminação é recente e pouco estudada. São necessários estudos a respeito da resposta destas cepas frente aos antimicrobianos, mecanismos de resistência, relação entre as cepas existentes e as cepas presentes no surto para melhor entendimento e elaboração de estratégias de controle e erradicação da *Brachyspira* sp. no país.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e período de realização do experimento

O experimento foi realizado no período de 2012 a 2013 no laboratório de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

#### 3.2 Amostras

Foram avaliados fragmentos de intestino grosso e fezes de suínos na fase de recria e terminação de rebanhos com histórico de diarreia e suspeita de disenteria suína. Todas as amostras foram submetidas a exame histopatológico, isolamento bacteriano e PCR duplex para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, segundo La et al. (2003). As amostras com isolamento efetivo e PCR positivo para *B. hyodysenteriae* foram incluídas nesse estudo (Tabela 2 e 3). Isolados provenientes de

diferentes rebanhos foram utilizados para sequenciamento do gene *Nox*.

#### 3.3 Isolamento bacteriano

As amostras de fezes e intestino grosso foram semeadas através de esfregaço de swab em placas com meio seletivo para *Brachyspira* sp. (5% sangue ovino, 6,25 µg/µl rifampicina<sup>1</sup>, 800 µg/µl de espectinomicina<sup>2</sup>, 25 µg/µl de vancomicina<sup>3</sup>, 25 µg/µl de colistina<sup>4</sup>) (adaptado de Novotná & Skardová, 2002) e incubadas, por no mínimo três dias, a 37°C, em jarras de anaerobiose<sup>5</sup>. Anaerobiose foi gerada com auxílio de bomba de vácuo e preenchimento com a mistura dos gases N<sub>2</sub>(80%), CO<sub>2</sub>(10%) e H<sub>2</sub>(10%) por três vezes consecutivas. O ambiente anaeróbio foi confirmado por fita indicadora de anaerobiose<sup>6</sup>. Para obtenção de colônias puras foram realizadas várias passagens em meio seletivo e avaliação das mesmas sob microscopia de contraste de fase em preparações líquidas em lâminas.

#### 3.4 Histopatologia

Os fragmentos de intestino grosso foram processados pela técnica histológica rotineira de desidratação e inclusão em parafina. Após esse procedimento, fragmentos do tecido foram seccionados em 3µm de espessura e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (Luna, 1968).

#### 3.5 PCR duplex para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*

A técnica utilizada foi a amplificação dupla para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* de acordo com o protocolo de La et al. (2003), descritas aqui brevemente foi executada para todos os espécimes clínicos (fezes, raspado de mucosa e colônias isoladas). No caso das

<sup>1</sup>Rifampicin, Sigma-Aldrich,° cat n° R3501, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

<sup>2</sup>Spectinomycin, Sigma-Aldrich,° cat n° S9007, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

<sup>3</sup>Vancomycin, Sigma-Aldrich,° cat n° V2002, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

<sup>4</sup>Colistin, Sigma-Aldrich,° cat n° C1511, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

<sup>5</sup>Oxoid Anaerobic Jar, Thermo Fisher°

<sup>6</sup>Oxoid Anaerobic Indicator, Thermo Fisher°, cat n° BR0055, Waltham, MA, USA.

colônias isoladas, após seu crescimento em placas, estas foram lavadas com 1 ml de PBS estéril com recuperação da suspensão de bactérias. As amostras recuperadas eram então

acondicionadas em microtubos de 1,5 ml. O DNA das colônias foi extraído pelo método de lise utilizando o tiocianato de guanidina, de acordo com Chomczynski (1993).

**Tabela 2. Listagem de rebanhos amostrados nos estados de Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul no período de 2011 a 2013.**

Amostras	Origem	Rebanho	Ano	Nº de Amostras
A4441	MT	1	2011	1
A5001, A5002, A50012	SP	2	2011	3
A6002, A6004, A6005, A6007, A60011, A60022	MG	3	2011	6
B5746, B5747, B57413	SC	4	2012	3
B6731	SC	5	2012	1
B6741	MG	6	2012	1
B7031	RS	7	2012	1
B7201	SC	8	2012	1
B829	SC	9	2012	1
B9001, B9002	SC	10	2012	2
C1522, C1524, C1526, C1527, C1529	MG	11	2013	5
C3651	SC	12	2013	1
C4941	SC	13	2013	1
C5001	MG	14	2013	1
C6000 a C60013	MG	15	2013	13
C7001, C7002, C7003	SP	16	2013	3

**Tabela 3. Número e porcentagem de isolados de *Brachyspira* sp. obtidos por estado.**

Estado	Número de Rebanhos	Número de isolados	Porcentagem de amostras
SC	7	10	22,73%
SP	2	6	13,64%
MT	1	1	2,27%
MG	5	26	59,09%
RS	1	1	2,27%
<b>Total</b>	16	44	

Para o teste de amostras clínicas, fezes e raspado de mucosa, o DNA foi extraído utilizando-se o Kit<sup>7</sup> de extração de DNA, de acordo com as instruções do fabricante.

Os pares de *primers* utilizados na PCR foram respectivamente: H1(5'-ACTAAAGA-TCCGTGATGATTTG-3') e H2(5'-CTAATA-AACGCTCTGCTGC-3') que tem como alvo uma região de 354 pb no gene *nox* da *Brachyspira hyodysenteriae*; P1(5'-AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC-3') e P2 (5'-GCACCTATGTTAA-ACGTCCTTG-3') atingindo uma região de 823 pb do segmento 16S do rRNA da *B. pilosicoli*.

<sup>7</sup> PSP kit DNA Stool Spin Invitek<sup>o</sup>,

Todos os testes de PCR foram executados em um volume de 25 µl por microtubo.

O *mix* da PCR consistiu de: 1X de buffer para PCR (contendo 1, 5 mmol<sup>-1</sup> de Mg Cl<sub>2</sub>), 1,25 U de Taq DNA polymerase<sup>8</sup>, 0,1 mmol<sup>-1</sup> de cada dNTP<sup>9</sup>, 0,5 µmol<sup>-1</sup> de cada par de *primer* (H1 e H2), 0,17 µmol<sup>-1</sup> de cada par de *primer* (P1 e P2) e 2,5 µl da amostra de DNA (*template*). As condições do PCR envolvem um passo inicial de 5 min a 95°C para a ativação da Taq DNA

<sup>8</sup> Cenbiot<sup>o</sup>, Taq. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>9</sup> Invitrogen<sup>o</sup>, dNTP set, Carlsbad, CA, EUA.

polimerase, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 52°C por 45s e extensão a 72°C por 1 min. O último passo consistiu da extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos do PCR (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com *buffer* TAE 1X, marcados com Brometo de Etídio e revelados sob luz ultravioleta.

### 3.6 *Nox*-PCR e sequenciamento

Foram selecionados 30 diferentes isolados, preferencialmente de diferentes rebanhos, para amplificação do gene *Nox* para a identificação do gênero *Brachyspira* sp. e posterior sequenciamento genômico. O protocolo utilizado foi o de Chander et al., (2012), descritas aqui brevemente. Foram utilizados os seguintes iniciadores (primers): *Brachy nox* F (5'-GTT CTT GCG CTG TAA CTC CTC CTA T -3') e *Brachy nox* R (5'-GCA ACA ATA CCC ATT CTT ACA G -3'), específicos para o *Nox* gene, que tem como alvo uma região altamente variável do gene (Atyeo et al., 1999).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando um kit comercial Purelink PCR Purification Invitrogen<sup>10</sup> e sequenciados em ambas as direções por empresa terceirizada (BGI Tech Solutions Co, Ltda.) utilizando o método de Sanger e sequenciador automático. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando programas de alinhamento de sequências SeqScape V2,7 e Mega 5.1. Os dados do sequenciamento foram mostrados através de um dendograma, comparando os dados obtidos com os postados no GenBank.

### 3.7 Concentração Inibitória Mínima

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado em 22 amostras, representando pelo menos um isolado por rebanho. Para cada isolado foram testados os seguintes antimicrobianos tiamulina (0,063-8 µg/ml), valnemulina (0,031-4µg/ml), doxiciclina (0,125-16 µg/ml), tilvalosina (0,25-32 µg/ml), lincomicina (0,5-64 µg/ml) e tilosina (2-128 µg/ml), de acordo com as especificações do kit<sup>11</sup> aqui descritas brevemente. Os agentes

<sup>10</sup> Invitrogen° Purelink PCR Purification cod K310001.

<sup>11</sup> VetMIC™Brachy SVA°

antimicrobianos se encontram previamente secos em diluições seriadas em poços de cultura de tecidos (48 poços/placa). Cada poço foi inoculado com 0,5 ml de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) enriquecido com 10% de soro fetal bovino e aproximadamente 10<sup>6</sup> CFU / ml de *Brachyspira* spp. ajustadas pela escala de MacFarland. As bactérias foram colhidas a partir de culturas puras cultivadas por cerca de 48 horas sob anaerobiose em ágar sangue enriquecido com 5% sangue ovino. Para recuperação das colônias em solução as placas foram lavadas com caldo BHI formando uma suspensão. As suspensões continham cerca de 10<sup>8</sup> UFC/ ml e foram diluídos a 1: 100 para se obter o inoculo final.

As placas já inoculadas foram incubadas sob atmosfera anaeróbica, em agitação, a 37° C. A MIC foi interpretada como a concentração mais baixa que inibe o crescimento bacteriano visível (turvação do meio). Após quatro dias de incubação, a leitura foi realizada e os poços analisados quanto à presença de possíveis contaminantes que pudessem interferir no resultado do teste. Os resultados obtidos foram comparados com os pontos de corte microbiológicos descritos por Pringle et al. (2012).

### 3.8 Análise estatística

Os resultados de MIC foram estratificados e resumidos considerando a mediana, a moda e o valor de MIC em que 90% dos isolados testados eram suscetíveis (MIC 90).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amostras

As amostras foram provenientes de 16 diferentes rebanhos de diferentes estados brasileiros. No total foram isoladas 44 isolados de *Brachyspira* sp., 27 de fragmentos de intestinos grosso e 17 de amostras de fezes. Dos 44 isolados, 13 foram obtidos a partir de coletas a campo e outras 21 recebidas para diagnóstico no Laboratório de Diagnóstico Veterinário da UFMG, no período de 2012 a 2013. Os 10 isolados restantes foram oriundos de intestinos previamente amostrados no ano de 2011 e preservados à -80 °C. As amostras estudadas eram provenientes dos estados de Mato Grosso (1), Minas Gerais (5), São Paulo (2), Santa

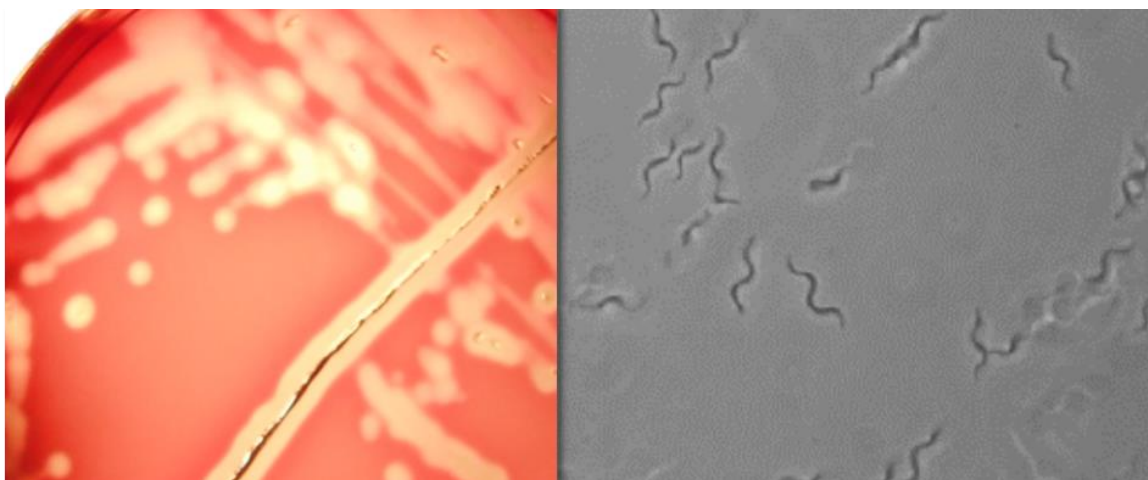
Catarina (7) e Rio Grande do Sul (1) (Tabelas 2 e 3).

#### 4.2 Identificação por isolamento bacteriano e PCR duplex

Todas as amostras recebidas para diagnóstico tiveram isolamento bacteriano efetivo. As amostras produziam beta hemólise forte em ágar sangue e suas colônias geralmente

não eram observadas superficialmente no ágar. Por vezes, era observado um crescimento bacteriano superficial translúcido e uniforme, difundindo a partir das zonas de hemólise (Fig. 1A). À microscopia em contraste de fase eram observadas bactérias móveis de morfologia espiralada (Fig. 1B).

**Figura 1. (A) Placa de ágar sangue (TSA): colônias puras de *B. hyodysenteriae*, evidenciando hemólise forte em áreas de crescimento das colônias. (B) *B. hyodysenteriae* visualizadas sob contraste de fase 600x.**



Quarenta e uma das 44 amostras clínicas (fezes, raspados de mucosa e colônias isoladas) analisadas foram positivas na técnica de amplificação dupla para *B. hyodysenteriae*, exceto três amostras oriundas de um rebanho correspondendo aos isolados C7001, C7002 e C7003. Os animais desse rebanho não possuíam sinal clínico aparente de diarreia e estas estirpes possuem crescimento mais lento em relação as demais. As amostras clínicas analisadas (fezes e raspado de mucosa) foram PCR negativas e positiva para *B. hyodysenteriae* para as amostras provenientes colônia pura.

#### 4.3 Alterações anatomopatológicas

##### 4.3.1 Macroscopia

À avaliação macroscópica, a lesão mais observada foi colite fibrino necrótica associada a conteúdo muco hemorrágico acentuado. Nestas, as amostras apresentavam edema de mesocólon moderado, hiperemia moderada a

acentuada da serosa e mucosa. Espessamento moderado da parede do órgão, conteúdo intestinal líquido com moderada a acentuada quantidade de muco, podendo ou não estar associado a sangue e fibrina. Áreas de necrose da mucosa colônica com material necrótico aderido foi frequentemente observado. Em alguns casos foram observadas lesões mais discretas com hiperemia discreta da serosa e conteúdo líquido de coloração esverdeada associado à quantidade moderada de muco. Em amostras de dois animais não foram observadas lesões macroscópicas, porém foi obtido isolamento positivo para *Brachyspira* sp. (C7001 e C7003). Essas duas amostras foram positivas para *B. hyodysenteriae* na PCR duplex.

##### 4.3.2 Histopatologia

No exame histopatológico as alterações encontradas variaram de colite catarral moderada multifocal associada à necrose

superficial a lesões mais graves caracterizadas por colite neutrofílica necrohemorrágica acentuada difusa associada à hiperplasia de células caliciformes. As alterações comumente encontradas foram alterações circulatórias como congestão e hemorragia multifocal moderada. Áreas de erosão, principalmente superficial, associada à necrose multifocal do epitélio de revestimento com exposição de lâmina própria foram encontradas na maioria dos casos. Todas as amostras apresentavam hiperplasia de células caliciformes em variado grau. Em todas as amostras havia aumento da celularidade por infiltração de neutrófilos na lâmina própria, presente também no interior das criptas (abscessos de criptas). No lúmen do colón havia acúmulo de material amorfo fracamente basofílico de aspecto homogêneo (muco) e, por vezes, associado a um material proteínico amorfo filamentosos (fibrina), restos celulares e neutrófilos degenerados. Foram frequentemente observadas tanto no lúmen quanto nas criptas, associada às áreas de necrose, estruturas espiraladas compatíveis com espiroquetas.

Apenas dois animais provenientes do mesmo rebanho apresentavam lesões colônicas discretas focais de necrose superficial associada à hiperplasia de células caliciforme discreta. Ambos os animais eram provenientes de um rebanho sem sinal clínico aparente, mas com confirmação do diagnóstico de *B. hyodysenteriae*, após PCR dos isolados (C7001 e C7003).

#### 4.4 Análise filogenética

Foi realizado sequenciamento do gene *Nox* de 30 isolados. Desses, 29 foram confirmados como sendo *B. hyodysenteriae* mostrando uma similaridade de 100% com as cepas *B. hyodysenteriae* ATCC 27164, 3140, AN 2420/97, AN 174/92, AN 383:2/00, AN 1409:2/01 e B78 nos 596 pares de bases do segmento estudado. Um único isolado teve resultado divergente entre as amostras, (C7003) que foi identificado como sendo *Brachyspira murdochii* com similaridade de 100% com as cepas *B. murdochii* ATCC X2 e C378 e similaridade de 100% com as cepas *Brachyspira* sp. Canadenses F65, C47, F62, B60, B70, B64, G81, F66, D71, C52, F68, B31, F87, C61, C35, B58, F56, G70, A62, K07, A63, B7, F52, A22, A58, A50 (Anexos 1 e 2; Figura 2). A amostra (C7003) não foi incluída no teste de MIC por não pertencer a mesma espécie das demais

impossibilitando a comparação dos seus resultados.

#### 4.5 Concentração Inibitória Mínima

A distribuição das MICs obtidas utilizando os seis agentes antimicrobianos em todos os 22 isolados de campo é apresentada na Figura 3 e Tabela 4. Vinte e um dos isolados tinham valores elevados de MIC para todos os antimicrobianos tanto para o ponto de corte microbiológico, que compara o padrão de sensibilidade da cepa selvagem em relação aos isolados de campo, quanto para o ponto de corte para tratamento clínico. A comparação dos valores de MIC90 em relação aos pontos de corte citados estão representados nas Tabelas 5 e 6 (Burch, 2005; Pringle et al., 2007; Duran et al., 2009; Pringle et al., 2012). A proporção de amostras com baixa sensibilidade comparadas com a estirpe selvagem foram de 90,9% para tiamulina, 91% para valnemulina, 95% para doxiciclina, 95% para tilvalosina, 100% para lincomicina e 95% para tilosina (Pringle et al., 2012).

O antimicrobiano que obteve resultados de MIC mais elevados foi a tilosina, na qual apenas uma amostra não se apresentava acima do ponto de corte estabelecido (moda = >128). Amostras de São Paulo e Minas Gerais se mostraram mais sensíveis em relação as amostras de Santa Catarina e Mato Grosso. Apenas um isolado (C5001) se mostrou mais sensível para todos antimicrobianos (tiamulina = 0,063µg/ml; valnemulina = 0,031µg/ml; doxiciclina = 0,5 µg/ml; tilvalosina = 1 µg/ml; lincomicina = 2 µg/ml; tilosina = 4 µg/ml) com respostas próximas ou inferiores ao ponto de corte microbiológico proposto por Pringle et al. (2012).

## 5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a investigar a sensibilidade antimicrobiana de estirpes brasileiras de *B. hyodysenteriae* e avaliar através do sequenciamento do gene *Nox* o grau de identidade em relação às demais estirpes já descritas.

Apesar do presente trabalho não determinar a prevalência desta enfermidade, foi possível observar a ocorrência deste agente em rebanhos localizados nas principais regiões

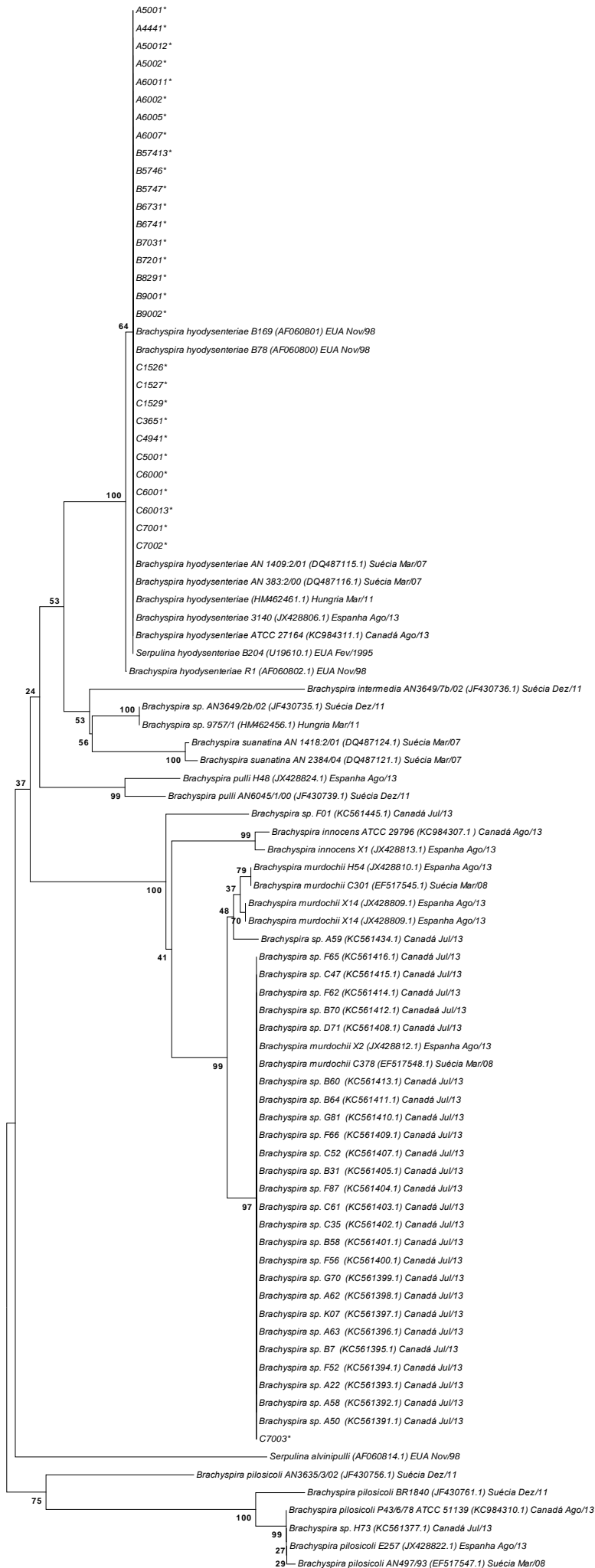


Figura 2 Árvore filogenética baseada em seqüências do gene *Nox* de uma população de 30 *Brachyspira* sp. isoladas e alinhadas (596 pb). O alinhamento foi criado usando o cálculo de distância (Kimura) e Neighbour-joining. Isolados com \* representam as amostras do presente estudo.

**Tabela 4 Distribuição por estados brasileiros de amostras avaliadas para Concentração Inibitória Mínima (MIC – Minimum Inhibitory Concentration).**

ESTADO	MT	SP	SC	MG	RS
AMOSTRA	(A4441)	(A5001, A5002) (C7001)	(B5746, B5747, B57413) (B6731) (B7201) (B8291) (B9001, B9002) (C1526, C1529) (C4941)	(A6007) (B6741) (C3651) (C5001) (C6001, C6000)	(B7031)

**Tabela 5 Mediana, moda, valor de concentração inibitória mínima para a qual 50% e 90% dos isolados de *B. hyodysenteriae* sensíveis (MIC 50, 90) para os diferentes antibióticos testados.**

Variável	Mediana µg/ml	Moda µg/ml	Mínimo e Máximo µg/ml	MIC 50	MIC 90
Tiamulina	8	8	0,063->8	8	8
Valnemulina	2	4	0,031->4	2	>4
Doxiciclina	2	2	1-8	2	8
Tilvalosina	16	32	1-32	16	32
Lincomicina	64	64	2->64	64	>64
Tilosina	>128	>128	4->128	>128	>128

**Tabela 6 Pontos de corte microbiológicos e pontos de corte clínicos de MIC antimicrobianos comumente utilizados, comparados com valores de (MIC 90) dos isolados no presente estudo.**

Antimicrobiano	MIC 90	Ponto de Corte microbiológico§	Ponto de Corte clínico (µg/ml)	Concentração em ppm na ração	Referência
Tiamulina	8	> 0,25 µg/ ml	>1.0	200	Burch, 2005
Valnemulina	>4	> 0,125 µg/ ml	>0,125	75	Burch, 2005
Doxiciclina	8	> 0,5 µg/ ml	1-4*	-	Pringle et al.,2007
Tilvalosina	32	> 1 µg/ ml	>4	-	Duran et al., 2009
Lincomicina	>64	> 1 µg/ ml	>50	110	Burch, 2005
Tilosina	>128	> 16 µg/ ml	>16	100	Burch, 2005

§ Ponto de corte microbiológico tem como objetivo separar os isolados resistentes e suscetíveis em relação a estirpe selvagem. (Pringle et al., 2012)

\*redução da sensibilidade

produtoras de suínos do país (IBGE, 2013). Estas regiões são locais que possuem maior densidade de unidades produtoras facilitando as condições de transmissão por proximidade, presença de rodovias com grande fluxo de caminhões, além da circulação de vetores entre granjas próximas (Hampson et al., 2006).

Em relação às amostras isoladas no estudo, todas possuíam características de crescimento e morfologia semelhantes às descritas anteriormente para o gênero

*Brachyspira* (Taylor & Alexander 1971; Harris et al.,1972).

No presente estudo, não foi possível a realização de testes bioquímicos para caracterização fenotípica, como descrita por Fellstrom & Gunnarsson (1995). Entretanto, entende-se que esta avaliação fenotípica é de grande importância para caracterização completa das estirpes isoladas e será realizada, posteriormente, em todas as amostras como continuação deste trabalho.

Comparação entre os resultados de MIC presentes na literatura - µg/ml																			
Tiamulina			Valnemulina			Doxiciclina			Tilvalosina			Lincomicina			Tilosina			ANO	Referência
MIC 50	MIC 90	Min/Max	MIC 50	MIC 90	Min/Max	MIC 50	MIC 90	Min/Max	MIC 50	MIC 90	Min/Max	MIC 50	MIC 90	Min/Max	MIC 50	MIC 90	Min/Max		
8	8	0,063->8	2	>4	0,031->4	2	8	1,0-8,0	16	32	1,0-32	64	>64	2->64	>128	>128	4->128	2011-2013	Presente estudo
≤0,063	0,5	-	≤0,031	0,5	-	0,5	2	-	4	16	-	16	32	-	>128	>128	-	2009-2012	Mirajkar & Gebhart, 2013
2	>8	-	1	>4	-	1	2	-	<4	<16	-	32	64	-	>128	>128	-	2011-2012	Álvarez et al., 2013
0,5	1	0,25-1	1	2	0,063-2	1	2	<0,125-2	-	-	-	16	16	2- 32,0	>128	>128	16->128	2006-2010	Zmudzki et al., 2012
1	8	≤0,063->8	1	4	≤0,031->4	-	-	-	4	16	0,5>32	16	>64	1->64	>128	>128	16->128	2008-2009	Hidalgo et al., 2011
0,25	>2	≤0,016->2	0,125	1	≤0,016->2	-	-	-	-	-	-	16	128	2->128	>256	>256	≤4->256	2000-2004	Hidalgo et al., 2009
0,25	>2	≤0,016->2	0,25	>2	≤0,016->2	-	-	-	-	-	-	32	128	2->128	>256	>256	64->256	2006-2007	
0,25	>2	≤0,016->2	0,125	2	≤0,016->2	-	-	-	-	-	-	16	128	2->128	>256	>256	≤4->256	2000-2007	
0,063	0,125	0,031-2	0,063	0,063	0,031-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1989-1993	Rhode et al., 2004
0,125	0,5	0,063-1	0,063	0,125	0,031-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1994-1996	
0,25	4	0,063-8	0,063	2	0,031-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1997-1999	
1	8	0,031-8	0,5	4	0,063-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2000	
2	4	0,063-4	0,5	2	0,063-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2001	
0,5	2	0,031-8	0,5	2	0,031-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2002	
0,03	0,25	≤,016-,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	>256	≤2->256	1990-1993	Karlsson et al., 2003
0,125	0,125	0,03-,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>256	>256	4->256	1996-1999	
0,06	0,25	≤,016-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	>256	≤2->256	1990-1999	
0,125	1	≤0,016-2	0,031	0,5	≤0,016-2	-	-	-	-	-	-	16	64	≤1 a 64	>256	>256	>256	≤2 a>256	Karlsson et al., 2002

Tabela 7 Comparativo entre os resultados de MIC50 e MIC90 encontrados na literatura para técnica de diluição em caldo em relação ao presente estudo.



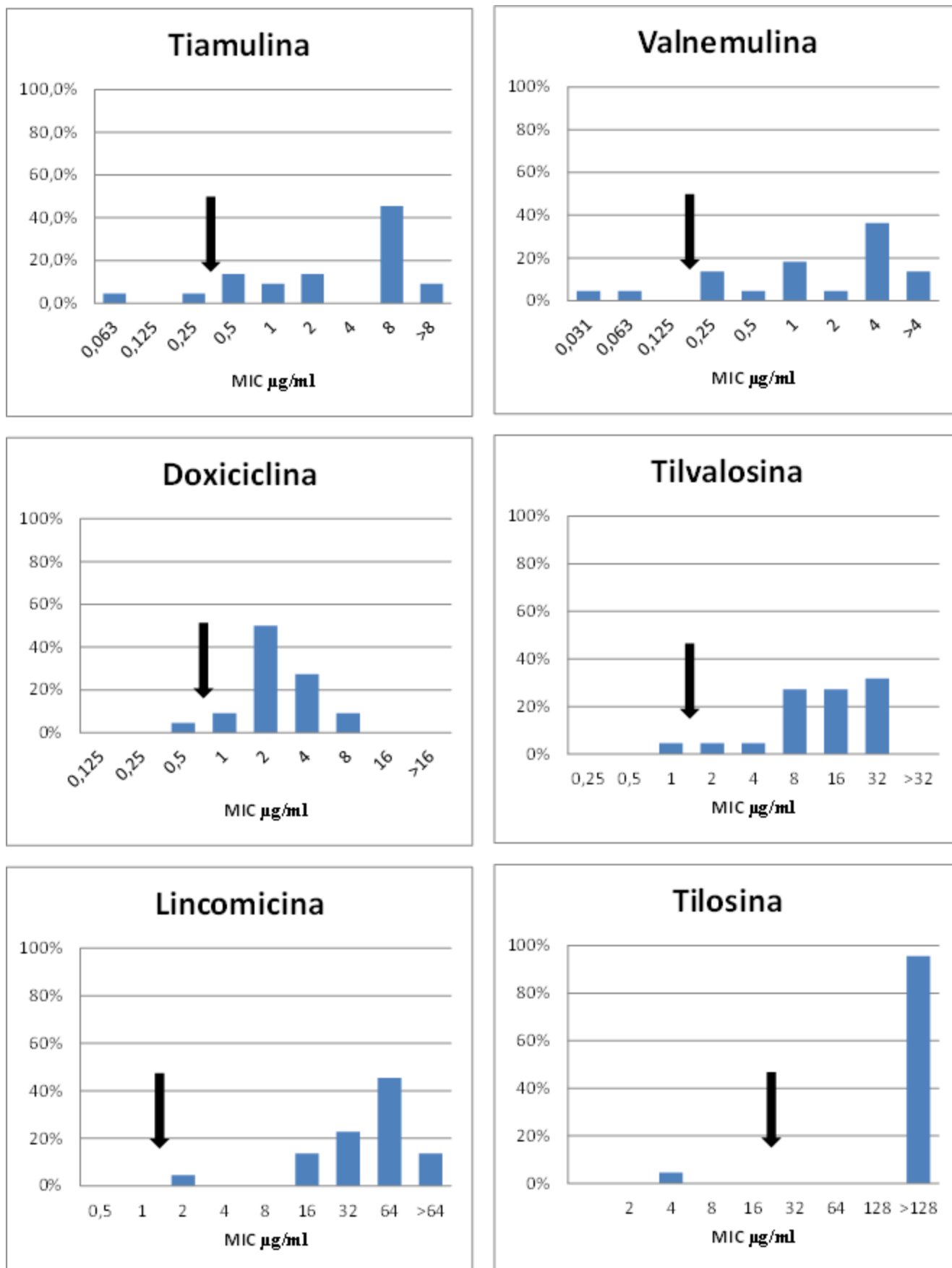


Figura 3. Susceptibilidade antimicrobiana. Distribuição do MIC de seis agentes antimicrobianos para 22 isolados de campo brasileiros de *B. hyodysenteriae*. As setas pretas indicam valores do corte em relação a estirpe selvagem (Pringle et al. 2012).

O isolamento bacteriano se mostrou o melhor método diagnóstico quando comparado à técnica de PCR. Todas as amostras incluídas neste trabalho tiveram isolamento bacteriano bem sucedido, no entanto, três com isolamento bem sucedido foram negativas à PCR quando testada diretamente das fezes e/ou raspado de mucosa. Pela PCR, os melhores resultados foram obtidos quando o DNA extraído era proveniente do cultivo em relação a PCR dos demais espécimes clínicos, corroborando com os achados de Rasback et al. (2006) e Burrough et al. (2012). Para as amostras com resultado negativo à PCR das fezes (C7001, C7002, C7003) um fator importante a ser considerado seria a quantidade insuficiente de DNA na amostra fecal, uma vez que foram obtidas de animais sem sinal clínico aparente, portanto, eliminando baixa carga bacteriana. Em trabalhos anteriores foi demonstrado que os níveis detectáveis para a técnica de PCR duplex semelhante à utilizada neste estudo são cerca de  $10^3$  a  $10^4$  bactérias/g de fezes (La et al., 2003).

Um comportamento atípico em relação às demais estirpes isoladas foi observado para C7003, que apesar de obter positividade para *B. hyodysenteriae* quando testada à PCR, na análise filogenética demonstrou alto grau de identidade com a espécie *B. murdochii*. A positividade da amostra para *B. hyodysenteriae* na PCR duplex provavelmente ocorreu devido à coexistência das duas espécies em um isolado ainda não totalmente puro. Mesmo após repiques para seleção de uma única cepa é possível a presença de contaminação de diferentes espécies de espiroquetas, por possuírem características de crescimento semelhantes. Em um estudo realizado por Clothier et al. (2011) foi detectada a presença de mais de uma cepa de *Brachyspira* sp. em 6,3% dos isolados. Testes de PCR que pesquisam apenas a *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* necessitam ser reavaliados, já que outras espécies potencialmente patogênicas do gênero como a *B. hampsonii* e outras de baixa patogenicidade como a *B. murdochii* podem ser subdiagnosticadas.

A avaliação anatomopatológica das amostras revelou um tipo de lesão esperada tanto macroscopicamente quanto ao exame histopatológico, segundo a literatura (Jacobson et al., 2004; Hampson et al., 2006). Entretanto, nos animais dos quais C7001 e C7003 foram

isoladas, não havia lesões intestinais macroscópicas aparentes, apesar do swab fecal resultarem em isolamento bem sucedido de espiroquetas. À avaliação microscópica foi observada necrose superficial discreta associada a hiperplasia de células calciformes discreta. Existem trabalhos que relatam a presença de cepas atípicas pouco virulentas que possuem capacidade de colonização, porém não induzem doença clínica (Lysons et al., 1982; Lee et al., 1993; Thomson et al., 2001).

No caso da amostra C7003 confirmada pelo sequenciamento como *B. murdochii* são esperadas lesões mais brandas, contudo, além de PCR positivo para *B. hyodysenteriae*, a mesma possui características de forte beta hemólise em ágar sangue. Uma característica definidora da *B. murdochii* é a fraca beta hemólise, nesse caso como mencionado anteriormente, uma possível explicação seria uma combinação de estirpes em isolado ainda não puro (Stanton et al., 1997).

O *Nox* gene é bem conservado no que diz respeito ao gênero *Brachyspira*, porém com alta variabilidade dentro do mesmo, sendo assim altamente discriminatório para identificação e categorização das espécies. Em contraste, os genes de rRNA 16S e rRNA 23S são mais conservados entre os membros de um mesmo gênero; no entanto podem ser observadas diferenças discretas de sequência entre as diferentes espécies presentes no gênero (Stanton et al., 1996; Leser et al., 1997). Todas as amostras com alto grau de identidade para *B. hyodysenteriae* isoladas e caracterizadas no presente estudo foram similares as anteriormente descritas no Canadá, Espanha, Suécia e Estados Unidos e Hungria, baseado na sequência do gene *Nox*. A amostra identificada por *B. murdochii* foi semelhante as estirpes caracterizadas e catalogadas na Espanha e Suécia.

De acordo com os resultados, não houve diferenças entre as cepas isoladas em diferentes estados e rebanhos brasileiros, com base no sequenciamento do gene *Nox*, antes ou após as manifestações de 2012. Assim, a sequência do gene *Nox*, embora capaz de diferenciar os isolados ao nível de espécie, não foi suficientemente discriminatória para diferenciar as linhagens dentro das espécies. Portanto, são necessários mais estudos, utilizando, por exemplo, a técnica de MLST, a

fim de compreender melhor a epidemiologia da doença no Brasil.

A criação do padrão de sensibilidade das estirpes é importante para o controle e erradicação da disenteria suína, principalmente pelo fato do surgimento de cepas de *B. hyodysenteriae* com susceptibilidade reduzida a múltiplos antimicrobianos, tanto para o ponto de corte microbiológico quanto clínico, fato observado no presente estudo e em demais estudos em vários países (Karlsson et al., 2002; Karlsson et al., 2003; Rhode et al., 2004; Hidalgo et al., 2009; Hidalgo et al., 2011; Zmudzki et al., 2012; Álvarez et al., 2013; Mirajkar & Gebhart, 2013).

Para o monitoramento da resistência, a detecção da diminuição da sensibilidade em baixo grau é importante, pois é um indício do início da resistência, facilitando a implementação de medidas a fim de evitar o surgimento de cepas com alto grau de resistência (Pringle et al., 2012).

Os testes de MIC foram somente comparados em relação a resultados da literatura que utilizaram a técnica de diluição em caldo, uma vez que são observadas diferenças de uma diluição menor para resultados em caldo em relação a técnica de diluição em ágar (Rhode et al., 2004).

Os resultados encontrados de MICs para tilosina no presente estudo, quando comparados com o descrito pela mesma técnica na literatura, mostraram-se semelhantes tanto para a MIC50 quanto para a MIC90 (Tab. 9). A alta frequência de resistência à tilosina relatada não é surpreendente tendo em vista a pressão seletiva devido ao amplo uso da mesma como um agente terapêutico e profilático na suinocultura nos últimos anos (Karlsson et al., 2002; Karlsson et al., 2003; Rhode et al., 2004; Hidalgo et al., 2009; Hidalgo et al., 2011; Zmudzki et al., 2012; Álvarez et al., 2013; Mirajkar & Gebhart, 2013). A diminuição da susceptibilidade da *B. hyodysenteriae* à tilosina é causada por mutações no gene 23S na posição 2058 do RNA ribossômico, por inibição da ligação (Karlsson et al., 1999; Karlsson et al., 2004).

Para tilvalosina todos os resultados relacionados à literatura foram abaixo aos encontrados no presente estudo. Existem poucos trabalhos que avaliam especialmente a diminuição da sensibilidade tilvalosina. Hidalgo et al. (2011) detectaram uma mutação no gene

23S na posição 2059 ligada a resistência para tilvalosina. Para Lincomicina, a MIC50 foi superior em relação ao relatado na literatura, no entanto, a MIC 90 foi próxima às encontradas por Hidalgo et al. (2009) e Alvarez et al. (2013). As mutações ocorridas são semelhantes às encontradas para tilosina e tilvalosina (Karlsson et al., 1999; Karlsson et al., 2002; Karlsson et al., 2003; Rhode et al., 2004; Hidalgo et al., 2009; Hidalgo et al., 2011; Zmudzki et al., 2012; Álvarez et al., 2013; Mirajkar & Gebhart, 2013).

Para doxiciclina, os valores da MIC50 foram próximos aos encontrados por Zmudzki et al. (2012) e Álvarez et al. (2013), já a MIC90 foi elevada em relação ao descrito anteriormente (Karlsson et al., 2002; Karlsson et al., 2003; Rhode et al., 2004; Pringle et al., 2007; Hidalgo et al., 2009; Hidalgo et al., 2011; Zmudzki et al., 2012; Álvarez et al., 2013; Mirajkar & Gebhart, 2013). A diminuição da susceptibilidade à doxiciclina foi associada com uma mutação na posição 1058 do gene de rRNA 16S para *B. hyodysenteriae* (Karlsson et al., 2002; Karlsson et al., 2003; Rhode et al., 2004; Pringle et al., 2007; Hidalgo et al., 2009; Hidalgo et al., 2011; Zmudzki et al., 2012; Álvarez et al., 2013; Mirajkar & Gebhart, 2013).

Valnemulina juntamente a doxiciclina obtiveram os valores mais baixos no presente estudo. Para valnemulina os resultados foram próximos ou semelhantes aos já relatados (Karlsson et al. 1999; Karlsson et al., 2002; Karlsson et al., 2003; Rhode et al., 2004; Hidalgo et al., 2009; Hidalgo et al., 2011; Zmudzki et al., 2012; Álvarez et al., 2013; Mirajkar & Gebhart, 2013).

Os resultados para tiamulina na MIC50 foram todos maiores em relação as descrições anteriores, no entanto para MIC90 foram iguais aos resultados encontrados por Rhode et al. (2004), Hidalgo et al. (2011) e por Alvarez et al. (2013). A resistência relacionada à tiamulina e as demais pleuromutilinas é proveniente de mutações pontuais no domínio V do gene de rRNA 23S e da proteína ribossomal L3 (Hidalgo et al., 2011).

Os resultados de MIC quando comparados à literatura deve levar em conta a frequência de uso de cada antimicrobiano em cada país. Locais em que o uso de carbadox é permitido, como nos EUA, o MIC para Tiamulina é considerado baixo pois o seu uso é menor em relação aos demais países que

proíbem o uso do carbadox. Esse fato foi observado em cepas americanas como demonstrado por Mirajkar & Gebhart (2013). Dados comparativos com a literatura para os seis antimicrobianos testados estão demonstrados na tabela 7.

## 6. CONCLUSÃO

A disenteria suína é uma doença emergente no Brasil, presente nas principais regiões produtoras de suínos do país. Os isolados das diversas regiões são semelhantes entre si à análise filogenética baseada no gene *Nox*, com exceção de uma única amostra detectada como *B. murdochii*. Os resultados confirmam a presença de resistência aos principais agentes antimicrobianos usados contra *B. hyodysenteriae*, muito pronunciada para tilosina e lincomicina como descrito em trabalhos anteriores. A tiamulina, doxiciclina e tilvalosina obtiveram resultados elevados em relação ao anteriormente descrito. Estudos epidemiológicos e utilização de outras técnicas moleculares disponíveis serão importantes para o completo entendimento dos surtos ocorridos no ano de 2012 e completa caracterização das cepas circulantes no país. Estudos futuros de caracterização de estirpes de *B. hyodysenteriae* de baixa patogenicidade são necessários para classificação das mesmas como cepas atípicas e os possíveis impactos provocados por elas quando introduzidas em um rebanho.

## 7. REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, L. MARTÍNEZ-LOBO, F.J., ALLER L.M., et al., Antimicrobial Susceibility of 78 Isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* Recovered from Swine Dysentery Outbreaks in Spain during 2011 & 2012 .In: *International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Surrey*, 82, 2013.
- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48, 1, 5-16, 2001.
- ARGENZIO, R.A., WHIPP, S.C. & GLOCK, R. D. Pathophysiology of swine dysentery: Colonic transport and permeability studies. *J. Infect. Dis.*, 142, 676-684, 1980.
- ATYEO, R. F., STANTON, T. B., JENSEN, N. S., et al. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*Nox*) sequence comparisons and *Nox*-based polymerase chain reaction tests.. *Vet. Microbiol.* 67, 47 – 60, 1999.
- ATYEO, R.F., OXBERRY, S.L., COMBS, B.G., et al. Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 126-130, 1998.
- BACCARO, M.R., MORENO, A.M., SHINYA, L.T. et al. Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finishing pigs. *Braz. J. of Microbiol.*, 34, 225-229, 2003.
- BACCARO, M. R., SHINYA, L. T., MORENO, A.M. et al., Detecção de *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* através da coloração de Ryu, imunofluorescência indireta e da PCR. In: *Anais do IX Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*, Belo Horizonte, Brasil, 191-192 ,1999.
- BARCELLOS, D.E.S.N., SOUZA, R.F., OLIVEIRA FILHO, J.X., et al., Diarréias causadas pela infecção com *Brachyspira* spp. em suínos. *Act. Sci. Vet.* (UFRGS. Impresso), 38, 229-245, 2010.
- BARCELLOS, D.E.S.N., RAZIA, L.E. & BOROWSKI, S.M. Ocorrência e identificação de espiroquetas intestinais em suínos em granjas de porte industrial em duas regiões criatórias do RS, em relação à medicação da ração. *Ciência Rural*, 33,5 , 725-729, 2003.
- BARCELLOS, D.E.S.N., MATHIESEN, M., UZEDA, M., et al., Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet. Rec.*, 146, 398-403, 2000.
- BARCELLOS, D.E.S.N., BOROWSKI, S.M. & DE OLIVEIRA, S.J. Causas de diarreia em leitões na fase de recria. In: *Anais do VII Congresso Brasileiro de Veterinários*

- Especialistas em Suínos*, Blumenau, Brasil, 87, 1995.
- BELLEGARD, M., WANCHANTHUEK, P., LA, T., et al. Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. *PLoS ONE*. 4: 1-12, 2009.
- BEUTIN, L., PRELLER, E. & KOWALSKI, B. Mutagenicity of quinoxin, its metabolites, and two substituted quinoxaline-di-N oxides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20:336-343, 1981.
- BOYE, M., BALODA, S.B., LESER, T.D. et al. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet. Microbiol.*, 81, 33-40, 2001.
- BOYE, M., JENSEN, T.K., MOLLER, K. et al. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA in situ hybridization. *Mol. Cell. Probe*, 12, 323–330, 1998.
- BOWER, C.K. & DAESCHEL, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food. Microbiol.* 50, 33-34, 1999.
- BURCH D.G.S. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical correlations relating to the therapy of colonic infections in the pig and breakpoint determinations. *Pig. J.*, 56, 8–24, 2005.
- BURROUGH, E.R., STRAIT, E.L., KINYON, J.M., et al., Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J. Vet. Diag. Invest.* 6, 1025–1034, 2012.
- CALDERARO, A., MERIALDI, G., PERINI, S., et al., A novel method for isolation of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Vet. Microbiol.* 80, 47–52, 2001.
- CARVAJAL, A., DE ARRIBA, M.L., RODRIGUEZ, H., et al., Prevalence of *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* infections amongst Spanish swine herds with diarrhoea. In *Proc 2nd Int Conf Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans*, Eddleston, Scotland, 43, 2003.
- CHANDER, Y., PRIMUS, A., OLIVEIRA, S. et al., Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hamptonii*". *J. VET. Diagn. Invest.* 24, 5, 903–910, 2012.
- CHOMCZYNSKI, P.A. reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15, 3, 532-534, 536-537, 1993.
- CIZEK, A., SMOLA, J. & MÁDR, P. In vitro activity of six anti-dysenteric drugs on *Serpulina hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* strains isolated in the Czech Republic. In *Proceedings of the 15th Int. Pig Vet. Soc. Cong*, Birmingham, UK, 135, 1998.
- CLOTHIER, K.A., KINYON, J.M. & FRANA, T. S. et al. Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. *J. Vet. Diag. Invest.* 23, 6, 1140–1145, 2011.
- COGHLAN, A. Animal antibiotics threaten hospital epidemics. *New Scientist*., 7, 151, 1996.
- DANIEL, A.G., SATO, J.P.H., RESENDE T.P., et al. Infecção por *Brachyspira* sp. em suínos no Brasil. 131-139. In: Simpósio Internacional de Suinocultura, VIII. Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: VIII SINSUI, 2013, p.131-139.
- DEWEY, C.E. Ration induced diarrhea in grower pigs. *J. Swine. Health. Prod.* 1, 16–21, 1993.
- DRÉAU, D., LALLÉS, J.P., PHILOUZE-ROMÉ, V. et al. Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 2090–2098, 1994.
- DUHAMEL, G.E. Impact of Colonic *Brachyspira* Spirochete Host Range on Transmission of Multidrug Resistant Clinical

- Isolates. In: Proceedings *Carlos Pijoan Symposium on Swine Dysentery*, Saint Paul, Minnesota, 1-4, 2011.
- DUHAMEL, G.E., KINYON, J.M., MATHIESEN, M.R., et al. In vitro activity of four antimicrobial agents against North American isolates of porcine *Serpulina pilosicoli*. *J. Vet. Diag. Invest.* 10, 350-356, 1998.
- DUINHOF, T.F., DIERIKX, C.M., KOENE, M. G., et al. Multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* in a Dutch sow herd. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 133, 604-608, 2008.
- DURAN, O., PHILLIPS, N., TASKER, J., et al., Susceptibility of recent *Brachyspira hyodysenteriae* isolates to Tylosin. In: Proceedings of the *International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Spain*, 48, 2009.
- DURMIC Z., PETHICK D.W., PLUSKE J. R., et al. Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection. *J. Appl. Microbiol.* 85:574–582, 1998.
- FELLSTROM, C., PETTERSSON, B., ZIMMERMAN, U., et al., Classification of *Brachyspira* spp. Isolated from Swedish dogs. *Anim. Health Res. Rev.*, 2, 1, 75–82, 2001.
- FELLSTROM, C., PETTERSSON, B., THOMPSON et al. Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35,462–467, 1997.
- FELLSTROM, C. & GUNNARSSON, A. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Res. Vet. Sci.*, 59, 1-4, 1995.
- FOSSI, M., POHJANVIRTA, T., PELKONEN, S., Molecular epidemiological study of *Brachyspira pilosicoli* in Finnish sow herds. *Epidemiol. Infect.* 131, 967–973, 2003.
- FOSSI, M., SARANPAA, T., & RAUTIAINEN, E. In vitro sensitivity of the swine *Brachyspira* species to tiamulin in Finland 1995–1997. *Acta Vet. Scand.* 40, 355–358, 1999.
- GUEDES, R.M.C. & BARCELLOS, D.E.S.N. Disenteria Suína. In: *Doenças dos suínos*. Edited by: BARCELLOS, D.E.S.N., SOBESTIANSKY, J. Goiânia, Canone. 2, 128-134, 2012.
- GUEDES, R.M.C. Controle racional das diarreias de recria e terminação. *Acta Sci.Vet.*, 38, 247-253, 2010.
- GUEDES, R.M.C. Diarreia em suínos de recria e terminação principais enfermidades. *Suíno Cia.*,11:11-18 , 2005.
- GLOCK, R.D., HARRIS, D.L. & KLUGE, J.P. Localization of spirochetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the lesions of swine dysentery. *Infect. Immun.* 9,167–178, 1974.
- HAMPSON, D.J. & AHMED, N. Spirochaetes as intestinal pathogens: Lessons from a *Brachyspira* genome. *Gut. Path.*, 1, 1-3, 2009.
- HAMPSON, D.J., FELLSTRON, M.C. & THOMSON, J.R., Swine dysentery. In: *Diseases Of Swine*. Edited by: STRAW, B.E., ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 9, 785-805, 2006.
- HAMPSON, D.J., TROTT, D.J. Spirochaetal Diarrhea/Porcine Intestinal Spirochetosis. In: *Diseases Of Swine*. Edited by: STRAW, B E., ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 9, 40, 553-562, 2006.
- HAMPSON, D.J., ATYEO, R.F. & COMBS, B.G. Swine dysentery. In: *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. Edited by: HAMPSON, D.J., STANTON, T.B., CAB International, England, 175–209, 1997.
- HAMPSON, D.J. & TROTT, D.J. A review – Intestinal spirochaetal infections of pigs: an overview with an Australian perspective. In:

- Manipulating Pig Production Werribee: *Australian Pig Science Association*. Edited by: HENESSY, D.P. & CRANWELL, P.D.V. 139-169, 1995.
- HAMPSON, D. J., COMBS, B. G., HARDERS, S. J., et al. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from a wild rat living on a piggery. *Aust. Vet. J.*, 68, 308, 1991.
- HARRIS, D.L., GLOCK, R.D., CHRISTENSEN, C. R., et al. Swine dysentery. I. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* 67, 61-64, 1972.
- HIDALGO, A., CARVAJAL, A., VESTER, B. et al., Trends towards Lower Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Acquired Resistance among Clinical Isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55, 7, 3330-3337, 2011.
- HIDALGO, Á., CARVAJAL A., GARCÍA-FELIZ C., et al., Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* 87, 7-12, 2009.
- HOMMEZ, J., CASTRYCK, F., MIRY, C., et al. Susceptibility of different *Serpulina* species in pigs to antimicrobial agents. *Vlaams. Diergen. Tijds.* 67, 32-35, 1998.
- HUDSON, M.J., ALEXANDER, T.J.L., LYSONS, R.J. Diagnosis of swine dysentery: Spirochaetes which may be confused with *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.* 99, 498-500, 1976.
- HUISMAN, J. & JANSMAN, A.J.M.. Dietary effects and some analytical aspects of antinutritional factors in peas (*Pisum sativum*), common beans (*Phaseolus vulgaris*) and soyabeans (*Glycine max* L.) in monogastric farm animals. A literature review. *Nutr. Abstr. Rev. Ser. B.* 61, 901-921, 1991.
- HUMPHREY, S.B., STANTON, T.B., JENSEN, N.S., et al. Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.*, 179, 323-329, 1997.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. Estatística da produção pecuária setembro de 2012. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, 2012/2013. 11-15, Brasil, 2013.
- JACOBSON, M.; FELLSTROM, C.; LINDBERG, R. et al., Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J. Med. Microbiol.*, 53, 273-280, 2004.
- JANSSON, D.S., JOHANSSON, K., OLOFSSON, T. et al., *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Med. Microbiol.*, 53, 293-300, 2004.
- JANSSON, D.S., BROJER, C., GAVIER-WIDÉN, et al. *Brachyspira* spp. (*Serpulina* spp.) in birds: a review and results from a study of Swedish game birds. *Anim. Health Res. Rev.* 2, 1, 93-100, 2001.
- JENSEN, T.K., MØLLER, K., BOYE, M., et al. Scanning electron microscopy and fluorescent in situ hybridization of experimental *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* infection in growing pigs. *Vet Pathol.* 37(1):22-32, 2000.
- JENSEN, T.K., BOYE, M., MOLLER, K., et al. Association of *Serpulina hyodysenteriae* with the colonic mucosa in experimental swine dysentery studied by fluorescent in situ hybridization. *APMIS.* 106,11,1061-8, 1998.
- JOENS, L.A., GLOCK, R.D., WHIPP, S.C., et al., Location of *Treponema hyodysenteriae* and synergistic anaerobic bacteria in colonic lesions on gnotobiotic pigs. *Vet. Microbiol.* 6:69-77, 1981.
- JOENS, L.A. Experimental transmission of *Treponema hyodysenteriae* from mice to pigs. *Am. J. Vet. Res.* 41(8), 1225-1226, 1980.
- KARLSSON, M., ASPÁN, A., LANDÉN, A., et al. Further characterization of porcine

- Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *J. Med. Microbiol.* 53, 281–285, 2004.
- KARLSSON, N.M., FELLSTROM, C., GUNNARSSON, A., et al., Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2596–2604, 2003.
- KARLSSON M., OXBERRY S.L. & HAMPSON D.J. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Vet. Microbiol.* 84, 123–133, 2002.
- KARLSSON, M., GUNNARSSON, A. & FRANKLIN, A. Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*. *An. Healt. Res. Rev.* 2, 59-65, 2001.
- KARLSSON M., FELLSTROM C., HELDTANDER M.U., et al., Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 255–260, 1999.
- KENNEDY, M. J., ROSNICK, D.K., ULRICH, R. G. et al., Association of *Treponema hyodysenteriae* with Porcine Intestinal Mucosa. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1565-1576, 1988.
- KINYON, J.M., HARRIS, D.L. & GLOCK, R. D. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from experimentally infected pigs at various intervals post-inoculation. In: *Proc 6th Congr Int Pig Vet Soc*, 232, 1980.
- KINYON, J. M., HARRIS, D.L. & GLOCK, R.D. Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 15, 638–646, 1977.
- LA, T., COLLINS, A.M., PHILLIPS, N.D. et al. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. *Letters in Applied. Microbiol.*, 42, 284-288, 2006.
- LA, T., PHILLIPS, N.D. & HAMPSON, D.J. Development of a Duplex PCR Assay for Detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in Pig Feces. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 7, 3372–3375, 2003.
- LEE, J.I., HAMPSON, D.J. COMBS, B.G., et al. Genetic relationships between isolates of *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*, and comparison of methods for their subspecific differentiation. *Vet Microbiol*, 34,35–46, 1993.
- LEMCKE, R.M., BEW, J., BURROWS, M. R., et al. The growth of *Treponema hyodysenteriae* and other porcine intestinal spirochetes in a liquid medium. *Res. Vet. Sci.* 26, 315-319, 1979.
- LESER, T.D., MCLLER, K., JENSEN, T.K. et al. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly  $\beta$ -haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targetting 23S rDNA. *Mol. and Cell. Probes.* 11, 363-372, 1997.
- LIEBLER-TENORIO, E.M., POHLENZ, J.F. & WHIPP S.C. Diseases of the Digestive System. In: *Diseases Of Swine*. Edited by: STRAW, B. E., ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, 9, 57, 821-832, 2006.
- LI, D.F., NELSSON, J.L. & REDDY, P.G. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 69, 4062–4069, 1991.
- LOBOVÁ, D., SMOLA, J. & CIZEK, A. Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J. Med. Microbiol.* 53, 287 –291, 2004.
- LUNA, L.G. *Routine Staining Procedures: Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw-Hill Book Co, 24-58, 1968.
- LYSONS, R.J., LEMCKE, R.M, BEW, J., et al. An avirulent strain of *Treponema hyodysenteriae* isolated from herds free of swine dysentery. In *Proc 7th Congr Int Pig Vet Soc*, 40, 1982.



- MAIDEN, M.C., BYGRAVES, J.A., FEIL, E., et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 3140–3145, 1998.
- MATEU, E. & MARTIN, M. Why is antimicrobial resistance a veterinary problem as well? *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, Berlin, 48, 8, 569-581, 2001.
- MANIE, T., KHAN, S., BROZEL, V.S. et al. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. *Letters in Applied Microbiol.*, 26:253-258, 1997.
- MENIN, A., RECK, C., SOUZA, D. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*. *Cienc. Rural*, 38, 6, 1687-1693, 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (MAPA). Proibição da fabricação, a importação, a comercialização e o uso de produtos destinados à alimentação animal contendo a substância química denominada Carbadox para certificação de granjas de reprodutores suídeos. *Instrução Normativa n° 35*, de 14 de novembro de 2005.
- MIRAJKAR N.S. & GEBHART C.J. Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Brachyspira* species in U. S. Swine herds. In: *International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans*. Surrey, 53, 2013.
- MOLLER, K., JENSEN, T.K., JORSAL, S.E., et al., Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet. Microbiol.*, 62, 59–72, 1998.
- MORES, N. & SOBESTIANSKY, J. Controle da disenteria suína através da quimioterapia e limpeza e desinfecção das instalações. In: *Anais do I Congresso Brasileiro dos Veterinários Especialistas em Suínos*, Curitiba, Brasil, 28, 1984.
- MUNIAPPA, N., MATHIESEN, M.R., DUHAMEL, G.E. Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9, 165-171, 1997.
- NABUURS, M.J.A. Thermostable factor(s) in soya producing a net excess of secretion in the ligated gut test in pigs. *Vet Res Commun* 10, 399–405, 1986.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*, sixth ed. Approved standard M11-A6. NCCLS, Wayne, PA, 2004.
- NARESH, R. & HAMPSON, D. J. Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. *Microbiology+*, 156, 191–197, 2010.
- NEVES S. M. N. Avaliação das técnicas de isolamento, reação em cadeia da polimerase e hibridização fluorescente in situ para diagnóstico de *Brachyspira* sp. em suínos. Belo Horizonte: UFMG, Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na área de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 50p. 2012.
- NEEF, N. A., MCRIST, S., LYSONS, R.J., et al. Development of large intestinal attaching and effacing lesions in pigs in association with the feeding of a particular diet. *Infect. Immun.* 62, 4325–433, 1994.
- NOVOTNÁ, M. & ŠKARDOVÁ, O. *Brachyspira hyodysenteriae*: detection, identification and antibiotic susceptibility. *Vet. Med. – Czech*, v. 47, n. 4, p. 104–109, 2002.
- OCHIAI, S., ADACHI, Y. & MORI, K. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachyspira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli*

- comb. nov. *Microbiol. and Immun.*, 4, 445-452, 1997.
- OLSON, L.D. Clinical and pathological observations on the experimental passage of swine dysentery. *Can J. Comp. Med.* 38, 7-13, 1974.
- OXBERRY, S.L. & HAMPSON, D.J. Colonisation of pet shop puppies with *Brachyspira pilosicoli*. *Vet. Microbiol.* v. 93, p. 167-174, 2003.
- PAULOVICH, F.B., BOROWSKI, S.M., DRIEMEIER, D. et al. Avaliação da patogenicidade de amostras de *Brachyspira pilosicoli* através de técnicas histopatológicas convencionais e por imuno-histoquímica. *Pesq. Vet. Bras.* 24, 2, 144-148, 2004.
- PLAWINSKA, J., JAKUBOWSKI, T., RZEWUSKA, M., et al., Occurrence of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* spp. infection in swine suffering from diarrhea. In *Proc 18th Congr Int Pig Vet Soc*, 287, 2004.
- PRINGLE, M., LANDEN A., ERICSSON H. et al Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. *Act. Vet. Scan.*, 54, 54, 2012.
- PRINGLE, M., FELLSTROM, C., & JOHANSSON, K. E. Decreased susceptibility to doxycycline associated with a 16S rRNA gene mutation in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol.* 123, 245-248, 2007.
- PROHÁSZKA, L. & LUKACS, K. Influence of the diet on the antibacterial effect of volatile fatty acids and on the development of swine dysentery. *Zentr. fur Veterinär. B.* 31: 779-785, 1984.
- RASBACK, T., JANSSON, D.S., JOHANSSON, K., et al., A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ. Microbiol.*, 4, 983-991, 2007.
- RÅSBÄCK, T., FELLSTRÖM, C., GUNNARSSON, A. et al. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J. Microbiol. Meth.*, 66, 347-353, 2006.
- RASBACK, T., FELLSTROM, C., BERGSJO, et al. Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test. *Vet. Microbiol.* 109, 229-243, 2005.
- RAYNAUD, J. P., BRUNAULT, G. & PHILIPPE, J. Swine dysentery. Comparison of experimental diseases produced by infection with colonic mucosa or with *Treponema hyodysenteriae*, French strains, and of 'natural' disease. *Ann. Rech. Vét.* 11, 68-87, 1980.
- REDDY, N.R. & PIERSON, M.D. Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. *Food. Res. Int.* 27, 281-290, 1994.
- ROHDE, J., KESSLER, M., BAUMS, C.G., et al., Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet. Microbiol.* 102, 25 -32, 2004.
- SAVAGE, D.C. Colonization by and survival of pathogenic bacteria on intestinal mucosal surfaces. In *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*, Edited by B. Bitton & K. C. Marshall. New York: Wiley, 175-206, 1980.
- SIBA, P.M., PETHICK, D.W., HAMPSON, D.J. Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. *Epidem. Infect.* 116, 207-216, 1996.
- SONGER, J.G. & POST, K.W. *Veterinary Microbiology – Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. St. Louis, Elsevier, Saunders Publishing, 424p, 2005.
- SOBESTIANSKY, J., MATOS, M.P.C. & SOUZA, C.M. *Monitoria patológica de suínos em matadouros*. Goiânia: 52, 2001.
- SPERLING, D., SMOLA, J., CIZEK, A. Characterisation of multiresistant *Brachyspira*

- hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Vet. Rec.*, 168, 215, 2011.
- SRINIVISAN, V., GILLESPIE, B.E., LEWIS, M.J., et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, 124, 3, 319-328, 2007.
- STANTON T.B., HUMPHREY S.B., & SHARMA V.K., Collateral effects of antibiotics: carbadox and metronidazole induce VSH-1 and facilitate gene transfer among *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2950–2956, 2008.
- STANTON, T.B. The genus *Brachyspira*. In: *The Prokaryotes*. Edited by: FALKOW S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H., STACKEBRANT E. SPRINGER, New York, 7, 330-56, 2006.
- STANTON T.B., FOURNIE-AMAZOUZ E., POSTIC D., et al. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1007-1012, 1997.
- STANTON, T.B., TROTT, D.J., LEE, J.I., et al., Differentiation of intestinal spirochaetes by multilocus enzyme electrophoresis analysis and 16S rRNA sequence comparisons *FEMS Microbiol. Lett.*, 136, 181–186, 1996.
- TAYLOR, D.J., SIMMONS, J.R., LAIRD, H. M., Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.*, 106, 326-332, 1980.
- TAYLOR, D.J. Studies of bacteria associated with swine dysentery. Ph.D. Thesis. University of Cambridge, Cambridge, England, 1972.
- TAYLOR, D.J. & ALEXANDER, T.J.L., The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br. Vet. J.*, 11, 58-61, 1971.
- THOMSON, J.R., SMITH, W.J., MURRAY, B.P., et al., Porcine enteric spirochete infections in the UK: Surveillance data and preliminary investigation of atypical iso-lates. *Anim. Health. Res. Rev.* 2, 31–36, 2001.
- THOMSON, J.R., SMITH, W.J. & MURRAY, B.P. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Vet. Rec.*, 142, 235-239, 1998.
- TROTT, D.J., HUXTABLE, C.R. & HAMPSON, D.J. Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. *Infect. and Immun.*, 64, 4648-4654, 1996.
- URWIN, R. & MAIDEN, M.C., Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends. Microbiol.* 11, 479–487, 2003.
- VANUCCI, F. & GEBHART, C. Disenteria suína: Reemergência global e identificação de novas espécies In: *V SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA*, VIII. Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: VIII , 141-147, 2013.
- VIOTT, A.M., LAGE, A.P., CRUZ JR., et al. The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. *Braz. J. Microbiol.* 44, 1, 145-151, 2013.
- VIOTT, A.M. Prevalência de enteropatógenos em suínos de recria/terminação em Gerais e desenvolvimento de modelo experimental murino de enteropatia proliferativa. Belo Horizonte: UFMG, Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na área de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, . p 47, 2010.
- ZMUDZKI, J., SZCZOTKA, A., NOWAK, A., et al. Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from 21 Polish farms . *Pol. J. Vet. Sci.* 15, 2, 259–265, 2012.
- WARTH, J.F.G., KLUPPEL, M.E.A. & DITTRICH, T. R. C. Diagnóstico da disenteria suína no Estado do Paraná. In: *Anais II*

*Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*, Rio de Janeiro, 109, 1985.

WILCOCK, B.P. & OLANDER, H.J. Studies on the pathogenesis of swine dysentery. I. Characterization of the lesions in colons and colonic segments inoculated with pure cultures or colonic content containing *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Pathol.* 16, 450–465, 1979.

WHIPP, S. C., ROBINSON, I. M., HARRIS, D. L., et al., Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 26, 1042–1047, 1979.

WHITING, R.A., DOYLE, L.P., SPRAY, R. S. Swine dysentery. *Purdue Univ. Agric. Exp. Stn. Bul.*, 1, 257, 3-15, 1921.

## 8. ANEXOS

Anexo 1. Nomes das espécies e origem das cepas de referência de *Brachyspira* sp., com 100% de identidade com as amostras consultadas pelo GenBank (C7003).

Amostras	%Identidade	Cod.	Localização	Ano
<b>C7003</b>				
<i>Brachyspira tensão murdochii</i> X2	100%	<u>JX428812.1</u>	Espanha	ago/13
<i>Brachyspira</i> sp. F65	100%	<u>KC561416.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. C47	100%	<u>KC561415.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. F62	100%	<u>KC561414.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. B60	100%	<u>KC561413.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. B70	100%	<u>KC561412.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. B64	100%	<u>KC561411.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. G81	100%	<u>KC561410.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. F66	100%	<u>KC561409.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. D71	100%	<u>KC561408.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. C52	100%	<u>KC561407.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. F68	100%	<u>KC561406.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. B31	100%	<u>KC561405.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. F87	100%	<u>KC561404.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. C61	100%	<u>KC561403.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. C35	100%	<u>KC561402.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. B58	100%	<u>KC561401.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. F56	100%	<u>KC561400.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. G70	100%	<u>KC561399.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. A62	100%	<u>KC561398.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. K07	100%	<u>KC561397.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. A63	100%	<u>KC561396.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. B7	100%	<u>KC561395.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. F52	100%	<u>KC561394.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. A22	100%	<u>KC561393.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. A58	100%	<u>KC561392.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira</i> sp. A50	100%	<u>KC561391.1</u>	Canadá	jul/13
<i>Brachyspira murdochii</i> C378	100%	<u>EF517548.1</u>	Suécia	mar/08

Anexo 2. Nomes das espécies e origem das cepas de referência de *Brachyspira* sp., com 100% de identidade com as amostras consultadas pelo GenBank.

SEQ Anexo \\* ARA

*Demais amostras testadas*

<i>Amostras</i>	%Identidade	Cod.	Localização	Ano
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> ATCC 27164	100%	<a href="#">KC984311.1</a>	Canadá	ago/13
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> 3140	100%	<a href="#">JX428806.1</a>	Espanha	ago/13
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> NADH oxidase	100%	<a href="#">HM462461.1</a>	Hungria	mar/11
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> AN 2420/97	100%	<a href="#">DQ487118.1</a>	Suécia	mar/07
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> AN 174/92	100%	<a href="#">DQ487117.1</a>	Suécia	mar/07
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> AN 383:2 / 00	100%	<a href="#">DQ487116.1</a>	Suécia	mar/07
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> AN 1409:2 / 01	100%	<a href="#">DQ487115.1</a>	Suécia	mar/07
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> B169	100%	<a href="#">AF060801.1</a>	EUA	nov/98
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> B78	100%	<a href="#">AF060800.1</a>	EUA	nov/98
<i>Serpulina hyodysenteriae</i> NADH oxidase	100%	<a href="#">U19610.1</a>	EUA	fev/95

