

José Paulo Hiroji Sato

Diversidade genética e virulência de amostras de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos
assintomáticos e com doença clínica

Tese apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, Área de Concentração- Patologia Animal, Escola de Veterinária-UFMG, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Roberto M. C. Guedes

Co-orientadores: Prof. Dr. Fábio Augusto Vannucci e Prof. Dr. Carlos A. G. Leal

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2017

S253d Sato, José Paulo Hiroji, 1987-
Diversidade genética e virulência de amostras de *Brachyspira hyodysenteriae*
isoladas de suínos assintomáticos e com doença clínica / José Paulo Hiroji Sato. – 2017.
70 p. : il.

Orientador: Roberto M. C. Guedes

Co-orientadores: Fábio Augusto Vannucci, Carlos A. G. Leal

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Diarreia em animais – Teses. 3. Patologia veterinária –
Teses. I. Guedes, Roberto Mauricio Carvalho. II. Vannucci, Fábio Augusto. III. Leal,
Carlos Augusto Gomes. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
V. Título.

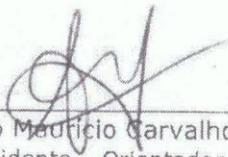
CDD – 636.408 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

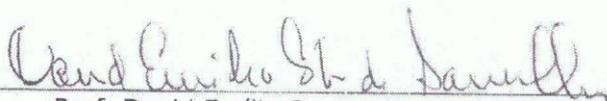
JOSÉ PAULO HIROJI SATO

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

Aprovada em 29 de Maio de 2017, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Roberto Medício Carvalho Guedes
Presidente - Orientador



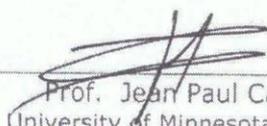
Prof. David Emilio Santos Neves de Barcellos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS



Prof. Rodrigo Otávio Silveira Silva
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Roselene Ecco
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Jean Paul Cano
University of Minnesota - USA

Dedico este trabalho à minha família.
Que sempre incentivaram na minha formação.
Pelo amor incondicional.
Que são tudo para mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a vida, saúde e proteção.

Aos meus familiares pelo amor e admiração. Pais, José e Regina e aos meus irmãos, Josi e Mir.

À família mineira que me adotou durante minha morada em Belo Horizonte e que serão para toda a vida. Mães, Lili, Tia Lourdes, Dona Elza, toda família Nogueira e agregados. Ao meu irmão de coração Breno Benett, obrigado pela parceria nas festas, bares, caminhadas na lagoa e momentos de desabafo! Serei eternamente grato por estarem comigo nos momentos de alegria e principalmente nos momentos difíceis.

Aos companheiros de habitação, Gil Brito, Gisa, Ana Paula e Elizabeth pela moradia agradável, pelas conversas e troca de experiências. Em especial ao Bruno Pontes, apesar da distância sei que sempre estará disposto para me ouvir e ajudar.

A Amanda Gabrielle por ter compartilhado o conhecimento, experiência e “macetes” das Brachyspiras. Sua generosidade, boa vontade e disposição são admiráveis. Sua amizade e trabalhar contigo foram sensacionais!

Aos novos amigos, Tati Carvalho, Lucas Sacramento, Diogo Enedino, Ana Paula Damasceno, Bruno Antunes, Fernanda e Shirlene. Amizades que iniciaram nessa etapa e levarei para sempre!

Ao Vitor Hugo, pelo exemplo de esperança, fé, amor, força e superação!

Aos meus irmãos dos suínos, Talita, Carlos, Michelle, Mariana, Ricardo, Luisa, Javier, Lucas, Mariane, Amanda Vasconcelos, Camila e Lourença pela ajuda, amizade e companheirismo, essenciais para todo este trabalho.

Aos companheiros da Patologia e dos diferentes departamentos da Escola de Veterinária, que compartilharam conhecimento e amizade. A convivência nos laboratórios eram grandes, durante a semana, nos finais de semana e feriados. Todos foram fundamentais, em especial agradeço a Leimar Marques, Amanda Maria, Rodrigo Macedo, Juneo Silva, Lorena Rocha, Juliana Fortes, Natalia, Cíntia Randt, Tayse, Tati Fiúza, Bruno Paiva e Elizabete. A Vita, pelas conversas nos corredores, abraços, pelo entusiasmo e risadas contagiantes!

Ao Professor Roberto Guedes, pela excepcional oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela influência positiva no meu crescimento profissional, orientação, auxílio, ensinamentos, paciência, exemplo de profissional e pessoa.

Aos mestres que contribuíram para minha formação e desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Professor David Barcellos, por ter me incentivado a fazer esse doutorado, contribuído com a doação de isolados históricos e protocolos laboratoriais.

À Universidade Federal de Minas Gerais e Escola de Veterinária pelo acolhimento durante todo o período de doutorado. À Capes, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
<i>Brachyspira</i> spp.....	17
Infecções experimentais para avaliação da doença.....	18
Disenteria Suína.....	19
. Aspectos Epidemiológicos.....	20
. Patogênese.....	21
. Aspectos clínicos e patológicos.....	23
. Diagnóstico.....	23
. Tipificação.....	25
Referências Bibliográficas.....	27
CAPÍTULO 1: DIVERSIDADE GENÉTICA E EVOLUÇÃO DE <i>Brachyspira</i> <i>hyodysenteriae</i> ISOLADAS DE SUÍNOS NO BRASIL	37
1. Introdução.....	38
2. Material e Métodos.....	39
2.1. Amostras.....	39
2.2. Isolamento Bacteriano e Identificação.....	39
2.3. Tipagem de Sequências Multiplocus (MLST)	40
2.4. Análises filogenéticas.....	40
3. Resultados.....	41
4. Discussão.....	44
5. Referências Bibliográficas.....	48
CAPÍTULO 2: INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS COM <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> ISOLADA DE REBANHO CLINICAMENTE SAUDÁVEL	54
1. Introdução.....	55
2. Material e Métodos.....	55
2.1. Animais e delineamento experimental.....	55
2.2. Inóculo.....	56
2.3. Inoculação dos animais.....	56
2.4. Avaliação clínica e coleta de amostras.....	57
2.5. Extração de DNA e qPCR.....	57
2.6. Necropsia.....	57
2.7. Avaliação macroscópica.....	58
2.8. Histopatologia.....	58
2.9. Hibridização fluorescente in situ (FISH)	58
2.10. Isolamento bacteriano.....	58
2.11. Análise estatística.....	58
3. Resultados.....	59
3.1. Avaliação clínica.....	59
3.2. Alterações anatomopatológicas.....	61
3.2.1. Lesões macroscópicas.....	61

3.2.2. Lesões microscópicas.....	62
3.2.3. Hibridização fluorescente in situ.....	63
3.3. qPCR.....	63
3.4. Isolamento bacteriano.....	64
4. Discussão.....	64
5. Referências bibliográficas	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

LISTA DE TABELAS

- Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Diferenciação das espécies de *Brachyspira* que infectam suínos pelos padrões de hemólise em ágar tripticase de soja (TSA) suplementado com sangue, reações bioquímicas e utilização de açúcares (Adaptado de Hampson, 2012b e Chander et al., 2012) 17

Tabela 2. Genes alvo, oligonucleotídeos e tamanhos aproximados dos produtos da reação de PCR em pares de bases (pb) a serem utilizados para a técnica de MLST para estirpes de *Brachyspira hyodysenteriae* (La et al., 2009) 26

- Capítulo 1

Tabela 1. Origem, período, granja, classificação dos alelos e tipos de sequências (ST) de amostras de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos submetidas à técnica de tipificação de sequência multilocus 42

- Capítulo 2

Tabela 1. Escore fecal, qPCR, isolamento bacteriano, lesões macroscópicas, escore de lesões microscópicas e hibridização *in situ* fluorescente de leitões experimentalmente infectados com cepas virulentas e atípicas de *Brachyspira hyodysenteriae* 59

Tabela 2. Sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas de disenteria suína após inoculação de *Brachyspira hyodysenteriae* em suínos 61

LISTA DE FIGURAS

- Capítulo 1

Figura 1. Dendrograma baseados em sequências de sete genes *housekeeping adh, alp, est, gdh, glpK, pgm* e *thi* concatenados de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil, construído a partir de matrizes de distância individuais combinadas, divididas em nove tipos de sequências com respectivos períodos e regiões brasileiras de isolamento. RS – Rio Grande do Sul, SC – Santa Catarina, MG – Minas Gerais, SP – São Paulo e MT – Mato Grosso 43

Figura 2. Complexos clonais (CC) e *singletons* obtidos pelo eBURST usando sequências de nucleotídeos de sete *locus* gênicos de amostras de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos de rebanhos brasileiros. Os nomes atribuídos aos CCs estão adjacente a cada grupo 44

Figura suplementar 1. Dendrograma baseados em sequências de sete genes *housekeeping adh, alp, est, gdh, glpK, pgm* e *thi* concatenados de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil e amostras globais do banco de dados global (www.pubmlst.org/brachyspira) 51

- Capítulo 2

Figura 1. Lesões macroscópicas no cólon espiral. (a,b) Cepa virulenta, muco luminal excessivo, exsudato fibrinonecrótico e hemorragia de mucosa difusa acentuada; (c) Cepa atípica, muco luminal e hemorragia de mucosa multifocal moderada; (d) Controle negativo, sem lesões 62

Figura 2. Lesões microscópicas no cólon de suínos inoculados com *Brachyspira hyodysenteriae*. (a) H&E – Controle negativo, sem lesões; (b) H&E – Controle positivo, congestão vascular, necrose e desprendimento do epitélio, e infiltrado inflamatório neutrofílico acentuado; (c) H&E – Cepa atípica, congestão, necrose e desprendimento do epitélio, infiltrado inflamatório moderado; (d) FISH – Cepa atípica, marcação de espiroquetas adjacentes e no interior de enterócitos (seta). H&E: coloração de hematoxilina e eosina; FISH: Hibridização fluorescente *in situ* 63

LISTA DE ABREVIATURAS

Adh – álcool desidrogenase
Alp – Fosfatase alcalina
C – Celsius
CC – Complexo clonal
DS – Disenteria Suína
Est – esterase
FISH – *Fluorescent in situ hybridization*
Gdh – Glutamato desidrogenase
Glpk – Glucose quinase
ID – Índice discriminatório
L – Litro
LOS – Lipooligossacarídeo
LPS – Lipopolissacarídeo
Mg – miligrama
MG – Minas Gerais
min – minutos
ml – mililitro
µl – microlitro
MLEE – *Multilocus enzyme electrophoresis*
MLST – *Multilocus Sequence Typing*
MLVA – *Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*
mM – micromolar
MT – Mato Grosso
N – número
NST – Novo tipo de sequência
Pb – pares de bases
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PFGE – *Pulsed-field Gel Electrophoresis*
Pgm – Fosfoglucomutase
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*
REA – *Restriction endonuclease analysis*
RFLP – *Restriction Fragment Polymorphism*
RS – Rio Grande do Sul.
SC – Santa Catarina
seg – segundos
SP – São Paulo
ST – Tipo de sequência
Thi – acetil-coA acetiltransferase
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFC – Unidade formadora de colônia
UPLs – Unidades de produção de leitões

RESUMO

Esta tese foi dividida em dois estudos. Primeiro objetivou-se a tipificação e avaliação molecular de cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil. Foi aplicada a técnica de tipagem de sequências multilocus (MLST) de sete genes housekeeping em 46 isolados obtidos dos surtos de disenteria suína que ocorreram entre 2011 a 2015 nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Santa Catarina e isolados históricos da década de 90 de granjas do Rio Grande do Sul. Foi detectado um perfil nacional independente das sequências globais depositadas no banco de dados de *Brachyspira* spp. Na análise entre as amostras brasileiras, foi constatada relação epidemiológica molecular intra-granja, entre granjas e entre os estados. O segundo projeto teve como objetivo, em experimento in vivo em suínos, avaliar a patogenicidade, características clínicas e moleculares de uma cepa de *B. hyodysenteriae* isolada de uma granja sem sinais clínicos de disenteria suína comparada com outra cepa isolada de animal com sinal clínico da doença. Nesta avaliação foram observadas diferenças significativas entre os grupos, considerando o início dos sinais clínicos, número de animais afetados e severidade das lesões macroscópicas e microscópicas.

Palavras-Chave: Epidemiologia, diarreia, *B. hyodysenteriae* atípica, patogênese.

ABSTRACT

This thesis comprised the results of two studies. First, molecular typing and epidemiological evaluation of strains of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from swine in Brazil were performed. Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis of seven housekeeping genes was performed in 46 Brazilian *B. hyodysenteriae* isolates obtained from pigs in farms during outbreaks of swine dysentery. Bacterial isolation was obtained between 2011 to 2015 in cases originated from the states of Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul and Santa Catarina, and historical 1990s isolates from farms in the state Rio Grande do Sul. An independent MLST Brazilian MLST profile was observed compared with sequences deposited in the global *Brachyspira* spp database. Among the Brazilian strains, molecular relationship was observed in intra-farm profiles, among farms and among states. The second project used an *in vivo* challenge trial in pigs to evaluate the pathogenicity, clinical and molecular characteristics of a *B. hyodysenteriae* strain isolated from a pig with no clinical signs of swine dysentery, and a strain obtained from an animal with typical clinical signs of the disease. Significant differences were observed between groups, regarding onset of clinical signs, proportion of clinically affected animals and severity of gross and microscopic lesions.

Key-words: Epidemiology, diarrhea, atypical *B. hyodysenteriae*, pathogenesis.

INTRODUÇÃO

Doenças do trato gastrointestinal que afetam os suínos entre as fases neonatais e terminação continuam sendo um dos maiores fatores que limitam a eficiência e rentabilidade da produção de suínos em todo o mundo (Thomson & Friendship, 2012).

A disenteria suína, causada pela *B. hyodysenteriae*, está entre os principais agentes causadores de diarreia em suínos de recria e terminação. Possui distribuição mundial, ocorrendo nas regiões com maior densidade de sistemas de produção (Hampson, 2012). A doença é caracterizada por diarreia muco-hemorrágica, ocasionalmente com fibrina, associada à anorexia e ocorrência de mortalidades em poucos dias após o início dos sinais clínicos em animais não tratados (Guedes, 2005).

Informações epidemiológicas são importantes para entender aspectos relacionados à distribuição e transmissão das doenças. Neste sentido, estudos moleculares têm sido empregados por apresentar maior poder discriminatório entre diferentes amostras e facilidade de acesso para análise de dados. Apesar das informações para o gênero *Brachyspira* serem limitadas a nível global, das diversas regiões produtoras de suínos, resultados importantes têm sido gerados para esclarecer a dinâmica da infecção.

Há descrições isoladas de cepas de *B. hyodysenteriae* de baixa patogenicidade que tem capacidade de colonização, porém não induzem doença clínica. Recentemente, têm sido relatados isolados de *B. hyodysenteriae* obtidos de granjas sem quadro clínico de disenteria suína (La et al., 2016). Porém, estudos são necessários para avaliar a patogenicidade dessas cepas, principalmente em experimentos *in vivo*.

Este é o primeiro trabalho brasileiro avaliando aspectos epidemiológicos de *B. hyodysenteriae* isoladas de suínos. Durante os surtos que ocorreram no Brasil, foi obtida uma amostra de *B. hyodysenteriae* de um rebanho sem sinais clínicos da doença, sendo então realizada inoculação experimental em suínos com esta cepa, comparado com um isolado obtido de um animal com sinal de disenteria suína.

OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram avaliar a diversidade genética e relações epidemiológicas entre *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil e determinar em experimento *in vivo* a patogenicidade de uma cepa de *B. hyodysenteriae* isolada de um rebanho sem sinais clínicos de disenteria suína.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Brachyspira spp.

O gênero *Brachyspira* é composto por espiroquetas intestinais anaeróbicas que colonizam o intestino grosso. Em suínos, as principais espécies patogênicas são *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *B. hampsonii* (Stanton et al., 1997; Taylor & Trott, 1997; Hampson et al., 2010; Chander et al., 2012). Além das espécies anteriormente citadas, podem ser encontradas no trato gastrointestinal dos animais e seres humanos as espécies *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, *B. suanatina*, *B. alvinipulli* e *B. aalborgi*. Com exceção das duas últimas, as demais podem ser encontradas no intestino de suínos (Stanton, 2006; Rasback et al., 2007). Na tabela 1, são apresentadas características de hemólise, reações bioquímicas e utilização de açúcares das principais *Brachyspira* spp. encontradas em suínos.

Tabela 1. Diferenciação das espécies de *Brachyspira* que infectam suínos pelos padrões de hemólise em ágar tripticase de soja (TSA) suplementado com sangue, reações bioquímicas e utilização de açúcares (Adaptado de Hampson, 2012b e Chander et al., 2012).

Espécie	Hemólise	Indol	Hipurato	API-ZYM ^d	D-ribose
<i>B. hyodysenteriae</i>	Forte	+ ^a	-	1	-
<i>B. intermedia</i>	Fraca	+	-	1	-
<i>B. innocens</i>	Fraca	-	-	2	-
<i>B. murdochii</i>	Fraca	-	-	3	-
<i>B. pilosicoli</i>	Fraca	+ ^a	+ ^c	4	+
<i>B. suanatina</i>	Forte	+ ^b	-	5	-
<i>B. hampsonii</i>	Forte	-	-	3	-

^a São descritos isolados Indol-negativas de *B. hyodysenteriae* e estirpes indol positivas de *B. pilosicoli*.

^b Indol-positiva fraca.

^c São descritos isolados de *B. pilosicoli* Hipurato-negativas.

^d Reações no teste comercial API-ZYM:

1, alfa-glucosidase positiva, alfa-galactosidase negativa.

2, alfa-glucosidase positiva ou negativa, alfa-galactosidase positiva.

3, alfa-glucosidase negativa, alfa-galactosidase negativa.

4, reações variáveis, incluindo reações positivas para ambas as enzimas, beta-glucosidase negativa.

5, alfa-galactosidase negativa, beta-glucosidase positiva.

+, Reação positiva; -, reação negativa.

B. hyodysenteriae é uma bactéria Gram-negativa, móvel, morfologia espiralada, 6-8,5 µm de comprimento, 320-380 nm de diâmetro, anaeróbia estrita, com grau de tolerância ao oxigênio de até 1%, beta hemolítica em ágar sangue, produção de indol positiva e hidrólise do hipurato negativa (Fellstrom et al., 1997; Hampson et al., 2010).

B. hyodysenteriae é o agente etiológico da disenteria suína (DS), caracterizada por diarreia muco-hemorrágica grave em suínos nas fases de crescimento e terminação (Hampson et al., 2010). *B. pilosicoli* coloniza o intestino de diversas espécies, como suínos, aves, caninos e humanos. Em suínos é o agente etiológico da colite espiroquetal, caracterizada por atraso no crescimento, colite moderada e diarreia, principalmente em suínos da fase de crescimento (Hampson et al., 2010). *B. hampsonii* foi descrita mais recentemente, com características clínico-patológicas semelhantes à DS (Chander et al., 2012). *B. suanatina* foi identificada na Dinamarca e Suécia entre os anos de 2003 e 2005, com quadro clínico-patológico idêntico ao da *B. hyodysenteriae* (Råsbäck et al., 2007). *B. intermedia*, *B. innocens* e *B. murdochii* não foram associadas a quadros clínico-patológicos de diarreia em suínos (Hampson, 2012b).

Infecções experimentais para avaliação da doença

O desenvolvimento de modelos experimentais torna-se importante na medida em que estes auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais (Ferreira et al., 2005). Na ciência médica permitem o melhor conhecimento da fisiologia, etiopatogenia das doenças, ação de medicamentos e resposta imune (Berberov et al., 2004; Bhandari et al., 2008; Capozzalo et al., 2012; Delisle et al., 2012). Nesse sentido, o modelo experimental deve ser, funcionalmente, o mais semelhante possível do evento natural (Hochman et al., 2004).

Em suínos, infecções experimentais têm sido realizadas principalmente para determinar quais as melhores condições para avaliar a presença de fatores de virulência na patogênese das doenças (Berberov et al., 2004), genes de virulência na patogenicidade de cepas (Moxley et al., 1998; Zhou et al., 2013), reproduzir a doença em experimentos *in vivo* (Nabuurs, 1998; Jacobson et al., 2004; Rossi et al., 2012; Arruda et al., 2013), avaliação da eficácia de vacinas (Li et al., 2009; Delisle et al., 2012; Nogueira et al., 2013), avaliar parâmetros de transmissão do agente (Geenen, 2004) e uso de diversos princípios ativos e aditivos para controle e prevenção de enfermidades (Bhandari et al., 2008; Bruins et al., 2011; Capozzalo et al., 2012).

A DS clínica foi reproduzida experimentalmente pela primeira vez na década de 1920, porém o agente etiológico da doença não foi definido. Acreditava-se que a enfermidade estivesse relacionada à infecção por *Campylobacter coli* (Whiting et al., 1921). Somente em 1971 a etiologia foi elucidada, quando animais foram inoculados com *B. hyodysenteriae*, e o postulado de Koch foi preenchido (Taylor et al., 1971). Sendo o microrganismo primeiramente denominado *Treponema hyodysenteriae* (Harris et al., 1972), após *Serpula* (Stanton et al., 1991) e *Serpulina* (Stanton et al., 1992). A classificação atual como *Brachyspira* foi baseada em métodos moleculares realizados por Ochiachi et al. (1997).

Como a patogênese da DS ainda não é totalmente elucidada e devido à natureza multifatorial, tem sido difícil determinar modelos de infecção experimental para reproduzir a

doença (Jacobson et al., 2004). Os principais fatores relatados na indução da DS em infecções experimentais incluem, a concentração da espiroqueta no inóculo, ação de outros microrganismos intestinais e composição da dieta.

Embora a dose mínima infectante em infecções naturais seja desconhecida, e os modelos experimentais e protocolos de inoculação variem, um inóculo contendo pelo menos 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) é frequentemente utilizado para infecção e desencadeamento dos sinais clínicos e lesões da DS (Kinyon et al., 1977; Burrough et al., 2012a; Rubin et al., 2013; Costa et al., 2014b). A fase de crescimento da cultura também pode influenciar na infecção, sendo o inóculo na fase *log* o mais infeccioso (Hampson et al., 2012b).

A colonização da espiroqueta depende de outras espécies de bactérias anaeróbias no intestino grosso, as quais contribuem para formação de lesões e desencadeamento da doença. O envolvimento de outros microrganismos na patogênese foi constatado quando a inoculação somente da *B. hyodysenteriae* em animais gnotobióticos não reproduziu sinais clínicos (Meyer et al., 1974a; Harris et al., 1978), diferente da utilização de raspado de mucosa intestinal de animais clinicamente afetados pela DS como inóculo, que comprovaram a necessidade de outras espécies bacterianas na patogênese e severidade da doença (Meyer et al., 1974b; Mølbak et al., 2007). Estudos mais recentes têm avaliado o microbioma intestinal, e são observados que a microbiota fecal de suínos que desenvolvem DS após inoculação com *B. hamptonii*, quando comparados animais não inoculados e inoculados que não desenvolvem doença, é significativamente alterada com a redução da densidade bacteriana e um aumento relativo de Firmicutes em relação aos Bacteroidetes (Costa et al., 2014a).

Relacionado à composição da dieta, Jacobson et al. (2004), avaliando diferentes fatores na indução de DS, constataram que níveis elevados de proteína de soja na ração e o alojamento de animais em grupos influenciaram a ocorrência de doença clínica em relação aos animais alojados individualmente. Este fato ocorre, pois, alguns substratos das dietas podem aumentar a fermentação microbiana e produção de ácidos graxos voláteis no intestino grosso, o que predispõe a disenteria (Siba et al., 1996).

Modelos experimentais com *Brachyspira* spp. *in vivo* têm sido realizados em ratos (Hutto et al., 1998; Burrough et al., 2012a) e em maior frequência em suínos (Achacha et al., 1996; Rubin et al., 2013; Costa et al., 2014b; Šperling et al., 2014; Wilberts et al., 2014a). Os estudos têm relatado avaliações clínicas e patológicas de cepas virulentas (Wilcock & Olander, 1979; Hutto et al., 1998), cepas atípicas (Achacha et al., 1996; Burrough et al., 2012), análises clínicas e patológicas de novas espécies (Rubin et al., 2013; Costa et al., 2014b; Wilberts et al., 2014a), avaliação de princípios ativos para tratamento da doença (Šperling et al., 2014), além de fatores relacionados no desencadeamento da enfermidade (Wilberts et al., 2014b).

Disenteria Suína

A DS está entre as principais causas de diarreia em suínos de recria e terminação (Taylor & Alexander, 1971; Taylor et al., 1980). Além da *B. hyodysenteriae*, nos últimos anos, duas espécies do gênero *Brachyspira* foram descritas e caracterizadas também como agentes primários de DS.

A primeira caracterização foi realizada com *B. suanatina*, isolada de suínos e patos selvagens, com características fenotípicas e clínicas semelhantes as observadas pela *B. hyodysenteriae*, porém geneticamente distinta. Sendo essa espécie com menor distribuição geográfica, com relatos até o momento, na Suécia e Dinamarca (Råsbäck et al., 2007; Mushtaq et al., 2015).

Em 2012 a espiroqueta denominada *B. hampsonii*, com características de forte hemólise em ágar sangue e alta patogenicidade, foi inicialmente descrita na América do Norte e tem sido detectada em surtos de doença clínica semelhante à DS em rebanhos dos Estados Unidos da América, Canadá, Bélgica, Alemanha e República Checa (Chander et al., 2012; Harding et al., 2012; Mahu et al., 2014; Rohde et al., 2014). Inoculações experimentais em suínos com esta nova espécie foram realizadas e sinais clínicos e lesões foram idênticos aos causados pela *B. hyodysenteriae* (Rubin et al., 2013; Costa et al., 2014b). Inicialmente, essa espécie foi dividida em *clades* I e II (Chander et al., 2012). Entretanto, em análises genéticas mais recentes, utilizando a tipagem do genoma desta espécie foi realizada a classificação em genovares I, II e III (Mirajkar et al., 2016).

Aspectos epidemiológicos

Suínos de todas as idades são susceptíveis a infecção por *B. hyodysenteriae*, sendo mais comum em animais de recria e terminação (Hampson et al., 2006). Nos surtos de DS, a morbidade em leitões desmamados pode atingir 90% e a mortalidade pode ser de 30% (Hampson, 2012b).

B. hyodysenteriae coloniza naturalmente suínos (incluindo javalis) e, ocasionalmente, algumas espécies de aves. Em granjas infectadas, tem sido detectada de camundongos, ratos, cães e aves (Hampson, 2012b). *B. hampsonii* e *B. suanatina* foram isoladas de suínos e também de aves selvagens. Esta última, de extrema importância na disseminação por vetores biológicos a longas distâncias, como observado em cepas de *B. hampsonii* obtidas em diferentes continentes e com homologia comprovada por testes moleculares nas amostras isoladas de suínos e aves migratórias (Råsbäck et al., 2007; Martínez-Lobo et al., 2013; Mahu et al., 2014; Mushtaq et al., 2015; Mirajkar et al., 2015; Aller-Morán et al., 2016).

A doença possui distribuição mundial, ocorrendo nas principais regiões criadoras de suínos (Muniappa et al., 1997; Boye et al., 1998; Thomson et al., 1998; Calderaro et al., 2001). Mudanças de manejo nos sistemas de produção, com granjas de alto status sanitário, produção em sítios separados, desmame precoce e medidas de biossegurança fizeram com que nos últimos 20 anos a doença tenha ficado ausente nos rebanhos suínos Norte-americanos. Porém, desde 2008, vários casos foram relatados nos Estados Unidos, Canadá (Chander et al., 2012) e nos continentes europeu (Dors et al., 2015; Löbert et al., 2016) e asiático (Kajiwara et al., 2016).

No Brasil desde 2010 foram relatados pelo menos dezoito surtos de DS, fato preocupante e de grande importância, dado o histórico anterior ligado apenas a casos esporádicos de baixo impacto econômico. Foram diagnosticados, entre o início de 2010 e julho

de 2012, surtos isolados nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, sem nenhuma ligação epidemiológica direta entre eles (Daniel et al., 2013a).

Em agosto de 2012, ocorreram introdução da doença em grandes empresas integradoras do oeste Catarinense com disseminação da doença por toda cadeia de produção dessas empresas, em diferentes estados (Daniel et al., 2013b). Importante mencionar as diferenças epidemiológicas dos surtos em Santa Catarina e os demais. Os relatos no Paraná, Mato Grosso, São Paulo e Minas Gerais foram detectados isoladamente em 2010 e 2011. Entretanto, os surtos de agosto de 2012 parecem estar relacionados à infecção de uma granja multiplicadora terceirizada de Santa Catarina, que forneceu fêmeas de reposição clinicamente sadias, mas infectadas, para várias Unidades de Produção de Leitões (UPLs) de diferentes empresas de integração (Guedes e Daniel, 2013). Grandes regiões produtoras de suínos do país, particularmente da região sul, apresentaram casos confirmados de DS. Nos anos subsequentes, a maioria dessas empresas integradoras realizaram programas de erradicação por despovoamento parcial e medicação, quase eliminando a positividade nos rebanhos de reprodução. Entretanto, alguns focos no oeste catarinense e paranaense, em São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul permanecem, principalmente em granjas de ciclo completo ou unidades de recria e terminação (informação pessoal, Roberto Guedes).

Patogênese

Apesar da patogênese complexa e pouco conhecida da DS, principalmente pelo fato da infecção ser multifatorial (Guedes & Barcellos, 2012a), fatores de virulência que têm sido descritos para *B. hyodysenteriae* incluem, quimiotaxia, motilidade, aderência, produção de hemolisina e atividade endotóxica de lipooligossacarídeo (LOS) (Hampson et al., 2010).

A infecção ocorre pela ingestão de material contaminado com a espiroqueta, principalmente fezes de suínos doentes, e a presença de muco nas fezes disentéricas protege o agente da acidez estomacal (Guedes & Barcellos, 2012a). A bactéria apresenta quimiotaxia por mucina (Milner & Sellwood, 1994) e na análise da sequência do genoma bacteriano foram identificados diversos genes associados com quimiotaxia e motilidade (Bellgard et al., 2009). Sendo assim, uma vez estabelecida, a bactéria coloniza o ceco e cólon, na base das criptas de Liberkuhn, invadindo células caliciformes onde há multiplicação e estímulo de produção de muco, os quais recobrem o epitélio e estão presentes nas fezes. A motilidade em "saca-rolhas" é proporcionada através da atividade dos flagelos periplasmáticos (Hampson et al., 2010) e a importância da motilidade foi demonstrada pelo fato de que mutantes dos genes *flaA* e *flaB* sintetizados experimentalmente, reduziram a mobilidade e a colonização do microrganismo (Kennedy et al., 1997).

A atividade da NADH oxidase é importante na colonização da superfície da mucosa, uma vez que a enzima consome oxigênio, reduzindo o potencial de toxicidade do mesmo (Hampson et al., 2010). Foi demonstrado que mutantes NADH oxidase negativos apresentaram reduzida capacidade de colonizar os suínos (Stanton et al., 1999).

Além disso, a produção de hemolisinas é considerada um dos principais fatores de virulência (Hsu et al., 2001) e com frequência a característica laboratorial fenotípica é empregada para determinar o potencial patogênico de isolados (Burrough et al., 2012b). Bellgard et al. (2009) no sequenciamento do genoma da bactéria, identificaram sete potenciais genes de hemolisinas, incluindo quatro já descritos anteriormente. A confirmação da ação de alguns genes na ocorrência da doença é relatada em experimentos *in vivo* com camundongos e suínos (ter Huurne et al., 1992; Hyatt et al., 1994). Porém, apesar dos estudos acima descritos, a atividade patogênica de cada hemolisina ainda não foi elucidada (Burrough, 2016).

O agente pode ser visualizado ocasionalmente no interior de células epiteliais e na lâmina própria nas áreas afetadas. Acredita-se que as lesões, além da ação das hemolisinas, sejam produzidas por LOS presentes na superfície bacteriana, que possuem propriedades semelhantes aos lipopolissacarídeos (LPS) de superfície de outras bactérias Gram-negativas (Guedes & Barcellos, 2012a; Hampson, 2012). Em animais infectados há o aumento no número de células TCD4+ na mucosa, que também podem contribuir para o desenvolvimento da lesão por um processo imuno-patogênico (Hontecillas et al., 2005). Essas substâncias tóxicas aparentemente rompem as junções celulares (Guedes & Barcellos, 2012a), formando lesões no epitélio intestinal predispondo a colonização por outras bactérias ou protozoários, como *Balantidium coli*, com a formação de extensas placas fibrinosas multifocais ou multifocais a coalescentes nos casos crônicos (Hampson et al., 2010; Hampson, 2012).

Com a evolução da doença, há aumento do muco produzido, associado ao processo inflamatório com infiltração leucocitária e graves alterações circulatórias locais como, intensa dilatação dos capilares, edema da mucosa e, por último, hemorragia e necrose superficial na mucosa com formação de fibrina (Guedes & Barcellos, 2012a). Como consequência das lesões, há falha na absorção de água e eletrólitos, contribuindo para a ocorrência de diarreia (Hampson et al., 2010). Os focos de inflamação podem persistir por 40 a 50 dias após a recuperação clínica e a mucosa pode permanecer infectada (Guedes & Barcellos, 2012a). Espiroquetas são encontradas nas fezes entre um a quatro dias antes do início da diarreia (Kinyon et al., 1977), concomitante a alteração na microbiota do cólon, de predomínio de bactérias Gram-negativas em relação à Gram-positivas (Hampson, 2012).

A diarreia na DS é caracterizada como má absorção devido às lesões na mucosa intestinal que reduzem a absorção de eletrólitos e água; e também do tipo efusiva devido à inflamação da lâmina própria e linfangectasia (dilatação de vasos linfáticos), aumentando a permeabilidade vascular, edema e perda de proteínas plasmáticas entéricas. Diarreia associada aos dois tipos comumente ocorrem em conjunto, quando há necrose severa do epitélio da mucosa e dano vascular, caracterizadas por efusões de fluidos a partir de tecidos e sangue, identificados como fibrina e hemorragia na luz intestinal (Zlotowski et al., 2008).

Existem descrições isoladas de cepas de *B. hyodysenteriae* de baixa patogenicidade que tem capacidade de colonização, porém não induzem doença clínica (Lysons et al., 1982; Lee et al., 1993; Thomson et al., 2001). Trabalhos têm sido realizados com a finalidade de esclarecer a patogênese dessas cepas, incluindo avaliações dos fatores de virulência e apresentação clínica (Achacha et al., 1996; Burrough et al., 2012; Mahu et al., 2016). No trabalho de Daniel (2014),

há o primeiro relato brasileiro dessas cepas, que apresentaram características de forte beta hemólise em ágar sangue, PCR positivas para *B. hyodysenteriae* e tendo sido isoladas de animais sem lesões macroscópicas aparentes, provenientes de rebanho livre de qualquer apresentação clínica sugestiva de DS. À avaliação microscópica foi identificada apenas necrose superficial focal discreta associada a hiperplasia de células caliciformes discreta.

Aspectos clínicos e patológicos

A DS é caracterizada por diarreia muco-hemorrágica, ocasionalmente com fibrina, associada à anorexia e morte em poucos dias após o início dos sinais clínicos em animais não tratados (Guedes, 2005). Em experimentos *in vivo*, os inícios dos sinais clínicos são observados 7 a 10 dias após a inoculação, com morbidade de 90% ou mais após três semanas de avaliação (Wilcock et al., 1979; Rubin et al., 2013). O período de incubação da DS varia de 2 dias a 3 meses, mas a doença ocorre geralmente dentro de 10 a 14 dias em animais naturalmente infectados (Hampson, 2012b). Com o progresso da doença, os animais podem apresentar desidratação, acidose metabólica e hipercalemia, com mortalidade nos casos severos (Hampson, 2012b).

As lesões macroscópicas e microscópicas da DS estão limitadas ao intestino grosso, com linha de demarcação quase sempre evidente na junção íleo-cecal. À macroscopia, são observadas enterite muco-hemorrágica ou fibrino-hemorrágica e focos de necrose superficial, formando uma pseudomembrana. Na fase aguda da doença são observadas hiperemia acentuada da mucosa, edema de mesocólon, linfonodos mesentéricos reativos e aumentados. Em lesões crônicas geralmente é observado exsudato fibrinoso superficial associado à necrose acentuada (Hampson et al., 2006). O conteúdo intestinal apresenta-se variando de amolecido a líquido, avermelhado e com grande quantidade de exsudato e muco (Jacobson et al., 2004; Hampson et al., 2006).

Lesões microscópicas incluem espessamento de mucosa e submucosa devido à congestão vascular e extravasamento de fluídos, hiperplasia de células caliciformes, perda de coesão entre os enterócitos do cólon, hemorragia, infiltrado inflamatório neutrofílico acentuado na lâmina própria, associado à necrose e desprendimento do epitélio. Espiroquetas podem ser observadas ligadas à superfície do lúmen e no interior das células epiteliais rompidas (Hampson, 2012b).

Diagnóstico

Dados clínicos, alterações macroscópicas e achados histológicos são importantes para o estabelecimento do diagnóstico das doenças causadas por *Brachyspira* spp. (Barcellos et al., 2000). O isolamento, quando comparado com outras técnicas de detecção, é considerado padrão ouro no diagnóstico de *B. hyodysenteriae* (Råsbäck et al., 2006). Porém, as bactérias do gênero *Brachyspira* possuem crescimento fastidioso à 37° – 42°C, necessitam de meios seletivos e incubação em anaerobiose (Lemcke et al., 1979). Em geral, as colônias podem ser visualizadas a

partir de 72 horas, mas em determinados casos, pode ser necessária a incubação por até 10 dias em meios seletivos (Duhamel & Joens, 1994).

A evidenciação de *Brachyspira* spp. em corte histológico pode ser realizada por coloração pela prata, imuno-histoquímica e/ou hibridização *in situ* fluorescente (FISH - *Fluorescent in situ hybridization*). A coloração pela prata é uma técnica que permite a visualização da morfologia da bactéria indicando tratar-se de uma espiroqueta. A imuno-histoquímica permite a detecção do gênero *Brachyspira*, sem diferenciação entre espécies patogênicas ou não patogênicas (Paulovich et al., 2004; Hampson et al., 2006). A técnica FISH é uma alternativa efetiva para detecção específica e definitiva de agentes infecciosos em cortes histológicos. Nesta metodologia, sondas específicas marcadas com fluorocromo são utilizadas para identificação de diferentes espécies de *Brachyspira* (Jensen et al., 1998 e 2000).

Técnicas baseadas na análise do ácido nucléico facilitaram e dinamizaram o diagnóstico das infecções por *Brachyspira* spp., principalmente no diagnóstico *ante mortem*. Reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para segmentos dos genes do RNA ribossomal 16S ou 23S (16S rRNA e 23S rRNA) e NAD oxidase (*Nox*) vem sendo amplamente utilizada no diagnóstico da DS (Elder et al., 1994; La et al., 2006; Phillips et al., 2009). Stanton & Sellwood (1999), sequenciando o gene *Nox* de cepas de *B. hyodysenteriae* de diferentes hospedeiros e de diferentes localizações geográficas, constataram que todas as sequências eram idênticas, sendo o gene altamente conservado dentro da espécie. De acordo com estudo de Barth et al. (2012), devido à grande variabilidade genética entre as cepas, o único alvo molecular confiável para diagnóstico em PCR seria o gene *Nox* para a *B. hyodysenteriae*. Já a espectrometria de massa por tempo de voo com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) é descrita como uma ferramenta útil para a identificação de várias espécies bacterianas, incluindo *Brachyspira* spp. (Calderaro et al., 2013).

A identificação e classificação de rotina do agente é normalmente baseada em cultivo e testes bioquímicos, muitas vezes confirmados por testes moleculares, como a PCR, definindo a espécie dentro do gênero *Brachyspira* (Lee et al., 1993; Fellstrom et al., 1997). Essas técnicas formam uma combinação confiável para diagnosticar animais com infecções clínicas e subclínicas (Råsbäck et al., 2007; La et al., 2016a, b).

Testes sorológicos foram realizados para identificação de rebanhos com DS, porém não há kits comerciais que possam ser empregados. Baseado nos lipooligossacarídeos (LOS), *B. hyodysenteriae* é dividida em nove sorotipos distribuídos amplamente em diversas regiões geográficas. A variação genética e as diferenças significativas nas proteínas antigênicas são limitações significativas para o desenvolvimento de um teste sorológico globalmente aplicável (Herbst et al., 2017). Estudos recentes usando proteínas recombinantes têm sido realizados para desenvolver um teste sorológico que seria uma ferramenta importante para detectar rebanhos positivos de *B. hyodysenteriae* sem sinais clínicos de DS (Song et al., 2015; Hampson et al., 2016).

Tipificação

A identificação e a caracterização de microrganismos patogênicos são essenciais para controle e entendimento da dinâmica das doenças infecciosas (MacCannell, 2013). A avaliação das relações entre os isolados por ancestralidade é importante para determinar a origem, possíveis rotas de transmissão, confirmar ou descartar surtos, avaliar infecção cruzada entre patógenos associados, reconhecer cepas particularmente virulentas e avaliar a eficácia de medidas de controle (Tenover et al., 1997; MacCannell, 2013).

As técnicas moleculares de diagnóstico são consideradas testes rápidos, menos trabalhosos, mais sensíveis e específicos em comparação com métodos convencionais, além de permitir a avaliação da diversidade genética dos microrganismos (Ranjbar et al., 2014). Os métodos de genotipagem bacteriana podem ser classificados em três categorias principais: baseado nos padrões de bandas de DNA; pelo sequenciamento de DNA; e baseados em hibridização do DNA (Li et al., 2009a).

Para o gênero *Brachyspira*, técnicas utilizadas para tipificação incluem métodos comparativos de padrões de bandas e sequenciamento do DNA. A caracterização com métodos baseados em padrão de bandas de DNA é realizada com a análise de bandas/fragmentos de DNA obtidos através da digestão com enzimas de restrição e/ou amplificação do DNA (Li et al., 2009a). Para *B. hyodysenteriae* já foram empregadas a análise com endonuclease de restrição (REA – *Restriction endonuclease analysis*), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*), eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE – *Pulsed-field Gel Electrophoresis*), polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Polymorphism*) e eletroforese enzimática multilocus (MLEE – *Multilocus enzyme electrophoresis*) (Combs et al., 1992; Lee et al., 1993; Harel et al., 1994; Dugourd et al., 1996; Trott et al., 1996; Fisher et al., 1997; Hidalgo et al., 2010).

Métodos baseados no sequenciamento do DNA permitem o estudo de exclusão, inserção e eventos de duplicação que ocorrem amplamente em genomas bacterianos e são considerados como mecanismos evolutivos importantes, sendo possível identificar polimorfismos de base única, deleções ou inserções na sequência e genes sob seleção positiva (Li et al., 2009). São descritas na caracterização de *Brachyspira* spp. a análise em *multilocus* das repetições em *tandem* de número variável (MLVA – *Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*), tipagem de sequências de múltiplos *locus* gênicos (MLST – *Multilocus Sequence Typing*) e sequenciamento do genoma completo (Råsbäck et al., 2007; Belgard et al., 2009; La et al., 2009; Hidalgo et al., 2010; Phillips et al., 2010; Osorio et al., 2012; Neo et al., 2013; Mirajkar & Gebhart, 2014).

As vantagens do sequenciamento em relação aos métodos baseados em padrões de bandas de DNA são a elevada reprodutibilidade e repetibilidade (Pérez-Losada et al., 2013; Foxman et al., 2005). Técnicas baseadas em padrões de bandas, possuem desvantagens como o tempo e a metodologia trabalhosa, problemas com a resolução e interpretação dos resultados, ausência de análise de imagens em gel normatizados, requerem softwares especializados, procedimentos e normas para uma análise consistente, com treinamento e controle de qualidade

rigorosos (MacCannell, 2013). Considerando o custo da técnica, interpretação dos resultados e confiabilidade dos dados, atualmente, a técnica de MLST tem sido a metodologia de escolha para análise de ancestralidade para *Brachyspira* spp.

MLST consiste em uma técnica para a análise da estrutura da população microbiana e discriminação entre cepas. A técnica baseia-se na variação alélica em sequências de nucleotídeos de múltiplos *locus* de genes *housekeeping* e tem se mostrado eficiente em estudos epidemiológicos globais de numerosos agentes infecciosos (Urwin & Maiden, 2003; Osorio et al., 2012). A análise por MLST tem sido utilizada para identificar isolados com uma relação epidemiológica molecular e isolados com uma história evolutiva intimamente relacionada, apresentando uma identificação mais precisa para alguns dos isolados do que outras técnicas (Feil et al., 2004; Råsbäck et al., 2007).

Desde a padronização para o gênero *Brachyspira*, realizada por Råsbäck et al. (2007), sete genes *housekeeping* (álcool-desidrogenase, *Adh*; fosfatase alcalina, *Alp*; esterase, *Est*; glutamato desidrogenase, *Gdh*; cinase de glicose, *Glp*; fosfoglucomutase, *Pgm* e acetil-CoA-acetiltransferase, *Thi*) foram definidos para análise por esta metodologia (Tabela 2). Esta técnica tem sido usada em estudos epidemiológicos moleculares locais e globais de *Brachyspira* spp. (Råsbäck et al., 2007), incluindo *B. hyodysenteriae* (La et al., 2009; Osorio et al., 2012; Mirajkar & Gebhart, 2014), *B. pilosicoli* (Neo et al., 2013), *B. intermedia* (Phillips et al., 2010), *B. murdochii*, *B. innocens* (Osorio et al., 2013) e *B. hampsonii* (Mirajkar et al., 2015). Além disso, para o gênero *Brachyspira*, diferente das outras técnicas disponíveis para análise molecular, existe um banco de dados *on-line* (www.pubmlst.org/Brachyspira) permitindo a comparação de diversas cepas já caracterizadas. Apresentando o índice discriminatório (ID) de Simpson de 0.974, melhores que PFGE (ID=0.924), REA (ID=0.924), MLEE (ID=0.894) e sorotipificação (ID=0.719) (La et al., 2009).

Tabela 2. Genes alvo, oligonucleotídeos e tamanhos aproximados dos produtos da reação de PCR em pares de bases (pb) a serem utilizados para a técnica de MLST para estirpes de *Brachyspira hyodysenteriae* (La et al., 2009).

Gene	Oligonucleotídeos (5'→3')	Produto (bp)
<i>Adh</i>	ADH-F206: GAAGTTTAGTAAAAGACTTTAAACC	492
	ADH-R757: CTGCTTCAGCAAAAAGTTTCAAC	
<i>Alp</i>	ALP-F354: TCCAGATGAGGCTATACTTC	783–788
	ALP-R1262: TATGCTCTTTTTGCTAATATTG	
<i>Est</i>	EST-F229: GATGCTTCAGGCGGAGTTATG	569–587
	EST-R847: CCACACTCATAGCATAAATACTG	
<i>Gdh</i>	GDH-F514: GGAGTTGGTGCTAGAGAGAT	585–588
	GDH-R1157: ATCTCTAAAGCAGAAGTAGCA	
<i>Glp</i>	GLP-F123: AGGCTGGGTAGAACATAATGC	793–797
	GLP-R1158: TCTTTACTTTGATAAGCAATAGC	
<i>Pgm</i>	PGM-F172: GTTGGTACTAACAGAATGAATA	909–913
	PGM-R1220: CCGTCTTTATCGCGTACATT	
<i>Thi</i>	THI-F163: TGTGTTATACAATCAGCACTTC	810–822
	THI-R1079: GTAGTAAGTATTCTAGCTCCAG	

Adh: álcool-desidrogenase; *Alp*: fosfatase alcalina; *Est*: esterase; *Gdh*: glutamato desidrogenase; *Glp*: cinase de glicose; *Pgm*: fosfoglucomutase e *Thi*: acetil-CoA-acetiltransferase.

Referências Bibliográficas

- ACHACHA, M.; MESSIER, S.; MITTAL, K.R. Development of an experimental model allowing discrimination between virulent and avirulent isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. Can J Vet Res., 60, p.45-49, 1996.
- ALLER-MORÁN, L.M.; MARTÍNEZ-LOBO, F.J.; RUBIO, P.; CARVAJAL, A. Experimental infection of conventional pigs with a '*Brachyspira hampsonii*' isolate recovered from a migrating waterfowl in Spain. Vet J., 214, 10-3, 2016.
- ARRUDA, P.H.; MADSON, D.M.; RAMIREZ, A.; ROWE, E.; LIZER, J.T.; SONGER, J.G. Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. Anaerobe, 22, p.104-110, 2013.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; MATHIESEN, M.; UZEDA, M.; KADER, I.I.T.A.; DUHAMEL, G. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. Vet Rec., 146, p.398-403, 2000.
- BARTH, S.; GÖMMEL, M.; BALJER, G.; HERBST, W. Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. Vet Microbiol., 155 (2-4), p.438-43, 2012.
- BELLEGARD, M.I.; WANCHANTHUEK, P.; LA, T.; RYAN, K.; MOOLHUIJZEN, P.; ALBERTYN, Z.; SHABAN, B.; MOTRO, Y.; DUNN, D.S.; SCHIBECI, D.; HUNTER, A.; BARRERO, R.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. 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.
- BERBEROV, E.M.; ZHOU, Y.; FRANCIS, D.H.; SCOTT, M.A.; KACHMAN, S.D.; MOXLEY, R.A. Relative Importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. Infect Immun., 74, p.3914-3924, 2004.
- BHANDARI, S.K.; XU, B.; NYACHOTI, C.M.; GIESTING, D.W.; KRAUSE, D.O. Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88+ model of piglet diarrhea: Effects on gut microbial ecology. J Anim Sci., 86, p.836-847, 2008.
- BOYE, M.; JENSEN, T.K.; MØLLER, K.; LESER, T.D.; JORSAL, S.E. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA in situ hybridization. Mol Cell Probe., 12, p.323-330, 1998.
- BRUINS, M.J.; VENTE-SPREEUWENBERG, M.A.; SMITS, C.H.; FRENKEN, L.G. Black tea reduces diarrhoea prevalence but decreases growth performance in enterotoxigenic *Escherichia coli*-infected post-weaning piglets. J Anim Physiol Anim Nutr., 95, p.388-398, 2011.
- BURROUGH, E.R. Swine Dysentery: Etiopathogenesis and diagnosis of a reemerging disease. Vet. Pathol., 1-10, 2016.

- BURROUGH, E.; STRAIT, E.; KINYON, J.; BOWER, L.; MADSON, D.; SCHWARTZ, K.; FRANA, T.; SONGER, J.G. Comparison of atypical *Brachyspira* spp. clinical isolates and classic strains in a model of swine dysentery. *Vet Microbiol.*, 160, p.387-394, 2012a.
- BURROUGH, E.R.; STRAIT, E.L.; KINYON, J.M.; BOWER, L.P.; MADSON, D.M.; WILBERTS, B.L.; SCHWARTZ, K.J.; FRANA, T.S.; SONGER, J.G. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J Vet Diagn Invest.*, 24(6), p.1025-1034, 2012b.
- CALDERARO, A.; MERIALDI, G.; PERINI, S.; RAGNI, P.; GUÉGAN, R.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. A novel method for isolation of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Vet Microbiol.*, 80, p.47-52, 2001.
- CALDERARO, A.; PICCOLO, G.; MONTECCHINI, S.; BUTTRINI, M.; GORRINI, C.; ROSSI, S.; ARCANGELETTI, M.C.; DE CONTO, F.; MEDICI, M.C.; CHEZZI, C. MALDI-TOF MS analysis of human and animal *Brachyspira* species and benefits of database extension. *J Proteomics.*, 78, p.273-280, 2013.
- CAPOZZALO, M.M.; KIM, J.C.; HTOO, J.K.; DE LANGE, C.F.M.; MULLAN, B.P.; HANSEN, C.F. An increased ratio of dietary tryptophan to lysine improves feed efficiency and elevates plasma tryptophan and kynurenine in the absence of antimicrobials and regardless of infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* in weaned pigs. *J Anim Sci.*, 90, p.191-193, 2012.
- CHANDER, Y.; PRIMUS, A.; OLIVEIRA, S.; GEBHART, C.J. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hampsonii*". *J Vet Diagn Invest.*, 24, p.903-910, 2012.
- COMBS, B.G.; HAMPSON, D.J.; HARDERS, S.J. Typing of Australian isolates of *Treponema hyodysenteriae* by serology and by DNA restriction endonuclease analysis. *Vet Microbiol.*, 31, p.273-285, 1992.
- COSTA, M.O.; CHABAN, B.; HARDING, J.C.; HILL, J.E. Characterization of the fecal microbiota of pigs before and after inoculation with "*Brachyspira hampsonii*". *PLoS One*, 9(8): e106399, 2014a.
- COSTA, M.O.; HILL, J.E.; FERNANDO, C.; LEMIEUX, H.D.; DETMER, S.E.; RUBIN, J.E.; HARDING, J.C. Confirmation that "*Brachyspira hampsonii*" clade I (Canadian strain 30599) causes mucohemorrhagic diarrhea and colitis in experimentally infected pigs. *BMC Vet Res.*, 10:129, 2014b.
- DANIEL, A.G.S.; SATO, J.P.H.; RESENDE, T.P.; GUEDES, R.M.C. Infecção por *Brachyspira* sp. em suínos no Brasil. 131-139. In: Simpósio Internacional de Suinocultura, VIII. Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: VIII SINSUI, p.131-139, 2013a.
- DANIEL, A.G.S.; RESENDE, T.P.; SATO, J.P. H.; GUEDES, R.M.C. Infecção por *Brachyspira* sp. em suínos no Brasil. Guia Gessulli da Avicultura e Suinocultura Industrial, São Paulo, p. 52 - 58, 01 out. 2013b.

- DANIEL, A.G.S. Determinação dos padrões de Concentração Mínima Inibitória (MIC) e caracterização genotípica de cepas de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos com quadros clínicos de disenteria suína no Brasil. 2014. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- DELISLE, B.; CALINESCU, C.; MATEESCU, M.A.; FAIRBROTHER, J.M.; NADEAU, É. Oral immunization with F4 fimbriae and CpG formulated with carboxymethyl starch enhances F4-specific mucosal immune response and modulates Th1 and Th2 cytokines in weaned pigs. *J Pharm Pharm Sci.*, 15, p.642-656, 2012.
- DORS, A.; POMORSKA-MÓL, M.; CZYŻEWSKA, E.; WASYL, D.; PEJSAK, Z. Prevalence and risk factors for *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in finishing pigs in Polish farrow-to-finish swine herds. *Pol J Vet Sci.*, 18, p.825-831, 2015.
- DUGOURD, D.; JACQUES, M.; BIGRAS-POULIN, M.; HAREL, J. Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 by random amplification of polymorphic DNA analysis. *Vet Microbiol.*, 48, p.305-314, 1996.
- DUHAMEL, G.E.; JOENS, L.A. Laboratory procedures for the diagnosis of Swine Dysentery. Columbia: AAVLD, 94p, 1994.
- ELDER, R.O.; DUHAMEL, G.E.; SCHAFER, R.W.; MATHIESEN, M.R.; RAMANATHAN, M. Rapid detection of *Serpulina hyodysenteriae* in diagnostic specimens by PCR. *J Clin Microbiol.*, 32, p.1497-1502, 1994.
- FEIL, E.J.; LI, B.C.; AANENSEN, D.M.; HANAGE, W.P.; SPRATT, B.G. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.*, 186, p.1518-1530, 2004.
- FELLSTRÖM, C.; PETTERSSON, B.; THOMSON, J.; GUNNARSSON, A.; PERSSON, M.; JOHANSSON, K.E. Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J Clin Microbiol.*, 35, p.462-467, 1997.
- FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras.*, v.20, p.28-35, 2005.
- FISHER, L.N.; MATHIESEN, M.R.; DUHAMEL, G.E. Restriction fragment length polymorphism of the periplasmic flagellar flaA1 gene of *Serpulina* species. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 4, p.681-686, 1997.
- FOXMAN, B.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J.S.; MANNING, S.D.; MARRS, C.F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov.*, v.2, n.10, 2005.
- GEENEN, P.L.; VAN DERMEULEN, J.; BOUMA, A.; DE JONG, M.C.M. Estimating transmission parameters of F4+ *E. coli* for F4-receptor-positive and negative piglets: one-to-one transmission experiment. *Epidemiol Infect.*, 132, p.1039-1048, 2004.
- GUEDES, R.M.C. Diarreia em suínos de recria e terminação principais enfermidades. *Suíno & cia*, v.11, p.11-18, 2005.

- GUEDES, R.M.C. & BARCELLOS, D. Colite espiroquetal. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds.). Doenças dos Suínos. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial, p.128-134, 2012a.
- GUEDES, R.M.C., DANIEL, A.G.S. Outbreak of swine dysentery (SD) in pig herds in south Brazil. Spirochaete conference Proceedings. University of Surrey, Guildford, UK, p. 37, 2013.
- HAMPSON, D.J.; LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HOLYOAKE, P.K. *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from apparently healthy pig herds following an evaluation of a prototype commercial serological ELISA. Vet Microbiol., 191, p.15-19, 2016.
- HAMPSON, D.J. Dissemination of clonal groups of *Brachyspira hyodysenteriae* amongst pig farms in Spain, and their relationships to isolates from other countries. PLoS ONE, 7:6, e39082, 2012a.
- HAMPSON, D.J. *Brachyspiral* colitis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W.; eds. Diseases of Swine. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; p.680-696, 2012b.
- HAMPSON, D.J.; NAGARAJA, T.G.; KENNAN, R.M.; ROOD, J.I. Gram-negative anaerobes. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Eds.). Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4.ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing, p.513-526, 2010.
- HAMPSON, D.J.; FELLSTROM, M.C.; THOMSON, J.R. Swine dysentery. In: STRAW, B.E. (Ed.); ZIMMERMAN, J.J. (Ed.); D'ALLAIRE, S. (Ed.) et al. Diseases of Swine. 9. ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 785-805, 2006.
- HARDING, J.; FERNANDO, C.; RUBIN, J.; HILL, J. Swine dysentery and other emerging *Brachyspiras*. In: 31st Centralia Swine Research Update. Kirkton Ontario, II-30, 2012.
- HAREL, J.; BÉLANGER, M.; FORGET, C.; JACQUES, M. Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 from Quebec by restriction endonuclease fingerprinting and ribotyping. Can J Vet Res., 58, p.302-305, 1994.
- HARRIS, D.L.; GLOCK, R.D.; CHRISTENSEN, C.R.; KINYON, J.M. Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. Vet Med Small Anim Clin., 67, p.61-64, 1972.
- HERBST, W.; SCHNEIDER, S.; BALJER, G.; BARTH, S.A. An update of *Brachyspira hyodysenteriae* serotyping. Res Vet Sci., 111, p.135-139, 2017.
- HIDALGO, A.; CARVAJAL, A.; PRINGLE, M.; RUBIO, P.; FELLSTRÖM, C. Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. Epidemiol Infect., 138, p.76-85, 2010.
- HOCHMAN, B.; FERREIRA, L.M.; VILAS BÔAS, F.C.; MARIANO, M. Experimental model in hamsters (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. Acta Cir Bras., 19, p.69-78, 2004.

- HORTENCILLAS, R.; BRASSAGANYA-RIERA, J.; WILSON, J.; HUTTO, D.L.; WANNEMUEHLER, M.J. CD4+ T-cell responses and distribution at the colonic mucosa during *Brachyspira hyodysenteriae* induced colitis in pigs. *Immunol.*, 115, p.127-135, 2005.
- HSU, T.; HUTTO, D.L.; MINION, F.C.; ZUERNER, R.L.; WANNEMUEHLER, M.J. Cloning of a beta-hemolysin gene of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, 69, p.706-711, 2001.
- HUTTO, D.L.; GALVIN, J.E.; WANNEMUEHLER, M.J. Morphologic and temporal characterisation of lesions in an enhanced murine model of *Serpulina hyodysenteriae* infection. *J Med Microbiol.*, 47, p.275-280, 1998.
- HYATT, D.R.; TER HUURNE, A.A.; VAN DER ZEIJST, B.A.; JOENS, L.A. Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect Immun.*, 62, p.2244-2248, 1994.
- JACOBSON, M.; FELLSTRÖM, C.; LINDBERG, R.; WALLGREN, P.; JENSEN-WAERN, M. Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J Med Microbiol.*, 53, p.273-280, 2004.
- JENSEN, T.K.; BOYE, M.; MØLLER, K.; LESER, T.D.; JORSAL, S.E. Association of *Serpulina hyodysenteriae* with the colonic mucosa in experimental swine dysentery studied by fluorescent in situ hybridization. *APMIS.*, 106, p.1061-1068, 1998.
- JENSEN, T.K.; MØLLER, K.; BOYE, M.; LESER, T.D.; JORSAL, S.E. Scanning electron microscopy and fluorescent in situ hybridization of experimental *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* infection in growing pigs. *Vet Pathol.*, 37, p.22-32, 2000.
- KAJIWARA, K.; KOZAWA, M.; KANAZAWA, T.; UETSUKA, K.; NAKAJIMA, H.; ADACHI, Y. Drug-susceptibility of isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from colonic mucosal specimens of pigs collected from slaughter houses in Japan in 2009. *J Vet Med Sci.*, 78, p.517-519, 2016.
- KENNEDY, M.J.; ROSEY, E.L.; YANCEY Jr, R.J. Characterization of flaA-and flab-mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility and intestinal colonization. *FEMS Microbiol Lett.*, 153, p.119-128, 1997.
- KINYON, J.M.; HARRIS, D.L.; GLOCK, R.D. Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect Immun.*, 15, p.638-646, 1977.
- LA, T.; COLLINS, A.M.; PHILLIPS, N.D.; OKSA, A.; HAMPSON, D.J. 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, p.284-288, 2006.
- LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HARLAND, B.L.; WANCHANTHUEK, P.; BELLGARD, M.I.; HAMPSON, D.J. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol.*, 138, p.330-338, 2009.

- LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. An investigation into the etiological agents of Swine Dysentery in Australian pig herds. PLoS ONE, 11 (12): e0167424, 2016a.
- LA, T.; ROHDE, J.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. Comparison of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates recovered from pigs in apparently healthy multiplier herds with isolates from herds with Swine Dysentery. PLoS ONE, 11(8): e0160362, 2016b.
- LEE, J.I.; HAMPSON, D.J.; COMBS, B.G.; LYMBERY, A.J. Genetic relationships between isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* and comparison of methods for their subspecific differentiation. Vet Microbiol., 34, p.35-46, 1993.
- LEMCKE, R.M.; BEW, J.; BURROWS, M.R.; LYSONS, R.J. The growth of *Treponema hyodysenteriae* and other porcine intestinal spirochetes in a liquid medium. Res Vet Sci., 26, p.315-319, 1979.
- LI, W.; RAOULT, D.; FOURNIER, P.E. Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol Rev., 33, p.892-916, 2009a.
- LI, X.Y.; JIN, L.J.; UZONNA, J.E.; LI, S.Y.; LIU, J.J.; LI, H.Q.; LU, Y.N.; ZHEN, Y.H.; XU, Y.P. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): *in vivo* evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. Vet Immunol Immunopathol., 129, p.132-136, 2009b.
- LÖBERT, S.; ZIMMERMANN, W.; BÜRKI, S.; FREY, J.; NATHUES, H.; SCHEER, P.; DOHERR, M.G.; STALDER, U.; ZEEH, F. Occurrence of *Brachyspira hyodysenteriae* in multiplier pig herds in Switzerland. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere., 44, p.13-8, 2016.
- LYSONS, R.J.; LEMCKE, R.M.; BEW, J.; BURROWS, M.R.; ALEXANDER, T.J.I. An avirulent strain of *Treponema hyodysenteriae* isolated from herds free of swine dysentery. In Proc 7th Congr Int Pig Vet Soc, 40, 1982.
- MAHU, M.; DE JONG, E.; DE PAUW, N.; VANDE MAELE, L.; VANDENBROUCKE, V.; VANDERSMISSEN, T.; MIRY, C.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; MARTEL, A.; BOYEN, F. First isolation of "*Brachyspira hampsonii*" from pigs in Europe. Vet Rec., 11;174(2):47, 2014.
- MAHU, M.; DE PAUW, N.; VANDE MAELE, L. Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. Vet Res., 47:66, 2016.
- MARTÍNEZ-LOBO, F.J.; HIDALGO, Á.; GARCÍA, M.; ARGÜELLO, H.; NAHARRO, G.; CARVAJAL, A.; RUBIO, P. First identification of "*Brachyspira hampsonii*" in wild European waterfowl. PLoS One, 4;8(12): e82626, 2013.
- MacCANNELL, D. Bacterial strain typing. Clin Lab Med., v.33, p.629-650, 2013.
- MEYER, R.C.; SIMON, J.; BYERLY, C.S. The etiology of swine dysentery. I. Oral inoculation of germ-free swine with *Treponema hyodysenteriae* and *Vibrio coli*. Vet Pathol., 11, p.515-526, 1974a.

- MEYER, R.C.; SIMON, J.; BYERLY, C.S. The etiology of swine dysentery. II. Effect of a known microbial flora, weaning and diet on disease production in gnotobiotic and conventional swine. *Vet Pathol.*, 11, p.527-534, 1974b.
- MILNER, J.A. & SELLWOOD, R. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infect Immun.*, 62, p.4095-4099, 1994.
- MIRAJKAR, N.S. & GEBHART, C.J. Understanding the molecular epidemiology and global relationships of *Brachyspira hyodysenteriae* from swine herds in the United States: A multi-locus sequence typing approach. *PLoS ONE*, 9(9): e107176, 2014.
- MIRAJKAR, N.S.; BEKELE, A.Z.; CHANDER, Y.Y.; GEBHART, C.J. Molecular epidemiology of novel pathogen “*Brachyspira hampsonii*” reveals relationships between diverse genetic groups, regions, host species, and other pathogenic and commensal *Brachyspira* species. *J Clin Microbiol.*, 53, p.2908-2918, 2015.
- MIRAJKAR, N.S.; PHILLIPS, N.D.; LA, T.; HAMPSON, D.J.; GEBHART, C.J. Characterization and recognition of *Brachyspira hampsonii* sp. nov., a novel intestinal spirochete that is pathogenic to pigs. *J Clin Microbiol.*, 54, p.2942-2949, 2016.
- MØLBAK, L.; THOMSEN, L.E.; JENSEN, T.K.; BACH KNUDSEN, K.E.; BOYE, M. Increased amount of *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Megasphaera elsdenii* in the colonic microbiota of pigs fed a swine dysentery preventive diet containing chicory roots and sweet lupine. *J Appl Microbiol.*, 103, p.1853-1867, 2007.
- MOXLEY, R.A.; BERBEROV, E.M.; FRANCIS, D.H.; XING, J.; MOAYERI, M.; WELCH, R.A.; BAKER, D.R.; BARLETTA, R.G. Pathogenicity of an enterotoxigenic *Escherichia coli* hemolysin (*hlyA*) mutant in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.*, 66, p.5031-3035, 1998.
- MUNIAPPA, N.; MATHIESEN, M.R.; DUHAMEL, G.E. Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis. *J Vet Diagn Invest.*, 9, p.165-171, 1997.
- MUSHTAQ, M.; ZUBAIR, S.; RÅSBÄCK, T.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; JANSSON, D.S. *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: genomic and phenotypic characteristics. *BMC Microbiol.*, 15(1):208, 2015.
- NABUURS, M.J.A. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. *Vet Quart.*, 20, p.42-45, 1998.
- NEO, E.; LA, T.; PHILLIPS, N.D.; ALIKANI, M.Y.; HAMPSON, D.J. The pathogenic intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli* forms a diverse recombinant species demonstrating some local clustering of related strains and potential for zoonotic spread. *Gut Pathog.*, 5(1):24, 2013.
- NOGUEIRA, M.G.; COLLINS, A.M.; DONAHOO, M.; D, EMERY. Immunological responses to vaccination following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. *Vet Microbiol.*, 164, p.131-138, 2013.

- OCHIACHI, S.; ADACHI, Y.; MORI, K. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposal of *Brachyspira hyodysenteriae* com. nov., *Brachyspira innocens* com. nov. and *Brachyspira pilosicoli* com. nov. Microbiol and Immun., 4, p.445-452, 1997.
- OSORIO, J.; CARVAJAL, A.; NAHARRO, G.; LA, T.; PHILLIPS, N.D.; RUBIO, P.; HAMPSON, D.J. Dissemination of clonal groups of *Brachyspira hyodysenteriae* amongst pig farms in Spain, and their relationships to isolates from other countries. PLoS ONE, 7:6, e39082, 2012.
- OSORIO, J.; CARVAJAL, A.; NAHARRO, G.; RUBIO, P.; LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. Identification of weakly haemolytic *Brachyspira* isolates recovered from pigs with diarrhoea in Spain and Portugal and comparison with results from other countries. Res Vet Sci., 95, p.861-869, 2013.
- PAULOVICH, F.B.; BOROWSKI, S.M.; DRIEMEIER, D.; RAZIA, L.E.; COUTINHO, T.A.; PRATES, A.B.H.; PESCADOR, C.; CORREA, A.; BARCELLOS, D.E.S.N. Avaliação da patogenicidade de amostras de *Brachyspira pilosicoli* através de técnicas histopatológicas convencionais e por imuno-histoquímica. Pesq Vet Bras., 24, p.144-148, 2004.
- PÉREZ-LOSADA, M.; CABEZAS, P.; CASTRO-NALLAR, E.; CRANDALL, K.A. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. Infect Genet Evol., 16, p.38-53, 2013.
- PHILLIPS, N.D.; LA, T.; ADAMS, P.J.; HARLAND, B.L.; FENWICK, S.G.; HAMPSON, D.J. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. Vet Microbiol., 134, 294-299, 2009.
- RANJBAR, R.; KARAMI, A.; FARSHAD, S.; GIAMMANCO, G.M.; MAMMINA, C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. New Microbiol., 37, p.1-15, 2014.
- RÅSBÄCK, T.; JANSSON, D.S.; JOHANSSON, K.; FELLSTRÖM, C. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. Environ Microbiol., 4, p.983-991, 2007.
- ROHDE, J.; HABIGHORST, K.; SEEHUSEN, F. "*Brachyspira hamptonii*" clade I isolated from Belgian pigs imported to Germany. Vet Microbiol., 168, p.432-435, 2014.
- ROSSI, L.; VAGNI, S.; POLIDORI, C.; ALBORALI, G.L.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V. Experimental induction of *Escherichia coli* diarrhoea in weaned piglets. Open J Vet Med., 2, p.1-8, 2012.
- RUBIN, J.E.; COSTA, M.O.; HILL, J.E.; KITTRELL, H.E.; FERNANDO, C.; HUANG, Y.; O'CONNOR, B.; HARDING, J.C. Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with "*Brachyspira hamptonii*" Strain 30446. PLoS ONE, 8(2): e57146, 2013.

- SONG, Y.; LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. Development of a serological ELISA using a recombinant protein to identify pig herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet J.*, 3, p.365-370, 2015.
- ŠPERLING, D.; ČÍŽEK, A.; SMOLA, J. Effect of zinc chelate and valnemulin for the treatment of swine dysentery in an experimental challenge study. *Res Vet Sci.*, 96, 30-32, 2014.
- 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. Physiology of ruminal and intestinal spirochaetes. In: HAMPSON, D.J. & STANTON, T.B. (Eds.). *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans*. New York, NY: CAB International, p.7-46, 1997.
- STANTON, T.B. Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 42(1): p.189-190, 1992.
- STANTON, T.B.; JENSEN, N.S.; CASEY, T.A.; TORDOFF, L.A.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J. Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpula innocens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 41, p.50-58, 1991.
- STANTON, T.B.; ROSERY, E.L.; KENNEDY, M.J.; JENSEN, N.S.; BOSWORTH, B.T. Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl Environ Microbiol.*, 65, p.5028-5034, 1999.
- STANTON, T.B.; SELLWOOD, R. Cloning and Characteristics of a Gene Encoding NADH Oxidase, a major mechanism for oxygen metabolism by the anaerobic spirochete, *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Anaerobe*, 5, p.539-546, 1999.
- TAYLOR, D.J. & ALEXANDER, T.J.L., The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J.*, 11, p.58-61, 1971.
- TAYLOR, D.J.; SIMMONS, J.R.; LAIRD, H.M. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec.*, 106, p.326-332, 1980.
- TAYLOR, D.J. & TROTT, D.J. Porcine intestinal Spirochaetosis and spirochaetal colitis. In: HAMPSON, D.J. & STANTON, T.B. (Eds.). *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans* Wallingford, UK: CAB INTERNATIONAL, p.211-241, 1997.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies for bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 5, p.426-439, 1997.
- ter HUURNE, A.A.; VAN HOUTEN, M.; MUIR, S.; KUSTERS, J.G.; VAN DER ZEIJST, B.A.; GAASTRA, W. Inactivation of a *Serpula (Treponema) hyodysenteriae* hemolysin gene by

homologous recombination: importance of this hemolysin in pathogenesis in mice. FEMS Microbiol Lett., 71(1), p.109-113, 1992.

THOMSON, J.R.; SMITH, W.J.; MURRAY, B.P.; DICK, J.E.; SUMPTION, K.J. Porcine enteric spirochete infections in the UK: Surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. Anim Health Res Rev., 2, p.31-36, 2001.

TROTT, D.J.; ATYEO, R.F.; LEE, J.I.; SWAYNE, D.A.; STOUTENBURG, J.W.; HAMPSON, D.J. Genetic relatedness amongst intestinal spirochaetes isolated from rats and birds. Lett Appl Microbiol., 23, p.431-436, 1996.

URWIN, R. & MAIDEN, M.C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol., 11, p. 479-487, 2003.

WILBERTS, B.L.; ARRUDA, P.H.; KINYON, J.M.; MADSON, D.M.; FRANA, T.S.; BURROUGH, E.R. Comparison of session severity, distribution, and colonic mucin expression in pigs with acute swine dysentery following oral inoculation with "*Brachyspira hamptonii*" or *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet Pathol., 51, p.1096-1108, 2014a.

WILBERTS, B.L.; ARRUDA, P.H.; KINYON, J.M. Investigation of the impact of increased dietary insoluble fiber through the feeding of Distillers Dried Grains with Solubles (DDGS) on the incidence and severity of *Brachyspira*-associated colitis in pigs. PLoS ONE, 9(12): e114741, 2014b.

WILCOCK, B.P.; OLANDER, H.L. Studies on the pathogenesis of Swine Dysentery I. Characterization of the lesions in colons and colonic segments inoculated with purê cultures or colonic contente containing *Treponema hyodysenteriae*. Vet Pathol., 16: 450-465, 1979.

WHITING, R.A.; DOYLE, L.P.; SPRAY, R.S. Swine dysentery. Purdue Univ Agric ExpStn Bull. 257:3-15, 1921.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D.E.S.N. Patogenia das diarréias dos suínos: modelos e exemplos. Acta Sci Vet., v.36, s81-s86, 2008.

ZHOU, C.; LIU, Z.; LIU, Y.; FU, W.; DING, X.; LIU, J.; YU, Y.; ZHANG, Q. Gene silencing of porcine MUC13 and ITGB5: candidate genes towards *Escherichia coli* F4ac adhesion. PLoS ONE, ;8(7):e70303, 2013.

CAPITULO 1

Diversidade genética e evolução de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil

Resumo

Neste estudo foi avaliada a diversidade genética, distribuição, micro-evolução e estrutura populacional das cepas brasileiras de *B. hyodysenteriae* isoladas de suínos. Foi aplicada a técnica de tipagem de sequências multilocus (MLST) de sete genes *housekeeping* em 46 isolados obtidos dos surtos de disenteria suína que ocorreram entre 2011 a 2015 nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Santa Catarina e isolados históricos da década de 90, de granjas do Rio Grande do Sul. Foi observado um perfil nacional independente das sequências globais depositadas no banco de dados de *Brachyspira* spp. As amostras foram classificadas em nove tipos de sequência (STs) e divididas em quatro complexos clonais, demonstrando relação epidemiológica molecular intra-granja, entre granjas e entre os estados nos diferentes períodos de isolamento.

Palavras-chave: Disenteria Suína, epidemiologia, MLST, Brasil

Abstract

Genetic diversity, distribution, micro-evolution and population structure of Brazilian *B. hyodysenteriae* strains isolated from swine were evaluated in this study. The Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis of seven housekeeping genes was applied in 46 isolates obtained from outbreaks of swine dysentery that occurred between 2011 and 2015 in the states of Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul and Santa Catarina, and historical isolates from 1990's from Rio Grande do Sul farms were included in the study. An independent national profile of the global sequences deposited in the *Brachyspira* spp. database was observed. All isolates were classified into nine sequence type (STs) and divided into four clonal complexes, demonstrating an epidemiology molecular relationship intra-farm, between farms and between states in different periods of isolation.

Key words: Swine dysentery, epidemiology, MLST, Brazil

1. INTRODUÇÃO

Brachyspira hyodysenteriae, espiroqueta anaeróbica é o agente etiológico da disenteria suína (DS). A doença é caracterizada por diarreia muco-hemorrágica grave e está associada à perdas econômicas significativas para a suinocultura, com elevada morbidade e mortalidade em animais não tratados (Taylor e Alexander, 1971).

A DS tem distribuição mundial, ocorrendo principalmente nas regiões com maior densidade de produção de suínos (Boye et al, 1998; Calderaro et al., 2001). No Brasil, a doença foi descrita nos anos 80 e 90, porém, os relatos eram esporádicos, de avaliações epidemiológicas triviais ou associados à padronização de técnicas de diagnóstico (Warth, 1985; Barcellos et al., 2000). A partir de 2010 foram registrados surtos em diversos estados brasileiros, localizados nas regiões que concentram a maior produção de suínos, causando perdas econômicas significativas relacionadas à redução nas taxas de crescimento, baixa conversão alimentar, alta morbidade e mortalidade, além de custos envolvidos no tratamento, prevenção e controle da doença (Guedes & Daniel, 2013; Daniel et al., 2013).

Para o gênero *Brachyspira*, a tipagem de sequências multilocus (MLST) tem sido a melhor técnica para análises de similaridade e ancestralidade entre cepas (Råsbäck et al., 2007; La et al, 2009; Phillips et al., 2010; Neo et al., 2013; Mirajkar & Gebhart, 2014). A técnica utiliza variação alélica nas sequências de nucleotídeos de genes específicos para diferenciar isolados de patógenos, sendo utilizada em estudos epidemiológicos de numerosos agentes infecciosos (Urwin & Maiden, 2003). Desde a padronização da metodologia por Råsbäck et al. (2007), foram realizadas análises com oito genes, dos quais sete genes *housekeeping* foram definidos para comparação por este método (La et al., 2009). A avaliação possui índice discriminatório de Simpson de 0.974 e, além disso, para o gênero *Brachyspira*, diferente das outras técnicas comparativas, há disponível uma base de dados on-line (www.pubmlst.org/Brachyspira), permitindo a comparação com isolados de diversos países.

O Brasil ocupa a quarta posição mundial em produção e exportação de carne suína. Apesar da importância econômica acarretada com a DS, não existem informações sobre a epidemiologia da doença e do patógeno no país, principalmente dados relacionados à diversidade de cepas circulantes.

Este estudo teve como objetivo caracterizar e analisar a diversidade, distribuição, micro-evolução e estrutura populacional das cepas brasileiras de *B. hyodysenteriae* isoladas de suínos comparando com as isoladas dos surtos de 2011 a 2015 com as estirpes isoladas na década de 1990 no Brasil e outras de diversos países.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram analisadas 46 amostras brasileiras de *B. hyodysenteriae* de diferentes origens geográficas, sendo trinta e nove isolados de surtos entre 2011 e 2015 pertencentes a coleção de bactérias do Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esses isolados foram selecionados para criar um conjunto de dados das cepas atualmente circulantes no Brasil, representando amostras de cinco estados brasileiros, Mato Grosso (n = 1), Minas Gerais (n = 21, amostras de 6 granjas), Rio Grande do Sul (n = 1), Santa Catarina (n = 13, de 7 granjas) e São Paulo (n = 3, de 2 granjas) (Tabela 1). Mais de um isolado de cada plantel foi selecionado para permitir uma análise intra-granja. Para uma avaliação temporal, foram utilizadas sete amostras da década de 90 obtidas de cinco granjas de diferentes regiões do Rio Grande do Sul.

2.2. Isolamento bacteriano e identificação

As amostras foram cultivadas em ágar tripticase de soja (TSA) enriquecido com 5% de sangue ovino, 12,5 mg/l de rifampicina, 200 mg/l de espectinomicina, 50 mg/l de vancomicina e 12,5 mg/l de colistina (Leser et al., 1997), em jarras de anaerobiose com mistura gasosa (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂) a 37°C e avaliados quanto ao crescimento a partir de 48 horas. As colônias isoladas foram utilizadas para extração de DNA. Após crescimento em placas, as mesmas foram lavadas com 1 ml de PBS estéril para recuperação bacteriana. O DNA foi extraído através de lise utilizando tiocianato de guanidina, como descrito por Chomczynski (1993). As cepas do Rio Grande do Sul, estavam liofilizadas e foram recuperadas com 1 ml de PBS estéril e a extração do DNA foi realizada com kit comercial (Qiagen Stool Mini kit, Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Realizou-se PCR duplex com amplificação do gene *nox* da *B. hyodysenteriae* e gene 16S da *B. pilosicoli*, de acordo com La et al. (2003). A amplificação do gene *nox* para identificação de outras espécies pertencentes ao gênero *Brachyspira* e subsequente sequenciamento genômico foi realizado de acordo com Chander et al. (2012). Os produtos de PCR foram purificados utilizando kit comercial (Invitrogen PureLink PCR Purification; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e os produtos foram sequenciados em ambas as direções por uma empresa especializada (BGI Tech Solutions Co., Ltd.) utilizando sequenciador capilar. As

sequências obtidas foram alinhadas com o programa SeqScape V2.7 e Mega 5.1. Os produtos das sequências foram analisados no banco de dados on-line do GenBank.

2.3. Tipagem de sequência *multilocus* (MLST)

As relações genéticas entre os isolados de *B. hyodysenteriae* foram determinadas pelo esquema MLST, previamente descrito por La et al. (2009). Sete genes *housekeeping*, álcool desidrogenase (*adh*); Fosfatase alcalina (*alp*); Esterase (*est*); Glutamato desidrogenase (*gdh*); Glucose quinase (*glpK*); Fosfoglucomutase (*pgm*); e acetil-coA acetiltransferase (*thi*) foram amplificados e sequenciados. O mix de PCR consistiu em: 1X tampão de PCR (contendo 3,0 mM⁻¹ de MgCl₂), 2,5 U de Taq polimerase, 0,1 mM de cada dNTP, 0,5 mM⁻¹ de cada par de primers e 1,0 µl de DNA. As reações de amplificação foram submetidas a um passo inicial de 2 min a 95°C, seguindo-se 33 ciclos a 95°C durante 30 seg, 50°C durante 15 seg e 72°C por 1 min. Os produtos de PCR amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% com 1X tampão TAE e analisados sob luz ultravioleta. Foram utilizados em cada reação, um controle positivo (cepa referência de *B. hyodysenteriae*, B204 ATCC – 31212) e um controle negativo (água ultrapura). Os produtos de PCR foram sequenciados em ambas as direções por uma empresa especializada (BGI Tech Solutions Co., Ltd.).

As sequências obtidas foram alinhadas e trimadas com os programas SeqScape V2.7 e Mega 5.1. Foram concatenadas no programa BioEdit e alinhadas utilizando CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Para eliminar as sequências de baixa qualidade, blocos conservados foram selecionados usando o software Gblocks. A homologia genética foi comparada através do modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980) e uma árvore evolutiva foi obtida usando o método Neighbour-Joining (Saitou e Nei, 1987) com software Mega6 (Tamura et al., 2013). Valores Bootstrap de 1000 repetições foram considerados como porcentagens.

2.4. Análises filogenéticas

Os isolados foram comparados em cinco níveis: dentro de um sistema de criação, dentro de um estado, entre os estados brasileiros, globalmente entre países e entre diferentes períodos de isolamento.

Para análise, as sequências foram comparadas no banco de dados globais PubMLST (<http://pubmlst.org/Brachyspira/>) para identificar uma correspondência exata para alelos conhecidos. As sequências de nucleotídeos únicos foram atribuídos novos números de alelos. O perfil alélico de cada isolado foi determinado pela combinação de alelos nos sete loci. Os tipos

de sequências (ST) foram definidos pela análise das sete sequências concatenadas com perfis alélicos correspondentes à STs previamente descritas do banco de dados. Isolados com perfis únicos foram atribuídos a um novo tipo de sequência (NST). Através do programa eBURSTv3 (<http://eburst.mlst.net>), os isolados brasileiros e globais de *B. hyodysenteriae* foram agrupados em complexos clonais (CC).

3. RESULTADOS

Todas as amostras foram confirmadas como sendo de *B. hyodysenteriae* pela PCR duplex e amplificação do gene *nox* seguida de sequenciamento e análise no GenBank. Na comparação das sequências para determinar alelos correspondentes com o banco de dados, foram atribuídos dois novos alelos para o gene *thi*. Baseado na análise dos sete genes *housekeeping*, os 46 isolados brasileiros representaram oito STs novos. O isolado G1 de Passos/MG foi classificado como ST94, anteriormente descrito em amostras da Austrália. As amostras obtidas entre 2011 e 2015 foram classificadas em nove STs e os isolados históricos da década de 1990, classificados em um único ST. A origem, período de isolamento, classificação de alelos e STs são apresentados na Tabela 1.

Foram observados na mesma granja um único ST, exceto nas granjas “H” de Santa Catarina (STs BR1, BR2 e BR3), “I” de Minas Gerais (STs BR4 e BR5) e “Q” de São Paulo (STs BR6 e BR7). Na granja “H” os STs observados também estavam presentes em outras granjas do estado, além de Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Na granja “I” o ST BR4 foi presente somente nessa granja e o ST BR5 observado nessa e em outra granja também de Minas Gerais em amostras obtidas em 2011 e 2013.

O ST BR1 foi o que apresentou maior distribuição geográfica, presente nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, obtidas de oito granjas diferentes e todas isoladas nos surtos da doença em 2012 e 2013. Os isolados históricos da década de 90 (granjas R, S, T, U, V, W e X) e da granja R de Minas Gerais, isolada em 2015, foram todos classificados como ST189. A tabela 1 apresenta informações sobre a origem das amostras, classificação dos alelos e STs de todos isolados brasileiros avaliados.

Tabela 1. Origem, período, granja, classificação dos alelos e tipos de sequências (ST) de amostras de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos submetidas à técnica de tipificação de sequência multilocus.

Local (Cidade/Estado)	Granja	Amostras	Ano	Alelos						ST	
				<i>Adh</i>	<i>Alp</i>	<i>Est</i>	<i>Gdh</i>	<i>Glpk</i>	<i>Pgm</i>		<i>Thi</i>
Videira/SC	A	A1, A2, A3	2012	2	26	5	10	26	1	Novo 1	NST BR1
Campos Novos/SC	B	B1, B2									
Coronel Freitas/SC	C	C1									
Teutônia/RS	D	D1									
Petrolândia/SC	E	E1									
Videira/SC	F	F1									
Para de Minas/MG	J	J1									
Rio do Sul/SC	H	H1	2013	2	26	5	10	4	1	Novo 1	NST BR2
		H2, H4									
		H3									
Concórdia/SC	K	K1	2013	2	26	5	20	26	2	Novo 1	NST BR3
	G	G1									
Passos/MG	I	I1	2011	2	31	3	10	26	1	Novo 2	NST BR4
		I2 - I12									
São Carlos/SP	L	L1	2011	2	31	3	20	38	2	Novo 2	NST BR5
Passos/MG	P	P1 - P6									
Nova Mutum/MT	N	N1	2011	2	31	3	20	38	2	Novo 2	NST BR6
Rio Claro/SP	Q	Q1									
		Q2	2015	2	26	3	10	2	1	Novo 2	NST BR7
Córrego Dantas/MG	R	R1									
Lajeado/RS	S	S1	1998	2	8	3	7	8	2	3	ST 189
Tupandi/RS	T	T1, T2									
	U	U1									
Estrela/RS	V	V1									
Carazinho/RS	W	W1									
Tupandi/RS	X	X1									

MG – Minas Gerais, MT – Mato Grosso, SC – Santa Catarina, SP – São Paulo e RS – Rio Grande do Sul.

O dendrograma mostrando as relações genéticas dos nove STs brasileiros são apresentados na Figura 1. A estrutura básica da árvore classificou os STs em três grupos principais. O grupo 1 foi formado por quatro STs e 15 isolados obtidos de 12 granjas, incluindo amostras dos surtos de 2012 e 2013 que ocorreram em vários estados no mesmo período de

tempo. Grupo 2 foi formado por 22 amostras de seis granjas isoladas nos anos de 2011 e 2013. Já o grupo 3 abrangeu nove amostras de oito granjas isoladas em 1998, 2011 e 2015.

Na análise incluindo amostras globais, foram observados quatro grupos principais. O grupo 1 formado pelo ST 189, juntamente com amostras da Austrália e Alemanha. O grupo 2 foi formado pelos ST 94, NST BR1, NST BR3, NST BR4, STs da Austrália, Bélgica e Estados Unidos. O grupo 3 foi formado pelos NST BR2, NST BR5, NST BR7 e amostras da Austrália e Alemanha. Grupo 4 foi composto pelo NST BR6 e amostras da Austrália. O dendograma da análise dos STs Brasileiros e globais do banco de dados, são apresentados no anexo 1.

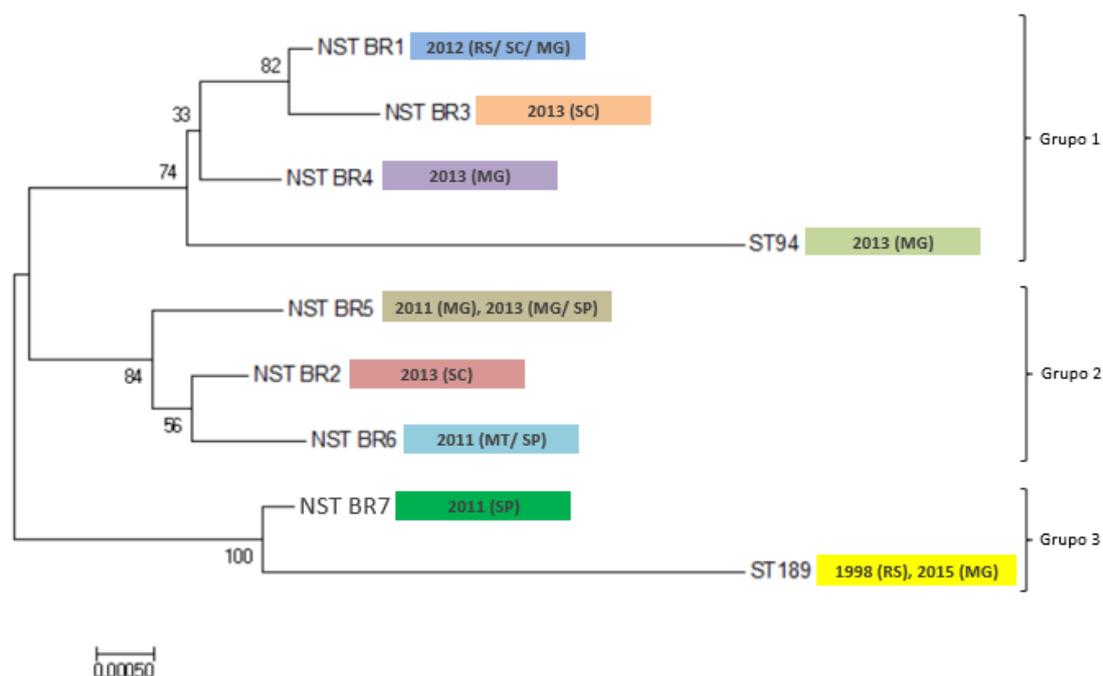


Figura 1. Dendrograma baseado em sequências de sete genes *housekeeping* *adh*, *alp*, *est*, *gdh*, *glpK*, *pgm* e *thi* concatenados de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil, construído a partir de matrizes de distância individuais combinadas, divididas em nove tipos de sequências com respectivos períodos e regiões brasileiras de isolamento. RS – Rio Grande do Sul, SC – Santa Catarina, MG – Minas Gerais, SP – São Paulo e MT – Mato Grosso.

Na análise eBurst, as amostras foram agrupadas em quatro complexos clonais e três *singletons* (Figura 2). O CC 1 agrupou isolados brasileiros de 2012 dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e de 2013 de Minas Gerais e Santa Catarina. CC 2 foi composto de isoladas de Minas Gerais em 2013 e ST da Austrália. CC3 foi formado por amostras pertencentes ao NVST BR 5 e 6, compreendendo aos isolados de 2011 e 2013 dos estados de

São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso. CC4 agrupou as amostras históricas isoladas na década de 90 no Rio Grande do Sul e a de Minas Gerais de 2015 com *founder* (15) e STs da Austrália.

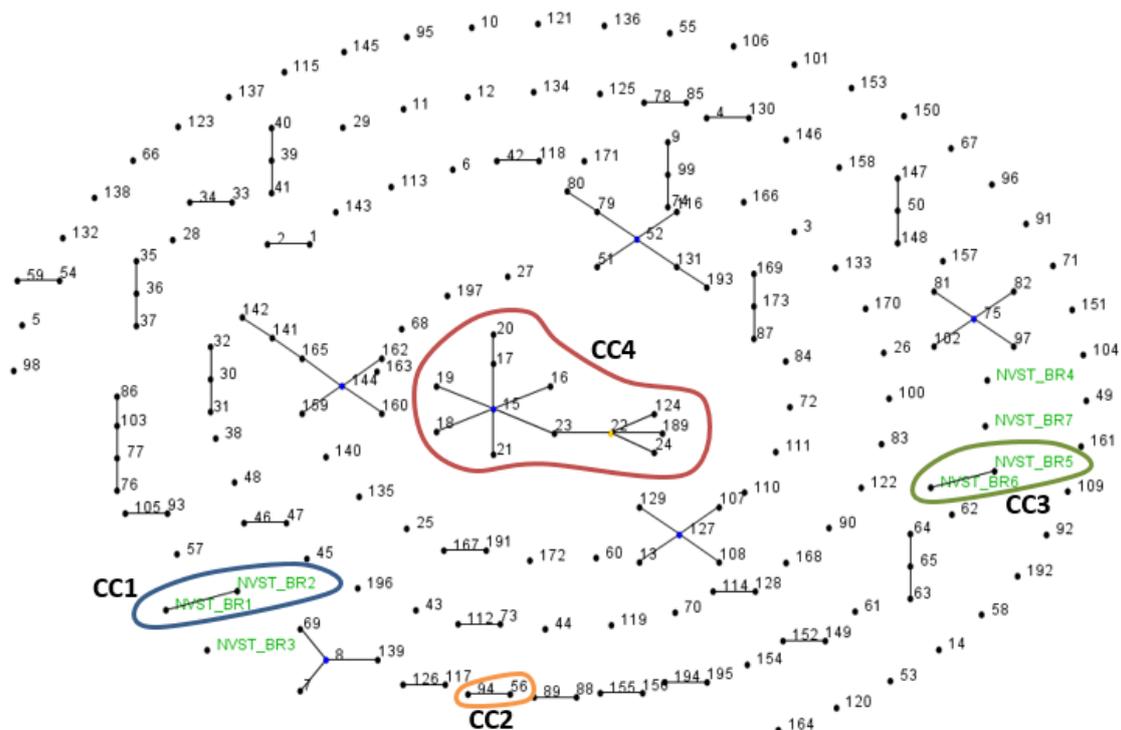


Figura 2. Complexos clonais e singletons obtidos pelo eBURST usando sequências de nucleotídeos de sete *locus* gênicos de amostras de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos de rebanhos brasileiros. Os nomes atribuídos aos CCs estão adjacente a cada grupo.

4. DISCUSSÃO

A DS é amplamente distribuída em todo o mundo, porém são poucos as informações sobre a epidemiologia molecular da doença. Este é o primeiro estudo epidemiológico molecular de *B. hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil. Foram avaliadas a similaridade entre os isolados de diferentes períodos e estados brasileiros e também foi realizada a comparação dessas amostras com isolados internacionais utilizando o banco de dados global do gênero *Brachyspira*.

A transmissão da *B. hyodysenteriae* ocorre principalmente pelo contato direto, através da introdução de animais subclínicamente infectados em rebanhos não infectados (Desrosiers et al., 2011). Porém, a disseminação indireta e persistência do agente no ambiente deve ser considerada uma vez que a bactéria pode sobreviver por grandes períodos de tempo em fezes de suínos (Boye et al., 2001), bem como em outras espécies de suídeos selvagens, aves, cães, camundongos e ratos (Songer et al., 1978; Janson et al., 2004; Feberwee et al., 2008; Phillips et

al., 2009; Hampson, 2012). A técnica MLST tem sido empregada para análises de ancestralidade confirmando o ressurgimento do mesmo isolado em granjas que aplicaram medidas de erradicação, com despovoamento, desinfecção das instalações e repovoamento após longos períodos de vazio sanitário (La et al., 2016). Além disso, a técnica foi utilizada para confirmar o papel de vetores biológicos na disseminação de cepas patogênicas para suínos e que foram isoladas de aves migratórias em diferentes continentes (Martínez-Lobo et al., 2013; Mahu et al., 2014; Mirajkar et al., 2015).

Dos sete genes analisados no presente estudo, o locus *adh* foi o mesmo para todas as amostras brasileiras, diferente dos outros genes, onde foram observadas no mínimo duas variações alélicas. De acordo com os trabalhos que têm sido realizados com a técnica, este *locus* é o que possui menor variação em comparação aos outros seis genes *housekeeping*, podendo em futuras análises, como sugerido por Mirajkar & Gebhart (2014), ser excluído da metodologia MLST para estudos de similaridade entre isolados.

Considerando as informações de período e localização geográficas dos isolados utilizados no presente estudo, dados importantes foram obtidos para esclarecer a epidemiologia da doença no Brasil.

No presente estudo foram identificados STs inéditos, sugerindo uma microevolução geográfica independente. Essa diferença epidemiológica pode ser explicada por diversas hipóteses. No Brasil, a importação de suínos para o Brasil segue medidas sanitárias de quarentenas oficiais, processo é fortemente recomendado uma vez que os sinais clínicos geralmente aparecem em animais com a infecção subclínica como resultado do transporte (McOrist et al., 2008). Além disso, as rotas de aves migratórias, já confirmadas como possíveis vetores de *Brachyspira* são distantes das principais regiões criadoras de suínos.

Foi demonstrado que os suínos de um rebanho podem ser infectados com um único perfil de *B. hyodysenteriae*, como observado pela identificação de apenas um ST dentro de uma granja. As amostras de Minas Gerais de 2015 e os isolados históricos da década de 90 apresentaram o mesmo ST (189) demonstrando o ressurgimento da espiroqueta após longos períodos de tempo. Este perfil de reemergência de cepas também foram descritos em outros trabalhos (Mirajkar et al., 2014; La et al., 2016) e podem ser o resultado da manutenção dessas estirpes em pequenos rebanhos sem expressão produtiva que podem tornarem-se fontes de infecção para rebanhos maiores vizinhos sem programa de biossegurança adequados.

Na análise dos dendogramas formados pelos STs brasileiros, foram observados agrupamentos de acordo com a homologia genética, apresentando similaridade entre os isolados

dos surtos brasileiros e também com amostras de outros países. Exceto pelos NST BR2, BR3, BR4, BR7 e ST 94, que foram frequentes em um único estado. Foi observada uma distribuição dos mesmos STs em diferentes períodos de tempo e regiões geográficas, demonstrando uma conexão epidemiológica dos isolados entre diferentes regiões brasileiras produtoras de suínos, com provável fonte comum da disseminação de cepas.

A análise eBurst é utilizada para identificar isolados com conexão epidemiológica e história evolutiva relacionada (Urwin & Maiden, 2003). Os CC formados pela análise apresentaram uma relação de ancestralidade entre amostras de diferentes estados e isoladas em diferentes períodos. O CC 3 agrupou isolados de 2011 do Mato Grosso e São Paulo, e demonstrando o ressurgimento desses isolados em 2013 em outros estados (São Paulo e Minas Gerais). Os CC 2 e 4, compostos de isolados de Minas Gerais (2013 e 2015) e as amostras históricas da década de 90 do Rio Grande do Sul, apresentaram similaridade ancestral com amostras da Austrália, já descritas no banco de dados.

Os surtos de DS no Brasil foram diagnosticados entre o início de 2010 e julho de 2012, nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e, através das informações obtidas das granjas e veterinários que remeteram as amostras, pensava-se que não houvesse ligação epidemiológica direta entre os surtos. Os relatos do Mato Grosso, São Paulo e Minas Gerais foram detectados isoladamente em 2010 e 2011. Já os casos de agosto de 2012 pareciam estar relacionados à uma granja multiplicadora terceirizada de Santa Catarina, que forneceu fêmeas de reposição clinicamente sadias, mas infectadas, para várias Unidades de Produção de Leitões (UPLs) de diferentes empresas de integração (Guedes & Daniel, 2013; Daniel et al., 2013).

Na análise realizada com as amostras N1, Q1 e Q2 foram observados que os isolados de 2011 dos estados de São Paulo e Mato Grosso foram classificados em NST 6 e 7. Porém, o NST5 compreendeu as amostras de Minas Gerais de 2011 e 2013 e de São Paulo de 2013, comprovando conexões epidemiológicas entre os surtos, com ancestralidade como observado no CC3. Já as amostras isoladas dos surtos de 2012, de diferentes localizações geográficas, foram classificadas em um único ST (NST1), confirmando a disseminação da doença através da granja multiplicadora de Santa Catarina que enviava animais reprodutores para diferentes regiões brasileiras. O surto observado na granja “J”, de Pará de Minas, MG, se deu pela compra de leitões descrechados de rebanho positivo para DS do oeste de Santa Catarina, justificando assim os resultados do MLST.

Aspectos de biosseguidade são importantes para a prevenção da transmissão da DS (Roberson et al., 1992). A quarentena dos animais que são introduzidos no plantel é fortemente recomendada, uma vez que animais subclínicamente infectados apresentam sinais clínicos como resultado do estresse do transporte (Alvarez-Ordóñez et al., 2013). Outras medidas de manejo podem constituir auxílio no diagnóstico de SD. Animais assintomáticos podem desenvolver diarreia seguindo procedimentos estressantes, como transferência para novas baias, mistura de animais de diferentes origens e restrição alimentar (Hampson, 2012). No Brasil, medidas de biosseguidade geralmente são aplicadas somente em rebanhos núcleos e multiplicadores, a ausência de diagnóstico e principalmente de quarentenas nas granjas comerciais pode ter influenciado na não detecção de animais subclínicos que então carregaram a doença para dentro das granjas comerciais.

Os dados epidemiológicos a nível molecular da *B. hyodysenteriae* ainda são limitados. Esse fato pode refletir pelos STs únicos identificados em um país e, provavelmente, também é responsável pela detecção de STs únicos como observado neste estudo e como descrito na América do Norte (Mirajkar et al., 2014). Apesar das análises que têm sido realizadas fornecerem informações geográficas importantes, quão maior for o banco de dados de cepas circulantes em diferentes regiões produtoras de suíno no mundo, maior será a capacidade de compreensão das relações epidemiológicas entre elas.

No Brasil foi possível obter diversos isolados durante os surtos descritos no presente estudo devido ao fato de que grande parte das amostras para diagnóstico da doença no país foram remetidas ao Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde há um grupo de pesquisa para o agente e são utilizadas diferentes técnicas de diagnóstico, incluindo o isolamento bacteriano. Com a adoção do diagnóstico da doença em laboratórios comerciais e padronização de testes moleculares como a PCR, considerada mais rápida e fácil, fez com que o recebimento de amostras em nosso laboratório e, conseqüentemente o número de isolados, diminuísse consideravelmente nos últimos anos.

As análises epidemiológicas do presente estudo demonstraram informações da transmissão da DS no país.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; MARTÍNEZ-LOBO, F.J.; ARGUELLO, H.; CARVAJAL, A.; RUBIO, P. Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int J Environ Res Public Health*, 10, p.1927-1947, 2013.
- BARCELLOS, D.E.; MATHIESEN, M.R.; DE UZEDA, M.; KADER, I.I.; DUHAMEL, G.E. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet Rec.*, 146, p.398-403, 2000.
- BOYE, M.; JENSEN, T.K.; MØLLER, K.; LESER, T.D.; JORSAL, S.E. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA in situ hybridization. *Mol Cell Probe.*, 12, p.323-330, 1998.
- BOYE, M.; BALODA, S.B.; LESER, T.D.; MØLLER, K. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet Microbiol.*, 81, p.33-40. 2001.
- CALDERARO, A.; MERIALDI, G.; PERINI, S.; RAGNI, P.; GUÉGAN, R.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. A novel method for isolation of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Vet Microbiol.*, 80, p.47-52, 2001.
- CHANDER, Y.; PRIMUS, A.; OLIVEIRA, S.; GEBHART, C.J. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hamptonii*". *J Vet Diagn Invest.*, 24(5), p.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), p.532-534, 1993.
- DANIEL, A.G.S.; Resende T.P.; GABARDO, M.P.; SATO J.P.H.; ASSIS G.B.N.; GUEDES, R.M.C. Diagnóstico de surtos de diarreia por *Brachyspira hyodysenteriae* em rebanhos suínos. In: XVI Congresso da Abraves, 2013, Cuiabá. Anais do XVI Congresso da Abraves, 2013.
- DESROSIERS, R. Transmission of swine pathogens: Different means, different needs. *Anim Health Res Rev.*, 12, p.1-13, 2011.
- FEBERWEE, A.; HAMPSON, D.J.; PHILIPS, N.D.; LA, T.; VAN DER HEIJDEN, H.M.; WELLENBERG, G.J.; DWARS, R.M.; LANDMAN, W.J. Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other *Brachyspira* species in chickens from laying flocks with diarrhea or reduced production or both. *J Clin Microbiol.*, 46, p.593-600, 2008.
- GUEDES, R.M.C., DANIEL, A.G.S. Outbreak of swine dysentery (SD) in pig herds in south Brazil. Spirochaete conference Proceedings. University of Surrey, Guildford, UK, p.37, 2013.
- HAMPSON, D.J.; *Brachyspiral colitis*. In: Zimmerman, J.J.; Karriker, L.A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J.; Stevenson, G.W. (editors). *Diseases of swine*. Chichester: Wiley-Blackwell, p.680-696, 2012.

JANSSON, D.S.; JOHANSSON, K.E.; OLOFSON, T.; RASBACK, T.; VAGSHOLM, I.; PETTERSON, B.; GUNNARSON, A.; FELLSTROM, C. *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly beta-hemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). J Vet Microbiol., 53, p.293-300, 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol., 16, p.111-120, 1980.

LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HARLAND, B.L.; WANCHANTHUEK, P.; BELLGARD, M.I.; HAMPSON, D.J. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet Microbiol., 138, p.330-338, 2009.

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, p.3372-3375, 2003.

LA, T.; ROHDE, J.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. Comparison of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates recovered from pigs in apparently healthy multiplier herds with isolates from herds with Swine Dysentery. PLoS ONE, 11(8):e0160362, 2016.

LESER, T.D.; MØLLER, K.; JENSEN, T.K.; JORSAL, S.E. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly β -haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. Mol Cell Probes., 11, p.363-372, 1997.

MAHU, M.; DE JONG, E.; DE PAUW, N.; VANDE MAELE, L.; VANDENBROUCKE, V.; VANDERSMISSEN, T.; MIRY, C.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; MARTEL, A.; BOYEN, F. First isolation of "*Brachyspira hamptonii*" from pigs in Europe. Vet Rec., 174(2):47, 2014.

MARTÍNEZ-LOBO, F.J.; HIDALGO, Á.; GARCIA, M.; ARGÜELLO, H.; NAHARRO, L.; CARVAJAL, U.M.; RUBIO, P. First identification of "*Brachyspira hamptonii*" in wild European waterfowl. PLoS One, 4;8(12):e82626, 2013.

MCORIST, S.; BENNETT, C. Eradication of Swine Dysentery on large-scale breeder farms by partial depopulation/medication. In Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress, Durban, South Africa, p. 319, 2008.

MIRAJKAR, N.S.; GEBHART, C.J. understanding the molecular epidemiology and global relationships of *Brachyspira hyodysenteriae* from swine herds in the United States: A Multi-Locus Sequence Typing Approach. PLoS ONE 9(9): e107176, 2014.

MIRAJKAR, N.S.; BEKELE, A.Z.; CHANDER, Y.Y.; GEBHART, C.J. Molecular epidemiology of novel pathogen "*Brachyspira hamptonii*" reveals relationships between diverse genetic groups, regions, host species, and other pathogenic and commensal *Brachyspira* species. J Clin Microbiol., 53, p.2908-2918, 2015.

- NEO, E.; LA, T.; PHILLIPS, N.D.; ALIKANI, M.Y.; HAMPSON, D.J. The pathogenic intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli* forms a diverse recombinant species demonstrating some local clustering of related strains and potential for zoonotic spread. *Gut Pathog.*, 5(24), 2013.
- PHILLIPS, N.D.; LA, T.; ADAMS, P.J.; HARLAND, B.L.; FENWICK, S.G.; HAMPSON, D.J. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. *Vet Microbiol.*, 134, 294-299, 2009.
- PHILLIPS, N.D.; LA, T.; AMIN, M.M.; HAMPSON, D.J. *Brachyspira intermedia* strain diversity and relationships to the other indole-positive *Brachyspira* species. *Vet Microbiol.*, 143, p.246-54, 2010.
- RÅSBÄCK, T.; JOHANSSON, K.E.; JANSSON, D.S.; FELLSTRÖM, C.; ALIKHANI, M.Y.; LA, T.; DUNN, D.S.; HAMPSON, D.J. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. *Microbiology*, 153, p.4074-4087, 2007.
- ROBERTSON, I.D.; MHOMA, J.R.; HAMPSON, D.J. Risk factors associated with the occurrence of Swine Dysentery in Western Australia: Results of a postal survey. *Aust Vet J.*, 69, p.92-101, 1992.
- SAITOU, N.; NEI, M.; The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, 4, p.406-25, 1987.
- SONGER, J.G.; GLOCK, R.D.; SCHWARTZ, K.J.; HARRIS, D.L. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from sources other than swine. *J Am Vet Med Assoc.*, 172, p.464-466, 1978.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30, p.2725-2729, 2013.
- TAYLOR, D.J.; ALEXANDER, T.J. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J.*, 127, p.58-61, 1971.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, p.4673-4680. 1994.
- URWIN, R.; MAIDEN, M.C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.*, 11, p.479-487, 2003.
- 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.

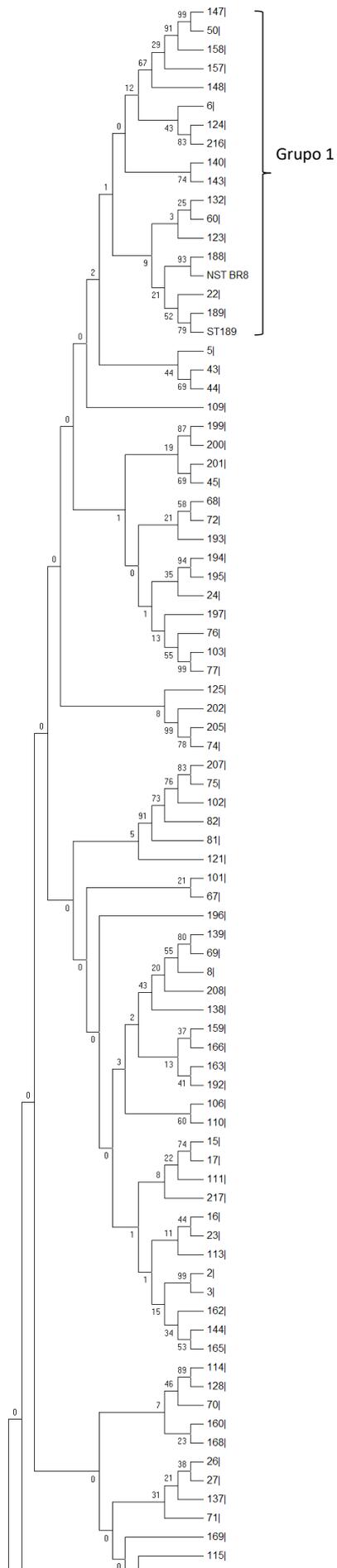
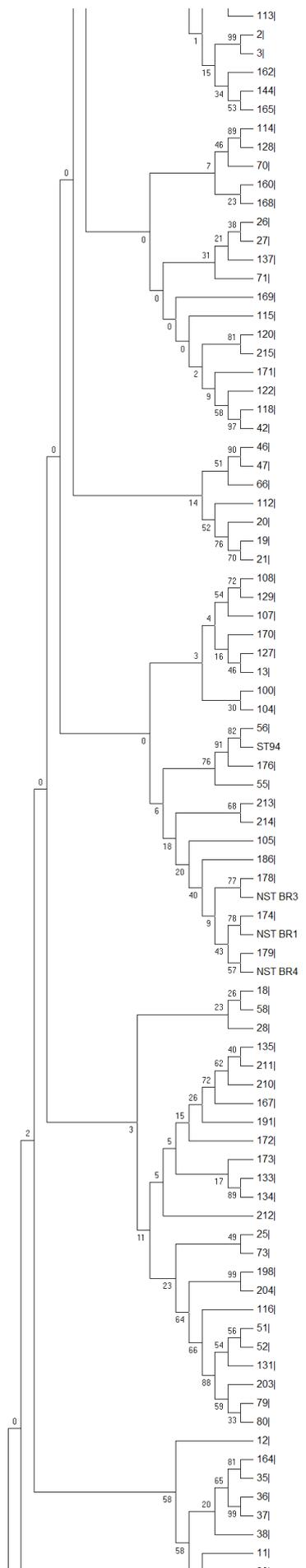
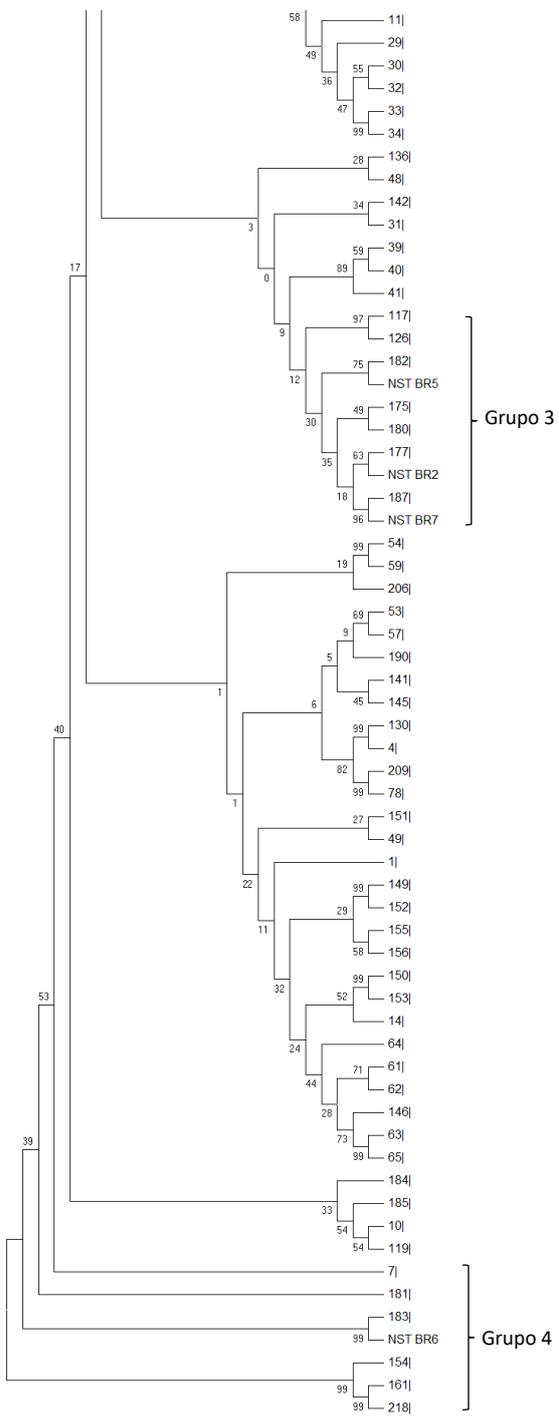


Figura suplementar 1. Dendrograma baseados em sequências de sete genes *housekeeping adh, alp, est, gdh, glpK, pgm e thi* concatenados de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos no Brasil e amostras globais do banco de dados global (www.pubmlst.org/brachyspira), continua nas próximas duas páginas.



Grupo 2



CAPÍTULO 2

Inoculação experimental em suínos com *Brachyspira hyodysenteriae* isolada de rebanho clinicamente saudável

Resumo

Neste estudo é relatado a infecção experimental em suínos com *B. hyodysenteriae* atípica, isolada de um animal sem sinais clínicos e de um rebanho sem indícios de disenteria suína, com objetivo de avaliar a patogenicidade, características clínicas e moleculares desta cepa comparado com uma altamente patogênica. Foram utilizados 48 leitões de cinco semanas de idade separados randomicamente em três grupos: controle negativo, controle positivo e cepa atípica. A primeira detecção de eliminação de *B. hyodysenteriae* nas fezes dos animais do grupo desafiado com a cepa patogênica foi no 5º dia pós infecção (dpi). Durante o período de avaliação, 11/16 animais demonstraram presença da bactéria nas fezes. No grupo inoculado com a cepa atípica, 1/15 animais apresentou sinal clínico no 15º dpi, sendo positivo na qPCR a partir do 11º dpi. Diarreia aquosa/ muco-hemorrágica foi observada pela primeira vez no sétimo dpi, afetando 10 animais do grupo controle positivo. No grupo atípico, um animal apresentou diarreia muco-hemorrágica com início no 15º dpi. No grupo negativo não foram observados sinais clínicos de diarreia durante todo o período experimental, tão pouco lesões macro ou microscópicas, ou positividade à PCR. Para o isolamento bacteriano, lesões macroscópicas e microscópicas foram encontradas diferença significativa entre os três grupos de animais avaliados.

Palavras-chave: Disenteria suína, *B. hyodysenteriae* atípica, diarreia, colite, histologia.

Abstract

This study reported experimental infection of atypical *B. hyodysenteriae*, isolated from an animal without clinical signs and from a disease-free herd, to evaluate the pathogenicity, clinical and molecular characteristics of this strain compared to a highly pathogenic strain. Forty-eight five-week-old pigs were randomly divided into three groups: negative control, pathogenic strain and atypical strain. The first detection of *B. hyodysenteriae* in the feces of the animals inoculated with the pathogenic strain occurred on the 5th day postinoculation (dpi). Considering the entire experimental period, 11/16 animals shed bacteria in the feces. In the atypical strain group, one animal had clinical signs of swine dysentery on the 15th dpi, it was qPCR positive at 11th dpi. Aqueous/mucohemorrhagic diarrhea was first observed on the seventh dpi, affecting 10 animals in positive group. In the atypical group, one animal presented mucohemorrhagic diarrhea beginning at the 15th dpi. In the negative group, no clinical signs of diarrhea were observed during the whole experimental period and no macro or microscopic lesions, or PCR positivity were observed. Bacterial isolation, macroscopic and microscopic lesions showed significant difference between groups.

Key words: Swine Dysentery, *B. hyodysenteriae* atypical, diarrhea, colitis, histology.

1. INTRODUÇÃO

Doenças do trato gastrointestinal que afetam os suínos entre as fases neonatais e crescimento/terminação continuam sendo um dos maiores fatores que limitam a eficiência e rentabilidade da suinocultura em todo o mundo (Thomson & Friendship, 2012). Dentre os principais agentes causadores de diarreia em suínos encontram-se as bactérias do gênero *Brachyspira*, sendo as espécies *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* as de maior ocorrência (Taylor & Alexander, 1971; Taylor et al., 1980).

B. hyodysenteriae é o agente etiológico da disenteria suína (DS), caracterizada por colite muco-hemorrágica (Wills, 2000; Hampson, 2012). A doença afeta principalmente animais nas fases de recria e terminação e os sinais clínicos variam de diarreia mucoide moderada de coloração normal a sanguinolenta, com taxa de mortalidade podendo variar de 30 a 90%. Lesões macroscópicas da DS incluem hemorragia de mucosa, muco luminal, necrose multifocal associada a exsudato fibrinoso e espessamento da mucosa de variável intensidade. Na microscopia são encontradas alterações no ceco e cólon, nos quais pode-se observar hiperplasia das células caliciformes, hemorragia, necrose e infiltrado inflamatório neutrofílico na lâmina própria (Hampson, 2012).

Nos últimos anos houve em diversos países a reemergência da doença que se mantinha silenciosa (Burrough, 2013). Neste período foi descrita a emergência de duas novas espécies, *B. hamptonii* e *B. suanatina* com características patogênicas semelhantes à DS (Råsbäck et al., 2007; Chander et al., 2012; Mushtaq et al., 2015). Isolados atípicos de *B. hyodysenteriae* foram previamente descritos e caracterizados como sendo de baixa patogenicidade, capazes de colonizar, mas não induzir doença clínica (Lysons et al., 1982; Thomson et al., 2001; Hampson et al., 2015). Recentemente, além dos estudos avaliando características patogênicas e moleculares de cepas atípicas, isolados de *B. hyodysenteriae* têm sido obtidos de rebanhos sem doença clínica e de alto status sanitário (La et al., 2016a,b).

No Brasil, esta é a primeira descrição de cepa de *B. hyodysenteriae* atípica, isolada de um animal sem sinais clínicos e oriundo de um rebanho livre da doença. Neste estudo é relatado a infecção experimental em suínos com objetivo de avaliar a patogenicidade, características clínicas e moleculares desta cepa comparado com uma altamente patogênica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e delineamento experimental

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA #177/2015).

Foram utilizados quarenta e oito leitões de cinco semanas de idade ($7,95 \pm 1,29$ kg/peso), obtidos de granja comercial, sem histórico prévio de doença associada com *Brachyspira* spp., *Lawsonia intracellularis* ou *Salmonella* sp. Os animais foram separados randomicamente em três grupos: controle negativo (NEG), cepa patogênica (VIR) e cepa atípica (ATYP). Cada

grupo foi alojado, sete dias antes da inoculação, em salas separadas compostas por quatro baias suspensas de piso plástico com alimentação e água *ad libitum*.

A temperatura ambiente e alimentação foram as mesmas para todos os tratamentos. As atividades diárias de manejo de cada grupo foram realizadas utilizando instrumentos exclusivos e equipes diferentes para evitar a contaminação cruzada. Durante todo o período de avaliação não foram utilizados medicamentos parenterais ou orais.

2.2. Inóculo

As amostras utilizadas neste estudo foram isoladas de suínos de granjas brasileiras no ano de 2013 e estavam congeladas a -80°C no Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. A cepa do grupo VIR foi isolada de um suíno clinicamente afetado com diarreia muco-hemorrágica e colite. Já a cepa ATYP foi isolada de um animal de uma granja sem sinais clínicos de DS e que não utilizava antimicrobianos que poderiam mascarar a sintomatologia da doença. Fenotipicamente, ambas cepas apresentavam forte hemólise em ágar sangue. Em análise genotípica pela PCR (La et al., 2003) e sequenciamento do gene *nox* (Chander et al., 2012) foram identificadas como *B. hyodysenteriae*. Através da técnica de Tipagem de sequência multilocus (*multi-locus sequence typing* - MLST) (La et al., 2009), ambos os isolados do grupo POS e ATYP foram classificadas como Novo ST BR5 (Adh – 2, Alp – 31, Est – 3, Gdh – 20, Glpk – 4, Pgm – 2 e Thi – Novo).

Os isolados foram cultivados em meio seletivo de ágar tripticase de soja (TSA) suplementado com 5% de sangue ovino e 12,5 mg/l de rifampicina, 200 mg/l de espectinomicina, 50 mg/l de vancomicina e 12,5 mg/l de colistina (Leser et al., 1997), em condições de anaerobiose de N_2 (80%), CO_2 (10%) e H_2 (10%), a 37°C por 72 horas.

Após o crescimento, as placas de ágar foram lavadas com PBS e o sobrenadante foi incubado em caldo de crescimento tripticase de soja (TSB), enriquecido com 0,5% glucose, 0,2% NaHCO_3 , 0,05% L-cisteína-HCl, 1,0% de extrato de levedura, 10% de soro fetal bovino e 5% de extrato fecal suíno (Kunkle et al., 1986) na proporção de 1:100 ml (lavado:caldo), por 24 horas, a 37°C em estufa shaker, seguido da inoculação dos animais.

2.3. Inoculação dos animais

Os leitões foram inoculados por três dias consecutivos, por via intra-gástrica, como descrito anteriormente (Jacobson et al., 2004; Rubin et al., 2013). Para diminuir o tempo de trânsito gástrico, os animais foram deixados em jejum alimentar por 16 horas antes e uma hora após a inoculação (Rubin et al., 2013). Os grupos VIR e ATYP receberam, através de sonda intragástrica, 50 ml do inóculo nas concentrações determinadas por qPCR de 5.1×10^7 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 bactérias/ml (grupo VIR) e 1.2×10^8 , 2.3×10^8 , 1.3×10^8 bactérias/ml (grupo ATYP) nos 0, 1 e 2 dias pós infecção (DPI), respectivamente. O grupo NEG foi inoculado com 50 ml de caldo TBS estéril.

2.4. Avaliação clínica e coleta de amostras

Após a inoculação, os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento de sinais clínicos de diarreia, e avaliação da consistência fecal baseada no seguinte escore: 0 = normal, 1 = consistência semi-sólida, 2 = consistência cremosa e 3 = consistência aquosa, com adição de 0,5 para a presença de muco perceptível e/ou sangue.

Amostras de fezes foram coletadas nos -7, 5, 7, 11, 15 e 18 DPI para avaliação quantitativa da eliminação de *B. hyodysenteriae* pela qPCR. Para isolamento de *Brachyspira* spp. amostras de fezes foram coletadas no dia -7, 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 18 DPI para serem semeadas em meio seletivo, como descrito anteriormente.

2.5. Extração de DNA e qPCR

O DNA das fezes dos suínos foi extraído com kit de extração comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Toronto, ON) de acordo com as instruções do fabricante.

O número de *B. hyodysenteriae* presentes nas amostras foi determinado por PCR em tempo real, utilizando os primers JH0073 (5'-AGT GAA ATA GTT GCT CAT ATC AAA -3') e JH0074 (5'-GCA TCA CTG ATT AAA GAA CCA ATT-3') (Rubin et al., 2013). Uma grama de fezes negativas, adicionando um número conhecido de *B. hyodysenteriae* (10^1 - 10^8 bactérias/grama de fezes), foi utilizada para determinar a curva padrão, sendo os valores limiares considerados para detecção de *Brachyspira* nas fezes determinada por 10^3 - 10^8 bactérias/grama de fezes, usando a equação de regressão a partir da curva padrão ($R^2 = 0,990$).

A reação foi realizada em volume final de 25 μ L, composta por 1x SYBR Green PCR Master Mix, 1x QN ROX Reference Dye (QuantiNova SYBR Green PCR Kit, Qiagen Inc., Toronto, ON), 500 nM de cada primer e 5 μ L de DNA. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e amplificadas no termociclador ViiAT^M 7 Real-Time PCR System (applied biosystems[®]), com as condições de amplificação: 2 min a 50° C, 10 min a 95° C, 40 ciclos de 15 seg a 95° C, e 1 min a 60° C. Todas as reações foram realizadas em duplicata e cada reação incluiu a curva padrão e controle negativo, sendo analisadas no software QuantStudioTM Real-Time PCR v1.2.

A especificidade da PCR foi testada contra DNA de *Bacteroides fragilis*, *Brachyspira murdochii*, *B. pilosicoli*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp.

2.6. Necropsia

A eutanásia e necropsia foram realizadas quando os animais apresentavam clinicamente debilitados segundo os critérios do CEUA ou no final do período de avaliação, 18 DPI. Para avaliação macroscópica e microscópica foram coletados segmentos do intestino delgado, intestino grosso (ceco, cólon proximal e espiral) e linfonodos mesentéricos, sendo fixados em formalina 10% tamponada.

2.7. Avaliação macroscópica

Macroscopicamente, o ceco e o cólon foram analisados quanto à presença de edema, muco excessivo no lúmen, hemorragia de mucosa e exsudato fibrinoso.

2.8. Histopatologia

Os fragmentos coletados foram processados de acordo com técnicas histológicas de rotina e coradas com hematoxilina e eosina (Luna, 1968). Na análise de ceco e cólon, avaliou-se a presença de necrose superficial, hemorragia, hiperplasia de células caliciformes, abscessos de criptas e infiltrado de neutrófilos na lâmina própria, sendo as lesões classificadas em uma escala de zero (ausência de lesão) a três (lesão difusa acentuada). O escore final foi determinado pela soma dos cinco parâmetros avaliados, com somatória máxima de 15. Todas as secções histológicas foram avaliadas por dois patologistas sem conhecimento sobre grupos experimentais, e a média destas duas contagens foi utilizada nas análises.

2.9. Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Semelhante ao processo anterior, os fragmentos de intestino grosso foram seccionados com espessura 4µm para o procedimento de FISH, de acordo com Jensen et al. (1998) com sondas específicas para *B. hyodysenteria* (Boye et al., 1998). Quando observadas marcações, foi realizada a classificação de +, ++ ou +++, de acordo com a proporção de espiroquetas marcadas.

2.10. Isolamento bacteriano

No fim do período de avaliação, foram coletadas amostras de fezes, conteúdo do intestino delgado e raspados de mucosa do ceco e do cólon foram coletadas para isolamento bacteriano. Para *Brachyspira* spp., amostras de fezes e raspados do intestino grosso foram semeadas em ágar seletivo e nas condições de crescimento em anaerobiose descritas anteriormente. Amostras do intestino delgado foram semeadas em ágar sangue e MacConkey para avaliação de crescimento de *Escherichia coli* enterotoxigênica e caldo Rappaport e ágar Hectoein para *Salmonella* sp.

2.11. Análise estatística

Para qPCR, a área sob a curva foi baseada na quantidade e duração da excreção fecal sendo calculada para cada animal. Escores histopatológicos e presença de sinais clínicos e lesões macroscópicas foram analisados utilizando software SPSS v19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) e o teste Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos, com $p < 0,05$ considerado como significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação clínica

Antes da inoculação, um animal do grupo ATYP morreu devido a endocardite valvular, tendo sido excluído do estudo.

No início do período experimental todos os animais apresentaram escore fecal entre normal e semi-sólido (escore 0 ou 1), não houve isolamento de *Brachyspira* spp. e foram negativos pela qPCR para *B. hyodysenteriae*, PCR convencional para *B. pilosicoli* e *L. intracellularis*. Diarreia aquosa/muco-hemorrágica (escore ≥ 3) foi observada pela primeira vez no 7º DPI no grupo VIR e considerando todo o período de avaliação afetando 10 animais. No grupo ATYP, um animal apresentou diarreia muco-hemorrágica com início no 15º DPI. No grupo negativo, não foram observados sinais clínicos de diarreia durante todo o período experimental (Tabela 1).

Considerando o período mais longo de duração de diarreia, um animal do grupo VIR que apresentou sinal clínico por 11 dias e no grupo ATY por três dias. Devido às condições clínicas debilitadas, três animais (#2, #6 e #13) do grupo VIR foram sacrificados antes do término do período de avaliação. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos NEG, ATY e o grupo VIR (Tabela 2).

Tabela 1. Escore fecal, qPCR, isolamento bacteriano, lesões macroscópicas, escore de lesões microscópicas e hibridização *in situ* fluorescente de leitões experimentalmente infectados com cepas virulentas e atípicas de *Brachyspira hyodysenteriae*.

Grupo	Animal	5 DPI		7 DPI		11 DPI		15 DPI		18 DPI		Isola- mento	Lesão Macro	Escore Micro	FISH
		EF	qPCR	EF	qPCR	EF	qPCR	EF	qPCR	EF	qPCR				
VIR	1	1	Neg	2	1,5.10 ³	4	2,9.10 ⁷	4	2,7.10 ⁷	4	1,4.10 ⁷	9 dpi	Sim	13	+
	2	2	8,5.10 ³	3,5	2,4.10 ⁵	4	1,2.10 ⁸	¥	¥	¥	¥	5 dpi	Sim	11,5	++
	3	1	Neg	2	Neg	2	Neg	2	Neg	1	Neg	18 dpi	Não	3,5	-
	4	2	Neg	3	Neg	2	Neg	2	Neg	2	Neg	11 dpi	Não	4,5	-
	5	2	Neg	1	Neg	2	Neg	2	Neg	2	Neg	11 dpi	Não	3	-
	6	0	Neg	1	9,6.10 ³	4	3,4.10 ⁷	¥	¥	¥	¥	9 dpi	Sim	11	++
	7	1	Neg	2	Neg	2	3,5.10 ³	4	4,3.10 ⁷	3,5	2,6.10 ⁷	15dpi	Sim	10	++
	8	1	Neg	2	Neg	3	Neg	3	1,4.10 ²	3	7,4.10 ⁴	18 dpi	Sim	9,5	++
	9	1	Neg	2	Neg	4	4,4.10 ⁷	4	2,6.10 ⁶	4	2,5.10 ⁷	11 dpi	Sim	12,5	+++
	10	1	Neg	2	Neg	2	Neg	3	Neg	3	Neg	18 dpi	Não	7	-
	11	1	Neg	3	Neg	3	Neg	3	Neg	3	Neg	11 dpi	Não	4	-
	12	1	Neg	3	Neg	4	6,8.10 ⁷	4	7,6.10 ⁷	4	5,9.10 ⁸	11 dpi	Sim	14	++
	13	0	Neg	1	Neg	1	Neg	4	2,1.10 ⁷	¥	¥	15 dpi	Sim	14,5	++
	14	0	Neg	1	Neg	1	1,5.10 ³	0	2,5.10 ³	2	1,0.10 ⁴	Neg	Não	1	-
	15	0	Neg	1	Neg	1	Neg	1	Neg	1	1,6.10 ⁵	Neg	Não	1	-

	16	1	Neg	2	Neg	1	Neg	2	1,1.10 ³	2	7,2.10a ⁷	18 dpi	Sim	13,5	+++
	17	0	Neg	0	Neg	1	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-
	18	0	Neg	0	Neg	1	Neg	1	Neg	1	Neg	Neg	Não	2,5	-
	19	0	Neg	2	Neg	1	Neg	2	Neg	1	Neg	Neg	Não	7	-
	20	0	Neg	2	Neg	1	Neg	2	7,4.10 ³	2	1,5.10 ³	11 dpi	Não	4	-
	21	0	Neg	0	Neg	2	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	2,5	-
	22	0	Neg	0	Neg	2	Neg	2	Neg	1	Neg	18 dpi	Não	3	-
	23	0	Neg	0	Neg	2	Neg	2	Neg	1	Neg	Neg	Não	6	-
ATYP	24	0	Neg	0	Neg	1	Neg	2	1,6.10 ⁷	2	3,0.10 ⁴	11 dpi	Sim	5	+++
	25	0	Neg	0	Neg	1	Neg	4	1,3.10 ⁷	4	2,5.10 ⁷	15 dpi	Sim	13,5	+++
	26	0	Neg	0	Neg	1	Neg	0	1,1.10 ⁴	2	2,1.10 ⁵	15 dpi	Sim	6,5	+
	27	0	Neg	2	Neg	1	Neg	2	Neg	1	Neg	Neg	Não	0	-
	28	0	Neg	0	Neg	1	Neg	1	Neg	1	Neg	18 dpi	Não	5	-
	29	0	Neg	0	Neg	1	Neg	1	Neg	1	Neg	18 dpi	Não	1	-
	30	0	Neg	0	Neg	0	Neg	2	Neg	1	Neg	Neg	Não	3	-
	31	1	Neg	0	Neg	2	Neg	2	Neg	2	Neg	Neg	Sim	2,5	-
	32	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-
	33	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-
	34	0	Neg	0	Neg	1	Neg	0	Neg	1	Neg	Neg	Não	0	-
	35	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-
	36	0	Neg	1	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-
	37	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-
	38	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-
NEG	39	0	Neg	0	Neg	1	Neg	1	Neg	1	Neg	Neg	Não	0	-
	40	0	Neg	0	Neg	0	Neg	1	Neg	1	Neg	Neg	Não	0	-
	41	0	Neg	0	Neg	1	Neg	1	Neg	1	Neg	Neg	Não	0	-
	42	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	1	-
	43	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-
	44	0	Neg	1	Neg	1	Neg	0	Neg	1	Neg	Neg	Não	0	-
	45	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	1	-
	46	1	Neg	1	Neg	1	Neg	1	Neg	1	Neg	Neg	Não	0	-
	47	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	Não	0	-

DPI: dias pós infecção; EF: escore fecal; FISH: Hibridização imunofluorescente *in situ*; Neg: negativo; †: Animais que foram sacrificados devido às condições clínicas.

Tabela 2. Sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas de Disenteria Suína após inoculação de *Brachyspira hyodysenteriae* em suínos.

Grupo	Sinais clínicos*		Lesões macroscópicas*				Lesões microscópicas
	Fezes aquosas ou com sangue e/ou muco	Primeira observação	Número total de dias com diarreia	Muco excessivo no lúmen	Hemorragia de mucosa	Exsudato fibrinoso	Média do escore final \pm DP
Negativo	0/16 ^a	-	0 ^a	0/16 ^a	0/16 ^a	0/16 ^a	0,02 \pm 0,04 ^a
Atípico	1/15 ^a	15 DPI	3 ^b	3/15 ^a	1/15 ^a	1/15 ^a	0,81 \pm 0,39 ^b
Virulento	8/16 ^b	7 DPI	11 ^b	9/16 ^b	9/16 ^b	8/16 ^b	1,66 \pm 0,26 ^c

*Número de animais afetados/ total de animais; ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos; DPI: dias pós infecção; DP: desvio padrão; Teste Kruskal-Wallis e se significativo Teste Mann-Whitney

3.2. Alterações anatomopatológicas

3.2.1. Lesões macroscópicas

Quando presentes, as lesões macroscópicas no trato intestinal limitaram-se ao intestino grosso, sendo mais frequentes em porções do cólon espiral. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos NEG, ATY e o grupo VIR (Tabela 2). Nove e quatro animais dos grupos VIR e ATYP, respectivamente, apresentaram alterações macroscópicas (Tabela 1) caracterizadas por muco luminal, hemorragia de mucosa, necrose e/ou exsudato fibrinoso (Figura 1).

Desses animais, um do grupo VIR (#16 – Edema, hemorragia, espessamento e necrose de mucosa difusa acentuada) e dois do grupo ATY (#24 – Edema, hemorragia e espessamento de mucosa multifocal moderado e #26 – Edema e hiperemia de mucosa multifocal moderado) tiveram lesões macroscópicas, porém não foram observados sinais clínicos.



Figura 1. Lesões macroscópicas no cólon espiral. (a,b) Cepa virulenta, muco luminal excessivo, exsudato fibrinonecrótico e hemorragia de mucosa difusa acentuada; (c) Cepa atípica, muco luminal e hemorragia de mucosa multifocal moderada; (d) Controle negativo, sem lesões.

3.2.2. Lesões microscópicas

As diferenças estatísticas encontradas na análise histopatológica de cada grupo estão resumidas na Tabela 2. No grupo VIR foram encontradas lesões microscópicas com intensidades difusa acentuada, moderada e discreta em 9, 5 e 2 animais, respectivamente. Já o grupo ATYP apresentou escore elevado apenas no animal #25, que apresentou sinal clínico durante o período de avaliação. Os animais que apresentaram lesões macroscópicas na necropsia obtiveram escore moderado na microscopia (Figura 2). No grupo NEG, na análise do intestino grosso, dois animais apresentaram infiltrado inflamatório discreto, com soma dos escores igual a 1.

Na análise das secções de intestino delgado e linfonodos mesentéricos, não foram observadas alterações significativas.

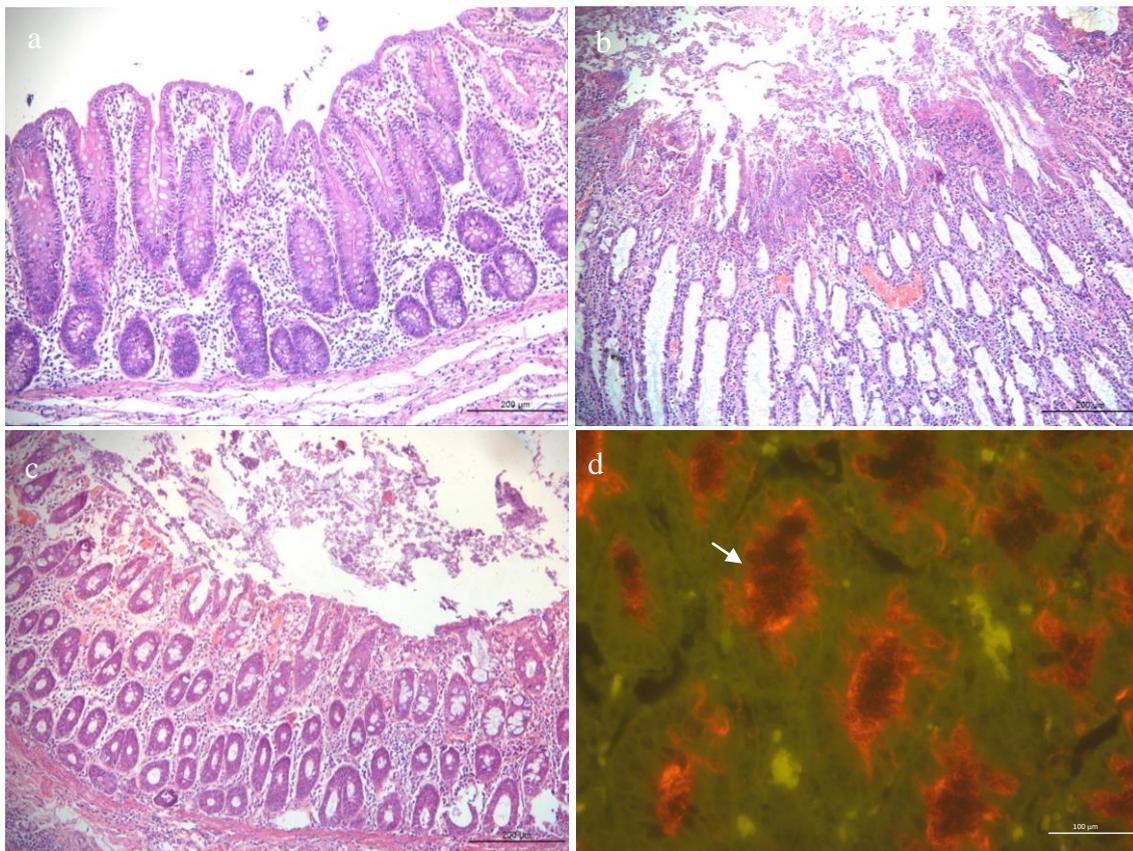


Figura 2. Lesões microscópicas no cólon de suínos inoculados com *Brachyspira hyodysenteriae*. (a) H&E – Controle negativo, ausência de lesões; (b) H&E – Cepa virulenta, hiperplasia, necrose e desprendimento do epitélio, e infiltrado inflamatório neutrofilico acentuado; (c) H&E – Cepa atípica, hiperemia, necrose e desprendimento do epitélio, infiltrado inflamatório moderado; (d) FISH – Cepa atípica, marcação de espiroquetas na borda apical e no interior de enterócitos (seta). H&E: coloração de hematoxilina e eosina; FISH: Hibridização fluorescente *in situ*.

3.2.3. Hibridização fluorescente *in situ*

Os animais que apresentaram lesões macroscópicas e microscópicas significativas foram positivos para a marcação de *B. hyodysenteriae* na técnica FISH (Tabela 1). Todos os animais restantes foram negativos.

3.3. qPCR

A primeira positividade de eliminação pela qPCR de *B. hyodysenteriae* nas fezes dos animais do grupo VIR foi do animal #2 no 5^o DPI e no último dia de avaliação, 11/16 animais foram diagnosticados por essa técnica, considerando os positivos no final do período de avaliação e os três animais que foram sacrificados antes do final do experimento. No grupo

ATYP, o animal #24 que apresentou sinal clínico no 15º DPI, foi positivo pela qPCR a partir do mesmo dia e no final do período avaliado, outros quatro animais deste grupo apresentaram positividade entre o 15º e 18º DPI (Tabela 1), incluindo o animal #20 que não apresentou lesões macro ou microscópicas, ou marcação no FISH. Os valores de qPCR variaram de $8,5 \cdot 10^3$ a $5,9 \cdot 10^8$ e $2,2 \cdot 10^2$ a $2,5 \cdot 10^7$ organismos por grama de fezes nos grupos VIR e ATYP, respectivamente. O grupo NEG não apresentou excreção pelas fezes pela análise da qPCR para *B. hyodysenteriae* durante todo o período de avaliação.

3.4. Isolamento bacteriano

O isolamento foi a técnica de detecção da *B. hyodysenteriae* mais sensível de todas as metodologias empregadas (Tabela 1). No grupo VIR o isolamento da espiroqueta foi correlacionado com o início da detecção pela qPCR no animal #2 no 5º DPI e no fim do período avaliado. Nesse grupo foram obtidos 14 isolados dos 16 animais. Já no grupo ATY, o primeiro isolado foi obtido das fezes do animal #24 no 11º DPI e um total de 7 isolamentos dos 15 animais avaliados. Nenhum crescimento de *B. hyodysenteriae* das amostras coletadas foi observado no grupo NEG em todo período avaliado.

Não foram observados crescimento de outras bactérias patogênicas, particularmente *E. coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sp., nos meios de cultivo seletivo utilizados.

4. DISCUSSÃO

Isolados atípicos de *B. hyodysenteriae* foram previamente descritos em diferentes estudos (Lysons *et al.*, 1982; Thomson *et al.*, 2001; Hampson *et al.*, 2015). Em trabalhos mais recentes, há descrições de *B. hyodysenteriae* obtidas de rebanhos aparentemente saudáveis e de animais sem sinais clínicos (Hampson *et al.*, 1992; Hampson *et al.*, 2016; La *et al.*, 2016b).

São poucos os trabalhos realizando inoculações experimentais para avaliar a patogenicidade dessas cepas. Na presente avaliação, o grupo VIR iniciou o quadro clínico de diarreia muco hemorrágica sete dias após a inoculação, com morbidade de 62,5% no 18 DPI. Esses achados corroboram o observado por Wilcock *et al.* (1979) onde sinais clínicos foram observados 7–10 DPI, com morbidade de 90% após três semanas. Três animais foram sacrificados devido às condições debilitantes causadas pela cepa VIR, demonstrando maior patogenicidade quando comparada com a cepa ATYP. Em inoculação *in vivo* em suínos com três cepas atípicas, Lysons *et al.*, 1982 não observaram sinais clínicos da doença em duas cepas utilizadas, mesmo com a colonização confirmada com a positividade nas fezes. Nesta avaliação, com a inoculação da cepa ATY apenas um animal apresentou diarreia muco hemorrágica no 15 DPI, demonstrando diferença no desencadeamento da doença clínica entre os grupos.

A patogênese da DS é complexa e pouco conhecida, principalmente pelo fato da doença ser multifatorial. A infecção depende de outras espécies de bactérias anaeróbias no intestino grosso, as quais contribuem para a colonização, induzem inflamação extensa e necrose da superfície epitelial do ceco e do cólon desencadeando a disenteria (Meyer *et al.*, 1974; Hampson

et al., 2012). Diversos fatores de virulência têm sido descritos para *B. hyodysenteriae*, incluindo quimiotaxia, motilidade, aderência, produção de hemolisina e atividade endotóxica de lipooligossacarídeo (LOS) (Hampson et al., 2010; Alvarez-Ordóñez et al., 2013).

A beta hemólise da *B. hyodysenteriae* em ágar sangue é sugerida como um dos principais indicadores de virulência de isolados clínicos de suínos (Burrough et al. 2012). Na análise do genoma completo da *B. hyodysenteriae* sete potenciais genes de hemolisinas são descritos (Bellgard et al., 2009). E o papel na patogênese da doença tem sido avaliado em diversos estudos, porém, apesar de estar associada no desencadeamento de lesões intestinais, sua atividade principalmente *in vivo*, ainda não é totalmente elucidada (ter Huurne et al., 1993; ter Huurne et al., 1994; Hyatt et al., 1994). Thomson *et al.* (2001) e Lysons *et al.* (1982), comparado cepas virulentas e potencialmente de baixa virulência, relatam fraca hemólise nas últimas. Estudos da capacidade hemolítica *in vitro* descrevem diferenças na intensidade hemolítica entre cepas de *B. hyodysenteriae* (Mahu et al., 2016). No entanto, analisando isolados recuperados de granjas aparentemente saudáveis e sem sinais clínicos de DS não são observadas diferenças genéticas e fenotípicas da hemólise em comparação aos isoladas de animais clinicamente afetados (La et al., 2016b). No presente estudo, ambos os isolados VIR e ATY apresentavam as mesmas características fenotípicas de forte hemólise em ágar sangue e genotípica pelo método MLST. Essas informações são importantes pois demonstram que a hemólise em ágar sangue e determinadas características moleculares não são suficientes para determinar a patogenicidade da *B. hyodysenteriae*.

O isolamento quando comparado a detecção pela PCR convencional é considerado padrão ouro no diagnóstico etiológico de *B. hyodysenteriae* (Råsbäck et al., 2006). No presente estudo, o isolamento da *B. hyodysenteriae* em meio de ágar seletivo também foi o que apresentou maior sensibilidade de diagnóstico, sendo positivo em 14/16 e 7/15 nos grupos VIR e ATY, respectivamente. Na necropsia, raspado de cólon foi o que apresentou maior índice de isolamento, 15 comparado com 7 do ceco. Esse achado demonstra que o isolamento consiste na melhor forma de diagnóstico da espiroqueta quando comparada com sinais clínicos, qPCR, lesões macroscópicas, histologia e FISH.

Os achados de necropsia caracterizados por colite mucoide ou muco hemorrágica e tífite muco fibrinosa são consistentes com outros estudos descrevendo as lesões de DS (Rubin et al., 2013). As lesões observadas limitaram-se ao intestino grosso, sendo mais frequentes em porções do cólon espiral e em seguida no ceco. Lesões microscópicas de inflamação, necrose, hemorragia, hiperplasia de células caliciformes e abscessos de cripta identificadas nas análises deste estudo, estão de acordo com as descritas em DS (Rubin et al., 2013; Wilcock et al., 1979). Na presente avaliação, a soma dos escores avaliados quando moderados a acentuados (>5), apresentaram correlação com a presença de lesões macroscópicas e a proporção de bactérias marcadas pela técnica FISH (Tabela 1). La et al. (2016b) relatam isolamento de *B. hyodysenteriae* em suínos sem sinais clínicos e na avaliação histológica intestinal de três animais não foram observadas lesões sugestivas de DS. No presente estudo, a presença de espiroquetas na análise histológica foi correlacionada com lesões macroscópicas e microscópicas mais acentuadas.

São escassas as informações da patogênese *in vivo* de cepas atípicas ou isoladas de animais sem sinais da doença. O isolado ATY do presente estudo foi obtido de uma granja de alto status sanitário e sem a utilização de antibióticos que poderiam mascarar sinais da doença. Na inoculação *in vivo* deste isolado foi observado que, apesar de diferenças no número de animais afetados e início dos sinais clínicos, essas cepas podem colonizar, induzir lesões e sinais clínicos característicos de DS. A concentração dos inóculos administrados e a composição da dieta de ambos os grupos foram semelhantes, sendo descartados esses fatores, considerados como principais associados ao desencadeamento da doença.

Apesar de relatado, não se sabe quanto tempo a colonização subclínica pode persistir em um plantel, levando à suposição de que outros rebanhos aparentemente saudáveis podem ser colonizados de forma semelhante, mas permanecem não diagnosticados. Fato importante, principalmente quando ocorrem em granjas de reprodutores de alto status sanitário, pois podem carrear a espiroqueta para outros rebanhos e desencadear a doença em condições em que há maiores desafios sanitários e de manejo (La et al., 2016b).

Estudos recentes (Song et al., 2015; Hampson et al., 2016) demonstram o esforço para desenvolver um teste sorológico usando proteínas recombinantes principalmente para resolver o problema dos rebanhos subclínicamente infectados. Esta poderia ser uma futura ferramenta importante para detectar rebanhos positivos de *B. hyodysenteriae* sem sinais de DS. Contudo, a variação genética e as diferenças significativas nas proteínas antigênicas são limitações significativas para o desenvolvimento de um teste sorológico globalmente aplicável (Guedes, 2017).

As hipóteses para explicar a presença da cepa ATYP isolada de animal aparentemente saudável em um rebanho sem nenhum indicativo clínico de DS, mas que desencadeou doença clínica em um animal experimentalmente inoculado no presente estudo poderiam ser: 1) pelo fato de que o plantel de origem possui alto status sanitário com menos desafios do que um rebanho comercial, fator que pode ter influenciado a colonização da espiroqueta e desenvolvimento da doença; 2) a dose mínima infectante fosse baixa ou; 3) se trata de uma cepa de baixa patogenicidade que poderia se tornar patogênica em um rebanho comercial com problemas relacionados ao fluxo de suínos, maiores desafios sanitários e densidade de suínos.

Na presente inoculação, as diferenças foram significativas em todas as variáveis analisadas. É de suma importância o desenvolvimento de estudos aprofundados sobre características patogênicas das cepas atípicas e isoladas de animais sem sinais clínicos para elucidar os mecanismos da patogênese e determinar quais métodos de diagnóstico seriam eficientes para serem empregados nas monitorias sanitárias para estabelecer procedimentos de contingência a serem adotados. Neste sentido, análises futuras que podem ser realizadas incluem avaliação do microbioma e sequenciamento do genoma completo dos dois grupos para comparação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; MARTÍNEZ-LOBO, F.J.; ARGUELLO, H.; CARVAJAL, A.; RUBIO, P. Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int J Environ Res Public Health.*, 10, p.1927-1947, 2013.
- BELLEGARD, M.; WANCHANTHUEK, P.; LA, T.; RYAN, K.; MOOLHUIZEN, P.; ALBERTYN, Z.; SHABAN, B.; MOTRO, Y.; DUNN, D.S.; SCHIBECI, D.; HUNTER, A.; BARRERO, R.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. *PLoS One*, 4(3):e4641, 2009.
- BOYE, M.; JENSEN, T.K.; MØLLER, K.; LESER, T.D.; JORSAL, S.E. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA in situ hybridization. *Mol Cell Probe.*, 12, p.323-330, 1998.
- BURROUGH, E.R. Swine dysentery—re-emergence in the United States and Canada. In: *Proceedings of 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans*. Guildford, UK: University of Surrey; p.55-56, 2013.
- BURROUGH, E.R.; STRAIT, E.L.; KINYON, J.M.; BOWER, L.P.; MADSON, D.M.; WILBERTS, B.L.; SCHWARTZ, K.J.; FRANA, T.S.; SONGER, J.G. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J Vet Diagn Invest.*, 24(6), p.1025-1024, 2012.
- CHANDER, Y.; PRIMUS, A.; OLIVEIRA, S.; GEBHART, C.J. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hampsonii*". *J Vet Diagn Invest.*, 24, p.903-910, 2012.
- GUEDES, R.M.C. Epidemiological dilemma of low pathogenic strains of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Pig333*. Feb, 2017. Disponível em: <<https://www.pig333.com/what-the-experts-say/epidemiological-dilemma-of-low-pathogenic-strains-of-brachyspira-12091/>>. Acesso em: 20 abr. 2017.
- HAMPSON, D.J.; *Brachyspiral* colitis. In: Zimmerman, J.J.; Karriker, L.A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J.; Stevenson, G.W. (editors). *Diseases of swine*. Chichester: Wiley-Blackwell, p.680–96, 2012.
- HAMPSON, D.J.; LA, T.; PHILLIPS, N.D. Emergence of *Brachyspira* species and strains: reinforcing the need for surveillance. *Porcine Health Management*, p.1-8, 2015.
- HAMPSON, D.J.; LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HOLYOAKE, P.K.; *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from apparently healthy pig herds following an evaluation of a prototype commercial serological ELISA. *Vet Microbiol.*, 191, p.15-19, 2016.
- HAMPSON, D.J.; NAGARAJA, T.G.; KENNAN, R.M.; ROOD, J.I. Gram-negative anaerobes. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Eds.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4.ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing, p.513-526, 2010.

- HAMPSON, D.J.; CUTLER, R.; LEE, B.J. Virulent *Serpulina hyodysenteriae* from a pig in a herd free of clinical swine dysentery. *Vet Rec.*, 131, p.318-319, 1992.
- HIDALGO, A.; CARVAJAL, A.; VESTER, B.; PRINGLE, M.; NAHARRO, G.; RUBIO, P. Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain, *Antimicrob Agents Chemother.*, 55, p.3330-3337, 2011.
- HYATT, D.R.; TER HUURNE, A.; VAN DER ZEIJST, B.; JOENS, L. Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect Immun.*, 62, p.2244-2248, 1994.
- JACOBSON, M.; FELLSTRÖM, C.; LINDBERG, R.; WALLGREN, P.; JENSEN-WAERN, M. Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J Med Microbiol.*, 53, p.273-280, 2004.
- JENSEN, T.K.; BOYE, M.; MØLLER, K.; LESER, T.D.; JORSAL, S.E. Association of *Serpulina hyodysenteriae* with the colonic mucosa in experimental swine dysentery studied by fluorescent in situ hybridization. *APMIS*, 106(11), p.1061-1068, 1998.
- KUNKLE, R.A.; HARRIS, D.L.; KINYON, J.M. Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol.*, 24, p.669-671, 1986.
- LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. An Investigation into the etiological agents of Swine Dysentery in Australian pig herds. *PLoS ONE* 11 (12): e0167424, 2016a.
- LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HAMPSON, D.J. Comparison of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates recovered from pigs in apparently healthy multiplier herds with isolates from herds with Swine Dysentery. *PLoS One* 11(8):e0160362, 2016B.
- LA, T.; PHILLIPS, N.D.; HARLAND, B.L.; WANCHANTHUEK, P.; BELLGARD, M.I.; HAMPSON, D.J. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol.*, 138, p.330-338, 2009.
- 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, p.3372-3375, 2003.
- LESER, T.D.; MØLLER, K.; JENSEN, T.K.; JORSAL, S.E. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly β -haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol Cell Probes.*, 11, p.363-372, 1997.
- LUNA, L.G. Routine Staining Procedures: Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. p.24-58, 1968.
- LYSONS, R.J.; LEMCKE, R.M.; BEW, J.; BURROWS, M.R.; ALEXANDER, T.J.I. An avirulent strain of *Treponema hyodysenteriae* isolated from herds free of swine dysentery. In *Proc 7th Congr Int Pig Vet Soc*, 40, 1982.

- MAHU, M.; DE PAUW, N.; VANDE MAELE, L. Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. *Vet Res.*, 47:66, 2016.
- MEYER, R.C.; SIMON, J.; BYERLY, C.S. The etiology of swine dysentery. II. Effect of a known microbial flora, weaning and diet on disease production in gnotobiotic and conventional swine. *Vet Pathol.*, 11(6), p.527-534, 1974.
- MUSHTAQ, M.; ZUBAIR, S.; RÅSBÄCK, T.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; JANSSON, D.S. *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: genomic and phenotypic characteristics. *BMC Microbiol.*, 15(1):208, 2015.
- RÅSBÄCK, T.; JANSSON, D.S.; JOHANSSON, K.; FELLSTRÖM, C. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ Microbiol.*, 4, p.983-991, 2007.
- RÅSBÄCK, T.; FELLSTRÖM, C.; GUNNARSSON, A.; ASPÁN, A. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J Microbiol Methods.*, 66(2), p.347-353, 2006.
- ROHDE, J.; KESSLER, M.; BAUMS, C.G.; AMTSBERG, G. Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet Microbiol.*, 102, p.25-32, 2004.
- RUBIN, J.E.; COSTA, M.O.; HILL, J.E.; KITTRELL, H.E.; FERNANDO, C., HUANG, Y.; O'CONNOR, B.; HARDING, J.C. Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from Swine Dysentery following experimental inoculation with "*Brachyspira hamptonii*" Strain 30446. *PLoS ONE* 8(2): e57146, 2013.
- TAYLOR, D.J.; ALEXANDER, T.J.L., The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J.*, 11, p.58-61, 1971.
- TAYLOR, D.J.; SIMMONS, J.R.; LAIRD, H.M. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec.*, 106, p.326-332, 1980.
- TER HUURNE, A.A.; MUIR, S.; VAN HOUTEN, M.; VAN DER ZEIJST, B.A.; GAASTRA, W.; KUSTERS, J.G. Characterization of three putative *Serpulina hyodysenteriae* hemolysins. *Microb Pathog.*, 16, p.269-282, 1994.
- TER HUURNE, A.A.; MUIR, S.; VAN HOUTEN, M.; KOOPMAN, M.B.; KUSTERS, J.G.; VAN DER ZEIJST, B.A.; GAASTRA, W. The role of hemolysin(s) in the pathogenesis of *Serpulina hyodysenteriae*. *Zentralbl Bakteriolog.*, 278, p.316-325, 1993.
- THOMSON, J.R.; SMITH, W.; MURRAY, B.P.; MURRAY, D.; DICK, J.E.; SUMPTION, K.J. Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. *Anim Health Res Rev.*, 2, p.31-36, 2001.
- THOMSON, J.R.; FRIENDSHIP, R.M. Diseases of the Digestive System. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L.A.; et al. (Eds.). *Diseases of Swine*. 10. ed., Ames, Iowa: Blackwell Publishing, p.199-226, 2012.

WILLS, R.W. Diarrhea in growing-finishing swine. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 16, p.135-161, 2000.

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(4), p.450-465, 1979.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A disenteria suína é uma doença emergente no Brasil, presente nas principais regiões produtoras de suínos do país. Com a tipificação através da técnica de sequenciamento de múltiplos locus gênicos (MLST) das amostras brasileiras de *B. hyodysenteriae* foram observados perfis genéticos distintos dos já descritos no banco de dados moleculares para o gênero *Brachyspira* no mundo. Além disso, os isolados dos diversos estados brasileiros obtidos em diferentes períodos de tempo apresentaram conexão epidemiológica, demonstrando que a transmissão do agente ocorreu entre as diferentes regiões.

A caracterização da estirpe de *B. hyodysenteriae* isolada de um rebanho sem sinais clínico demonstrou não haver diferenças moleculares na tipificação através da análise MLST. Porém, na inoculação experimental de suínos com a cepa atípica comparada com um isolado patogênico, foram observadas diferenças entre os grupos no início dos sinais clínicos, número de animais afetados e lesões macroscópicas e microscópicas. Os resultados confirmam diferenças na patogenicidade entre cepas isoladas de animais sadios e com disenteria.

Estudos futuros com o sequenciamento do genoma completo e microbioma fecal dos animais inoculados com essas estirpes de *B. hyodysenteriae* atípicas e patogênicas são necessários para elucidar possíveis diferenças moleculares entre esses isolados.