

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

**Diversidade microbiana intestinal de  
suínos saudáveis e afetados por disenteria  
suína e enteropatia proliferativa.**

**AMANDA GABRIELLE DE SOUZA DANIEL**

Belo Horizonte/ MG  
Escola de Veterinária – UFMG  
2018

**Amanda Gabrielle de Souza Daniel**

**Diversidade microbiana intestinal de suínos saudáveis e afetados por disenteria suína e enteropatia proliferativa.**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Roberto M. C. Guedes  
Co-orientadores: Prof. Dr. Felipe Pierezan e  
Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes  
Área de concentração: Patologia Animal

Belo Horizonte/ MG  
Escola de Veterinária – UFMG  
2018

D184d Daniel, Amanda Gabrielle de Souza, 1987-  
Diversidade microbiana intestinal de suínos saudáveis e afetados por disenteria suína e enteropatia proliferativa = *Intestinal microbial diversity of healthy or by swine dysentery and proliferative enteropathy affected pigs* / Amanda Gabrielle de Souza Daniel. – 2018. 118 p. : il.

Orientador: Roberto M. C. Guedes  
Co-orientadores: Felipe Pierezan, Álvaro Cantini Nunes  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias  
Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Diarreia em animais – Teses. 3. Intestinos – Infecções – Teses. I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II. Pierezan, Felipe. III. Nunes, Álvaro Cantini. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias. V. Título.

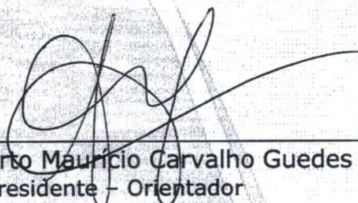
CDD – 635.408 96

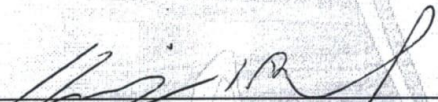
## FOLHA DE APROVAÇÃO

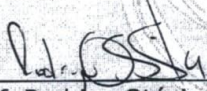
**AMANDA GABRIELLE DE SOUZA DANIEL**

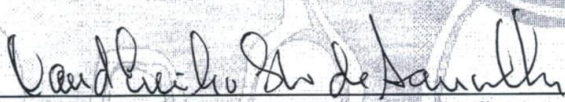
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em PATOLOGIA ANIMAL.

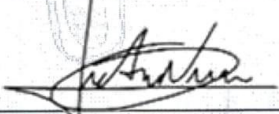
Aprovada em 14 de Março de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Henrique César Pereira Figueiredo  
Escola de Veterinária - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Rodrigo Otávio Silveira Silva  
Escola de Veterinária - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. David Emílio Santos Neves de Barcellos  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fábio Augusto Vannucci  
University of Minnesota - USA



“O importante é não parar de questionar.  
A curiosidade tem seu próprio  
motivo de existência.  
Não se pode deixar de admirar  
quando contempla os mistérios  
da eternidade, da vida,  
da maravilhosa estrutura  
da realidade...  
Nunca perca uma curiosidade sagrada ”.  
*Albert Einstein, Revista Life, 1955.*



## AGRADECIMENTOS

Eu sempre falo que o doutorado é um casamento. São quatro anos dos quais você tem inicialmente um momento de empolgação, alguns problemas durante o percurso, alguns testes que te fazem questionar se você está no caminho certo, mas quando olha para o passado e você vê quanta coisa boa foi vivida, o quanto você aprendeu e amadureceu, faz todo esse tempo valer muito a pena.

Queria agradecer primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida que sempre estiveram comigo e me deram força para continuar a minha caminhada.

Aos animais que são instrumento do nosso trabalho e que nos fazem acreditar quão a natureza é maravilhosa.

Aos meus pais Maria e Paulo e meu irmão Matheus por serem a razão da minha vida, por me apoiarem em todos os meus sonhos e me amarem acima de tudo.

Aos meus familiares por compartilharem momentos da vida e desde sempre estarem ao meu lado.

À Laís, Cynthia, Karina e Camila por serem a luz quando eu não consigo enxergar, por serem os lenços que secam minhas lágrimas e em todos os momentos o motivo do meu sorriso, minhas companheiras para todos os momentos de maluquices e devaneios.

Aos meus amigos queridos, Juliana, Luiz, Priscila, Tatiane, Diogo, Vitor, Anni, Lorena, Daniel, Beatriz por serem pessoas muito especiais que conheci na minha vida.

Aos meus companheiros de banda que me fizeram acreditar mais em mim e ser a minha melhor versão sempre.

Ao José Paulo Sato meu irmão de trabalho e do coração dos quais dividimos aprendizado, muitos momentos de trabalho além de muitas alegrias das quais sinto muita saudade.

A todos os funcionários da universidade que me ajudaram, sou muito agradecida, em especial o Tião dos equinos, João da lavanderia, todos os funcionários do galpão de experimento.

A todos os funcionários do laboratório de patologia em especial Leimar, Natália, Mariana e Luiz por toda ajuda e carinho.

Ao professor Henrique Figueiredo e seus alunos em especial Fernanda e Felipe dos quais fizeram parte desse trabalho e foram essenciais para o experimento.

Aos meus coorientadores professor Felipe Pierezan e Álvaro Cantini pelos ensinamentos.

Aos alunos da Patologia e irmãos desses sete anos de convivência dos quais sentirei muita falta. Ao grupo de laboratório que tanto amo dos quais dividi muitos momentos de trabalho e lazer em especial, Mariana, Javier, Michelle, Carlos, Luísa, Amanda, Marianne, Camila, Paula, Thaire, Myrta, Lucas, Ricardo e Lourença.

À Professora Connie Gebhart por todos os ensinamentos, seu carinho e o sorriso no rosto em todos os dias que estive em seu laboratório.

À Erika e Lacey por toda ajuda durante minha visita em seu laboratório e em especial à Talita por ser uma grande amiga e minha melhor conselheira da vida toda, minha irmã e minha mãe quando eu precisei uma inspiração para buscar o que eu tenho de melhor em mim e um grande presente que a patologia me deu na vida.

Aos presentes que Minnesota me deu, Karine, Julia, David, Zana, Ritty e Taulant, pessoas das quais aprendi muito, vivi muitos momentos especiais e deixaram saudades quando voltei para o Brasil.

A todos os professores do departamento de patologia que foram essenciais para minha formação.

A todos os professores que foram uma inspiração e fonte de sabedoria em especial professor David Barcellos e professor Fábio Vannucci que foram especiais para minha formação tanto como mestre quanto como doutora.

Ao professor Roberto Guedes, por ser o melhor orientador que eu poderia ter durante essa caminhada, por todo apoio em todas as minhas decisões e por ser um mestre para todos seus alunos e exemplo de pessoa.

Ao final queria agradecer à Melicia que me deixou esse ano, mas estive ao meu lado por 17 anos da minha vida e se não fosse pelo grande amor que eu tinha por ela eu nunca teria me tornado veterinária.



---

## SUMÁRIO

---

AGRADECIMENTOS.....	7
SUMÁRIO.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
Tabela 1. Detalhamento das amostras utilizados no Capítulo 1 separadas por estado e granjas avaliadas.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	14
RESUMO .....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. HIPÓTESES .....	18
3. OBJETIVOS.....	18
a. Gerais .....	18
b. Específicos .....	19
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
5. ASPECTOS RELACIONADOS À MICROBIOTA INTESTINAL .....	19
5.1 METAGENÔMICA.....	19
5.2 ALFA E BETA DIVERSIDADE.....	20
5.3 FUNÇÕES DA MICROBIOTA .....	20
5.4.1 FUNÇÕES METABÓLICAS.....	20
5.4.2 FUNÇÃO PROTETORA.....	21
5.4.3 FUNÇÕES TRÓFICAS .....	21
5.5 COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA FECAL DE SUÍNOS.....	21
5.6 A MICROBIOTA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO .....	22
5.7 COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA NAS DIFERENTES PORÇÕES DO INTESTINO .....	23
5.8 COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA ENTRE OS MAMÍFEROS .....	23
5.9 COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA COMPARANDO RAÇAS DE SUÍNOS .....	24
5.10 EFEITOS DOS ANTIMICROBIANOS NA COMPOSIÇÃO MICROBIOMA .....	24
5.11 EFEITOS DA DIETA SOBRE O MICROBIOMA .....	24
5.12 EFEITOS DOS PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL DE SUÍNOS .....	25
5.13 USO DE ADITIVOS NA RAÇÃO E VARIAÇÃO DA MICROBIOTA .....	25
5.14 ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA DE ACORDO COM ESTADO DE SAÚDE .....	25
5.15 ANÁLISE FUNCIONAL DO MICROBIOMA SUÍNO.....	26

6.	DISENTERIA SUÍNA .....	26
6.1	FILO SPIROCHAETES .....	26
6.2	GÊNERO <i>Brachyspira</i> .....	26
6.3	ESPÉCIES PRESENTES NO GÊNERO <i>Brachyspira</i> .....	27
6.4	CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS DA <i>Brachyspira</i> .....	28
6.5	DISENTERIA SUÍNA .....	28
6.6	ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	29
6.7	PATOGÊNESE .....	29
6.8	INFLUÊNCIA DA DIETA .....	30
6.9	INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA .....	31
6.10	FATORES DE VIRULÊNCIA .....	32
6.11	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	33
6.12	DIAGNÓSTICO.....	35
6.13	RESPOSTA IMUNE.....	36
6.14	VACINAS .....	37
6.15	TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA .....	38
6.15.1	USO DE ANTIMICROBIANOS.....	38
6.15.2	PROGRAMAS DE ERRADICAÇÃO E CONTROLE .....	39
7.	ENTEROPATIA PROLIFERATIVA.....	40
7.1	SINAIS CLÍNICOS .....	40
7.2	ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	41
7.3	PATOGÊNESE .....	41
7.4	FISIOPATOLOGIA DA DIARREIA PELA <i>L. intracellularis</i> .....	43
7.5	INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA SUÍNA .....	43
7.6	FATORES DE VIRULÊNCIA .....	43
7.7	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	44
7.8	DIAGNÓSTICO.....	45
7.9	RESPOSTA IMUNE.....	46
7.10	TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA .....	47
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
10.	CAPÍTULO 1 - ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ANIMAIS À CAMPO COM QUADROS DE DISENTERIA SUÍNA.....	72
10.1	RESUMO .....	72

10.2 INTRODUÇÃO .....	72
10.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	73
10.3.1 AMOSTRAS .....	73
10.3.2 SEQUENCIAMENTO 16S .....	73
10.3.3 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	74
10.3.4 PIPELINE DE CLASSIFICAÇÃO METAGENÔMICA.....	74
10.3.5 ANÁLISES DE DIVERSIDADE ALPHA E BETA .....	74
10.4 RESULTADOS .....	75
10.5 DISCUSSÃO .....	76
10.6 CONCLUSÃO .....	79
10.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
11. Capítulo 2 – EFEITO DA COINFEÇÃO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS E <i>Brachyspira</i> <i>hyodysenteriae</i> SOBRE O QUADRO ANATOMOPATOLÓGICO E DIVERSIDADE MICROBIANA.....	83
11.1 RESUMO .....	83
11.2 INTRODUÇÃO .....	84
11.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	85
11.3.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	85
11.3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO.....	85
11.3.2.1 <i>Lawsonia intracellularis</i> .....	85
11.3.2.2 <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> .....	85
11.3.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	85
11.3.5 PCR QUANTITATIVO .....	86
11.3.6 PATOLOGIA.....	86
11.3.7 ISOLAMENTO BACTERIANO.....	86
11.3.8 HISTOPATOLOGIA.....	87
11.3.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	87
11.4 MICROBIOMA INTESTINAL .....	87
11.4.1 AMOSTRAS .....	87
11.4.2 SEQUENCIAMENTO 16S .....	87
11.4.3 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	88
11.4.3.1 PIPELINE DE CLASSIFICAÇÃO METAGENÔMICA .....	88
11.4.3.2 ANÁLISES DE DIVERSIDADE ALPHA E BETA .....	89
11.4.3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	89
11.5 RESULTADOS .....	89

11.5.1 SINAIS CLÍNICOS .....	89
11.5.2 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS .....	90
11.5.2.1 LESÕES MACROSCÓPICAS .....	90
11.5.2.2 LESÕES MICROSCÓPICAS.....	91
11.5.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	94
11.5.4 ISOLAMENTO BACTERIANO.....	94
11.5.5 qPCR .....	96
11.5.6 MICROBIOMA.....	97
11.6 DISCUSSÃO .....	100
11.7 CONCLUSÃO .....	108
11.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
13. ANEXO 1. DETALHAMENTO DE PRIMERS, ADAPTADORES E CÓDIGO DE BARRAS DESENVOLVIDOS PARA MÉTODO FUSION DE SEQUENCIAMENTO. ....	114
14. ANEXO 2. DETALHAMENTO DAS AMOSTRAS UTILIZADOS NO CAPÍTULO 1 SEPARADAS POR ESTADO E GRANJAS AVALIADAS.....	116
15. ANEXO 3. TABELAS SUPLEMENTARES CAPÍTULO 2 .....	118

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

BRA- *Brachyspira*  
°C- Celsius  
CO- Coinfecção  
DS- Disenteria Suína  
EPS- Enteropatia Proliferativa Suína  
FISH- *Fluorescent in Situ Hybridization*  
GTA- *Gene Transfer Agent*  
IPMC- Imunoperoxidase Em Monocamada De Células  
LAW- Lawsonia  
LOS- Lipooligossacarídeo  
LPS- Lipopolissacarídeo  
MALDI-TOF- *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization*  
MIC- *Minimum Inhibitory Concentration*  
ML- Mililitro  
MLEE- *Multilocus Enzyme Electrophoresis*  
MLST- *Multilocus Sequence Typing*  
MLVA- *Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*  
µM- Micromolar  
NEG- Negativo  
NOX- NADH Oxidase  
pb- Pares De Bases  
PCR- Reação Em Cadeia Da Polimerase  
PED- Diarreia Epidêmica Suína  
PFGE- *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*  
PGM- *Personal Genome Machine*  
qPCR- Reação Em Cadeia Da Polimerase Quantitativa  
RAPD- *Random Amplified Polymorphic Dna*  
REA- *Restriction Endonuclease Analysis*  
RFLP- *Restriction Fragment Polymorphism*  
SFB- Soro Fetal Bovino  
SPG- Sacarose Fosfato Glutamato  
TSA- Agar Trypticase De Soja  
UFMG- Universidade Federal De Minas Gerais  
VFA- Ácidos Graxos Voláteis  
µl- Microlitro

---

## LISTA DE TABELAS

---

- Capítulo 2

Tabela 1. Escore histopatológico com o p valores encontrados nas comparações por grupo, os números em cinza representam os grupos com diferença estatística  $p \leq 0,05$  91

Tabela 2. Tabela resultados do microbioma fecal avaliados e grupos taxonômicos com diferença estatísticas significativas separados por grupo  $p \leq 0,05$ . 97

- Anexo 1

Tabela 1. Detalhamento de Primers, adaptadores e código de barras desenvolvidos para método Fusion de sequenciamento. 114

- Anexo 2

Tabela 1. Detalhamento das amostras utilizados no Capítulo 1 separadas por estado e granjas avaliadas. 116

-Anexo 3 Tabelas suplementares Capítulo 2

Anexo 3.1 Tabela. Escore fecal com a média do somatório das fezes, as letras (abc) indicam diferença estatística  $p \leq 0,05$  118

Anexo 3.2 Tabela Resultados de qPCR comparando a eliminação do agente nas fezes, as letras “a,b” indicam diferença estatística  $p \leq 0,05$ . 118

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### - Capítulo 1

Figura 1. a) Curvas de rarefação comparando a diversidade alfa (chao1) de amostras de microbiota de suíno com disenteria (linha rosa) e sem disenteria (linhas laranja). Não foram observadas diferenças significativas nas riquezas entre os grupos (valor  $p = 0,5385$ ). b) Curvas de rarefação comparando a diversidade alfa representada em blocos de amostras negativas à esquerda e positivas à direita sendo observada uma menor diversidade no grupo. 75

Figura 2. Gráficos de barras empilhadas que representam abundância proporcional de gênero principal em animais positivos à esquerda e negativos a direita. Foi observado um aumento na abundância relativa de *Anaerovorax* ( $p=0,0003$ ), *Mogibacterium* ( $p=0,015836616$ ) e *p-75-a5* ( $p=0,035162298$ ) nos animais positivos. Para animais que sem disenteria suína foram significativamente abundantes os gêneros *Bifidobacterium* ( $p=0,001050158$ ), *Coprococcus* ( $p=0,011068016$ ), *Dialister* ( $p=0,033948426$ ), *Fibrobacter* ( $p=0,008252059$ ), *Rummeliibacillus* ( $p=0,003074603$ ) e *Streptococcus* ( $p=0,000199714$ ). 76

Figura 3. Análise de coordenadas principais. As cores correspondem os grupos feita por Unifrac das comunidades microbianas associadas nas fezes. Uma matriz de distância de diversidade beta foi calculada para gerar o gráfico de diversidade de amostras de microbiota de suíno nos grupos positivo e negativo. 78

### - Capítulo 2

Figura 1. Média de escore fecal entre os dias 0 a 21 dpi nos grupos coinfeção (CO), *B. hyodysenteriae* (BRA) *L. intracellularis* (LAW) Negativo (NEG) (\*)  $p$  valor  $\leq 0,05$ . 89

Figura 2. Média de escore histopatológico nos grupos coinfeção (CO), *B. hyodysenteriae* (BRA) *L. intracellularis* (LAW) e Negativo (NEG). 92

Figura 3. Lesões macroscópicas observadas na necrópsia. (a) Animal grupo CO apresentando edema de mesocólon acentuado; (b,c) Animais do grupo CO apresentando colite catarral fibrinonecrohemorrágica difusa grave ; (d) Animal grupo BRA demonstrando área necrose multifocal associada à fibrina e hemorragia multifocal moderada; (e, f) Animal grupo BRA com colite catarral hemorrágica difusa grave, em destaque (pinça) excesso de muco associado a conteúdo hemorrágico. (g) Animal grupo LAW apresentando hiperemia moderada de na serosa do cólon; (h) animal grupo LAW sem lesão; (i) Animal grupo NEG sem lesão. 93

Figura 4. Média dos escores de imuno-histoquímica para *L. intracellularis* por grupo, as letras “a,b” indicam diferença estatística  $p \leq 0,05$  94

Figura 5. Média de isolamento de *B. hyodysenteriae* por grupo separados por segmento as letras “a,b” indicam diferença estatística  $p \leq 0,05$ . 94

Figura 6. Lesões microscópicas no intestino de suínos inoculados com *Brachyspira hyodysenteriae*. (a,b) HeE – (intestino grosso<sup>a</sup>, intestino delgado<sup>b</sup>) (NEG), ausência de lesões; (c) HeE – (intestino grosso) (LAW) hiperplasia de enterócitos moderada (200X) (d) HeE – (BRA) hiperplasia acentuada de células caliciformes associada a necrose superficial, infiltrado neutrofílico acentuado (colite catarral fibrinonecrótica difusa grave) (100X) (e, f) HeE – (CO) (e) intestino grosso hiperplasia de enterócitos acentuada com diminuição de células caliciformes (200X) (f) (intestino grosso) hiperplasia acentuada de células caliciformes associada a necrose acentuada difusa associado infiltrado neutrofílico acentuado (colite catarral fibrinonecrótica difusa grave (100X). 95

- Figura 7. Imuno-histoquímica de suínos experimentalmente infectados com *L. intracellularis*, 21dpi. (a) Grupo (CO) Imunomarcação em enterócitos de criptas (400X); (b) (LAW) Imunomarcação em enterócitos de criptas e macrófagos na lamina própria do íleo utilizando AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) (200X). 96
- Figura 8. Resultados de qPCR comparando a média de eliminação do agente nas fezes nos grupos coinfeção (CO) em azul, *B. hyodysenteriae* (BRA) em vermelho, *L. intracellularis* (LAW) em amarelo e Negativo (NEG) em verde. 96
- Figura 9. Gráficos de barras empilhadas que representam abundância proporcional de gênero principal em animais dos grupos LAW à esquerda e BRA à direita. Foi observada maior abundância relativa de *Parabacteroides* ( $p=0.012886830493507$ ) em BRA e *Streptococcus* ( $p=0.012886830493507$ ) em LAW. 101
- Figura 10. Gráficos de barras empilhadas que representam abundância proporcional de gênero principal em animais CO à esquerda e BRA a direita. Foi observada maior abundância relativa de *Prevotella* ( $p=0.012879064669346$ ), *Fusobacterium* ( $p=0.0355240368313795$ ), *Lactobacillus* ( $p=0.0149386031285565$ ), *p-75-a5* ( $p=0.0474483843880802$ ) nos animais do grupo CO e no grupo BRA maior abundância de *Clostridium* ( $p=0.010705311873033$ ). 102
- Figura 11. Gráficos de barras empilhadas que representam abundância proporcional de gênero principal em animais CO à esquerda e LAW a direita. Foi observada maior abundância relativa de *Prevotella* ( $p=0.00196463024569095$ ), *Anaerovibrio* ( $p=0.0256783417053815$ ), *Bacteroides* ( $p=0.00187902637312587$ ), *Butyricimonas* ( $p=0.00197139594296633$ ), *Campylobacter* ( $p=0.00342874651022508$ ), *Catenibacterium* ( $p=0.027559127653885$ ), *Desulfovibrio* ( $p=0.0256547699171202$ ), *Fusobacterium* ( $p=0.00631375918655783$ ), *Oscillospira* ( $p=0.0351950848989481$ ), *p-75-a5* ( $p=0.00153997525783769$ ), *Parabacteroides* ( $p=0.00704657239034717$ ) no grupo CO e *Eubacterium* ( $p=0.00279865510717577$ ), *Dialister* ( $p=0.010705311873033$ ), *Lactobacillus* ( $p=0.00175250848921009$ ), *Megasphaera* ( $p=0.00248543353268081$ ), *Odoribacter* ( $p=0.00142985438326551$ ), *Shuttleworthia* ( $p=0.0238202172795873$ ), *Streptococcus* ( $p=0.0149386031285565$ ) no grupo LAW. 103
- Figura 12. Gráficos de barras empilhadas que representam abundância proporcional de gênero principal em animais CO à esquerda e NEF à direita. Foi observado maior a abundância relativa de *Eubacterium* ( $p=0.037417959614756$ ), *Lactobacillus* ( $p=0.0127092847550734$ ), *Megasphaera* ( $p=0.0301176534687101$ ), *Odoribacter* ( $p=0.000422760407398187$ ), *Shuttleworthia* ( $p=0.0127092847550734$ ) no grupo NEG e *Prevotella* ( $p=7,77198751354089E-09$ ), *Anaerovibrio* ( $p=0.0028415273840731$ ), *Bacteroides* ( $p=0.00860879727082779$ ), *Butyricimonas* ( $p=0.01045624760529$ ), *Clostridium* ( $p=0.0474483843880802$ ), *Desulfovibrio* ( $p=0.00594276612246729$ ), *Fusobacterium* ( $p=0.00631375918655783$ ), *p-75-a5* ( $p=0.00153997525783769$ ) no grupo CO. 104
- Figura 13. Análise de coordenadas principais. As cores correspondem os grupos feita por Unifrac das comunidades microbianas associadas nas fezes. Uma matriz de distância de diversidade beta foi calculada para gerar o gráfico de diversidade de amostras de microbiota de suíno aos 21 dias pós infecção comparando os grupos coinfeção e negativo. É possível observar nos círculos demarcados a formação de um cluster próximo no grupo coinfeção. 105



## RESUMO

Esta tese foi organizada em dois capítulos, ambos avaliando o microbioma fecal de animais acometidos por enfermidades entéricas. O primeiro capítulo teve o objetivo de avaliar a microbiota das fezes coletadas de animais à campo com disenteria suína. Foi aplicada a técnica de sequenciamento de nova geração da região hipervariável V4 do rRNA 16S em fezes de 37 animais negativos e 32 animais positivos para *B. hyodysenteriae*, obtidas de submissões diagnósticas que ocorreram entre 2012 e 2016. O gênero foi o único grau taxonômico com diferenças significativas, observando-se maior abundância relativa de *Anaerovorax*, *Mogibacterium* e *p-75-a5* em animais positivos e *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Fibrobacter*, *Rummeliibacillus* e *Streptococcus* em animais negativos. O segundo capítulo teve como objetivo avaliar o quadro clínico, alterações anatomopatológicas, eliminação nas fezes e o microbioma intestinal de animais inoculados por *Brachyspira hyodysenteriae* e *Lawsonia intracellularis*, em infecção individual e coinfeção. Foram utilizados 45 leitões de cinco semanas de idade separados em quatro grupos: coinfeção (*Brachyspira hyodysenteriae* e *Lawsonia intracellularis*), *B. hyodysenteriae*, *L. intracellularis* e controle negativo. Utilizando o método "Fusion" pelo kit Ion Torrent 16S Metagenomics, o DNA extraído das fezes dos dias -5 e 21 foram amplificados com alvo na região hipervariável V4 do gene 16S rRNA e sequenciados associado a avaliação clínica e anatomopatológica completa, qPCR, imuno-histoquímica e isolamento bacteriano. O grupo coinfeção apresentou um quadro mais grave quanto início dos sinais clínicos, número de animais afetados e gravidade das lesões macro e microscópicas. Foi possível observar maior abundância relativa com diferença estatística em comparação com os demais grupos para os gêneros *Prevotella*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Butyrivimonas*, *Desulfovibrio*, *Fusobacterium* e *p75-a5* no grupo CO, maior abundância de *Clostridium* no grupo BRA. No grupo LAW, *Megasphaera* e *Dialister* foram estatisticamente significantes e *Odoribacter* para o grupo NEG. É possível concluir que existe uma alteração da microbiota à nível de gênero em animais naturalmente e experimentalmente infectados com diferenças significativas quanto à expressão do quadro clínico em animais do grupo coinfeção.

Palavras-Chave: Microbioma fecal, diarreia, *B. hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis*, coinfeção.

## ABSTRACT

*The thesis was organized in two chapters, in both chapters fecal microbioma in pigs affected by enteric diseases was evaluated. The first chapter aimed to assess the fecal microbioma from animals in herds affected with swine dysentery. The new generation sequencing of 16S rRNA region was applied in 37 negative and 32 positive B. hyodysenteriae pig feces submitted to the diagnostic laboratory between 2012 and 2016. The genus was the only taxonomic level with significant differences between negative and positive animals. Relative great abundance of Anaerovorax, Mogibacterium and p-75-a5 was observed in B. hyodysenteriae positive pigs and Bifidobacterium, Coprococcus, Dialister, Fibrobacter, Rummeliibacillus and Streptococcus in negative animals. The second chapter aimed to evaluate clinical signs, anatomopathological changes, fecal shedding and intestinal microbioma composition of animals inoculated with either B. hyodysenteriae or Lawsonia intracellularis and both agents. Forty-five-week-old piglets were divided in four groups: co-infection with B. hyodysenteriae and L. intracellularis, B. hyodysenteriae alone, L. intracellularis alone and negative control. Using the "Fusion" method by Ion Torrent 16S Metagenomics kit, the DNA extracted from feaces in (-5) and (21) dpi were amplified and sequenced using V4 region of 16S rRNA region. The clinical and anatomopathological evaluation, qPCR, immunohistochemistry and bacterial isolation were also performed and significant differences were observed among groups. The beginning of clinical signs, number of affected animals and severity of macro and microscopic lesions were higher in the co-infected group coinfection. It was possible to observe greater relative abundance with statistical difference in comparison with the other groups for the genera Prevotella, Anaerovibrio, Bacteroides, Butyrivibrio, Desulfovibrio, Fusobacterium and p75-a5 in the CO group, a greater abundance of Clostridium in BRA group. In the LAW group, Megasphaera and Dialister were statistically significant and Odoribacter for the NEG group. It is possible to conclude that there is a change in the microbiota at the genus level in naturally and experimentally infected animals and for experimentally inoculated animals there are significant differences regarding the expression of the clinical signs in animals from the coinfection group.*

**Key-Words:** Fecal Microbiome, diarrhea, *B. hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis*, co-infection.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o quarto maior produtor de carne suína do mundo, com exportação de 732,9 mil toneladas para 89 países e produção anual por volta de 3.731 mil de toneladas. O atual patamar em que se encontra o país tem como responsáveis os satisfatórios índices zootécnicos que a cadeia produtiva conquistou por anos (ABPA, 2017). Dentre os fatores limitantes da produção de suínos, a entrada de enfermidades nos rebanhos é responsável por perdas econômicas consideráveis, devido aos gastos com antimicrobianos e perda de desempenho dos animais (Jacobson et al., 2005).

Nas fases finais do sistema de produção, as doenças entéricas e respiratórias são os desafios sanitários mais relevantes (Guedes, 2010). Os principais agentes etiológicos causadores de diarreias nessa fase são *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp. e *Lawsonia intracellularis* (Thomson & Friendship, 2012; Zlotowski et al., 2008).

*Brachyspira hyodysenteriae* é o agente etiológico da disenteria suína, enfermidade caracterizada por diarreia muco hemorrágica presente em vários países com expressiva produção de suínos no mundo (Taylor & Alexander, 1971; Stanton, 2006). Nos últimos anos, tem sido observada a reemergência de casos clínicos (Clothier et al., 2011) e no Brasil desde 2010, novos surtos desta doença têm sido relatados (Daniel et al., 2017).

*L. intracellularis* é o agente causador da enteropatia proliferativa suína EPS que cursa com diarreia, com mortalidade de animais com maior frequência em idade próxima ao abate e com diminuição do ganho de peso em animais mais jovens (Lawson et al., 1993; McOrist et al., 1995). A EPS possui distribuição mundial, é considerada a doença entérica com maior incidência e a principal causa de diarreia nas fases finais do sistema de produção (Jacobson et al., 2003; Merialdi et al., 2003; Pedersen et al., 2012; Dors et al., 2015; Resende et al., 2015).

Apesar do considerável número de pesquisas sobre a patogênese das duas enfermidades, os processos são pouco conhecidos, principalmente referindo-se à capacidade de colonização e interação entre os patógenos e as células do hospedeiro.

Foi demonstrado, em modelos de inoculação em animais gnotobióticos, possuem menor susceptibilidade à infecção por *L. intracellularis* e *B. hyodysenteriae*; no entanto, o papel da microbiota é pouco conhecido (Meyer, et al., 1974; Meyer, et al., 1975; Harris, et al., 1978; Whipp, et al., 1979; McOrist et al., 1993, 1994). Com esse conhecimento em mãos, será possível trabalhar com esses microrganismos ou mesmo dietas moduladoras que tornem os animais mais resistentes a esses agentes de importância mundial.

## 2. HIPÓTESES

1. Existe diferença na composição da microbiota fecal de animais saudáveis e naturalmente infectados por *B. hyodysenteriae* e com quadro clínico causado pelo agente.
2. Existe diferença de expressão de doença clínica, lesões anatomopatológicas, microbiota e excreção de *B. hyodysenteria* entre animais experimentalmente infectados somente pela *L. intracellularis*, somente pela *B. hyodysenteriae* e em quadros de coinfeção com esses dois agentes.

## 3. OBJETIVOS

### a. Gerais

1. Determinar a composição da microbiota fecal de suínos saudáveis e naturalmente acometidos pela disenteria suína.
2. Determinar a composição da microbiota fecal, sinais clínicos, lesões anatomopatológicas, excreção nas fezes em animais saudáveis e animais experimentalmente infectados com *B. hyodysenteriae* e/ou *L. intracellularis*;

## **b. Específicos**

1. Com a técnica de sequenciamento de nova geração, determinar os grupos bacterianos presentes nas fezes de suínos com disenteria suína, enteropatia proliferativa suína, co-infectados e saudáveis comparando diversidade e incidência de certos grupos microbianos;
2. Com as sequências gênicas obtidas, avaliar a diversidade da microbiota bacteriana fecal entre animais doentes e saudáveis ao comparar com sequências disponíveis nos bancos de dados;
3. Comparar a microbiota, grau de lesão, sinais clínicos e curso da doença em suínos experimentalmente inoculados com cepas patogênicas de *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*, isoladamente ou em associação.

## **4. REVISÃO DE LITERATURA**

As doenças bacterianas são frequentes e importantes causas de prejuízos no sistema de produção de suínos, além de fortemente relacionadas ao aumento nos custos com antimicrobianos, perda de desempenho e mortalidade dos animais acometidos (Holland, 1990).

Dentre as doenças entéricas mais importantes que acometem animais nas fases de recria e terminação podemos destacar, a enteropatia proliferativa suína EPS causada pela *Lawsonia intracellularis* e a disenteria suína DS causada pela *Brachyspira hyodysenteriae* (Hampson, 2012; McOrist & Gebhart, 2012). Apesar de serem microrganismos distantes evolutivamente, os mesmos possuem capacidade de colonizar o mesmo ambiente. Um fator comum importante a se destacar, é a relação desses microrganismos com a microbiota demonstrada em trabalhos anteriores com ausência de sinais clínicos quando inoculados em animais gnotobióticos (Meyer, et al., 1974; Meyer, et al., 1975; Harris, et al., 1978; Whipp, et al., 1979; McOrist et al., 1993, 1994).

Nesta revisão serão abordados aspectos relacionados à microbiota intestinal de suínos e classificação, patogênese, epidemiologia, controle e profilaxia dos agentes causadores da EPS e DS.

## **5. ASPECTOS RELACIONADOS À MICROBIOTA INTESTINAL**

O trato gastrointestinal dos suínos abriga uma diversificada população de microrganismos, incluindo, fungos, bactérias e arqueas que mantêm uma complexa interação com o hospedeiro (Isaacson e Kim, 2012). Esta interação é proveniente de uma co-evolução (Ley et al., 2006) resultante da simbiose entre as partes (Dubos et al., 1965). As funções exercidas e a estrutura dessas comunidades microbianas tem recebido uma atenção significativa ao longo de décadas. No entanto, antes do advento da biologia molecular, não era possível acessar facilmente os microrganismos que não eram cultiváveis (Woese e Fox, 1977; Fox et al., 1980; Schuster, 2007).

Ao utilizar o sequenciamento do gene 16S rRNA, houve um aumento substancial do volume de dados, verificação da composição das comunidades microbianas e a observação da diversidade dos mesmos (Woese e Fox, 1977; Fox et al., 1980; Ley et al., 2008). O rRNA 16S é um dos genes conservados em arqueas e bactérias com regiões variáveis que permitem a determinação das espécies (Woese e Fox, 1977; Fox et al., 1980). Através do sequenciamento genômico, foi possível uma melhor exploração das informações quanto à composição, a distribuição da microbiota, a diversidade e as suas funções relacionadas ao hospedeiro (Schuster, 2007; Isaacson e Kim, 2012; Van Dijk et al., 2014).

### **5.1 METAGENÔMICA**

Sabendo que uma grande parte da população microbiana é ainda incultivável, a metagenômica tem grande importância na avaliação do papel de determinados organismos que anteriormente não eram identificados (Brady, 2007; Achtman, 2008; Moore, et al., 2010). A

comparação de comunidades microbianas é feita principalmente pela amplificação e análise do gene rRNA16S, na qual permite avaliar toda a microbiota envolvendo bactéria e arqueias presente em uma amostra (Wang et al., 2007). Dessa forma, a metagenômica tem se tornado mais uma ferramenta amplamente utilizada para estudar a ecologia e evolução das comunidades bacterianas (Hugenholtz e Tyson, 2008) e já demonstrou ser mais sensível na detecção de espécies de bactérias em menor concentração do que os métodos dependentes da cultura ou sequenciamento da região do gene rRNA 16S (Lamendella et al., 2011).

As análises de membros de filos pouco representados, possibilitadas pela evolução das técnicas de sequenciamento e bioinformática, revelam a real diversidade de genomas microbianos e nos permite uma melhor determinação das relações filogenéticas entre os filos, sendo assim de grande importância para evolução dos estudos em taxonomia (Von Mering, et al., 2007; Achtman, 2008; Schleifer, 2009)

## **5.2 ALFA E BETA DIVERSIDADE**

Whittaker introduziu o termo diversidade beta ( $\beta$ ) juntamente com diversidade alfa ( $\alpha$ ) em 1960 dos quais eram restritos grande parte à estudos populacionais ligados a ecologia e biodiversidade. Os conceitos de diversidade, apesar de antigos ainda são totalmente consolidados na comunidade científica uma vez que é fortemente aplicável à atualidade em estudos de diversidade microbiana (Tuomisto, 2009).

Segundo Magurran (2013) a diversidade alfa ( $\alpha$ ) é considerada uma diversidade local que considera o número de espécies presentes em um mesmo habitat ou nicho (Tuomisto, 2009). Uma medida de diversidade alfa, portanto, atua como uma estatística de resumo de uma única população (Hamady et al., 2010).

A diversidade beta ( $\beta$ ) avalia espécies de uma forma mais global dentro de um ambiente (Magurran, 2013). A diversidade beta funciona como um escore semelhança entre as populações, permitindo análise por agrupamento de amostras (Hamady et al., 2010). O termo diversidade beta tem sido utilizado para se referir a uma grande variedade de fenômenos. Embora todos estes englobam algum tipo de heterogeneidade de composição entre os lugares, muitos não estão relacionados entre si de maneira previsível. A verdadeira diversidade beta é obtida quando o número efetivo total de espécies em um conjunto de dados. Sob estas definições, a diversidade beta pode ser calculada para amostragem unidades que representam diferentes classes de habitat (Tuomisto, 2009).

## **5.3 FUNÇÕES DA MICROBIOTA**

As principais funções da microbiota intestinal para seu hospedeiro incluem atividades metabólicas que resultam no melhor aproveitamento de energia e nutrientes absorvíveis, maturação do epitélio intestinal e sistema imune, proteção do hospedeiro contra a colonização de microrganismos patogênicos. Todas essas funções auxiliam no equilíbrio da homeostase do hospedeiro (Guarner e Malagelada, 2003).

### **5.4.1 FUNÇÕES METABÓLICAS**

As bactérias presentes na microbiota tem a capacidade de melhorar o potencial de extrair energia e nutrientes da nossa dieta, além de auxiliar na absorção e síntese de determinados compostos importantes para o hospedeiro (Backhed et al., 2005; Ley et al., 2008)

No ceco e cólon, a fermentação é intensa, com alta produção de ácidos graxos de cadeia curta e melhor utilização de hidratos de carbono (amido, celulose, hemicelulose, pectina), açúcares não absorvidos e álcoois (Cummings et al., 1987, 1996).

Além de auxiliar no melhor aproveitamento da dieta, as bactérias são conhecidas por fornecer metabólitos. Determinados gêneros e espécies são capazes de estimular o transporte de sais e água; auxiliam na absorção de cálcio, magnésio e ferro; aumentam a absorção e produção de fosfatase alcalina exógena; melhoram a capacidade de reutilização de sais biliares; sintetizam

compostos importantes como a vitamina K; melhoram o padrão de resposta para insulina (Shimada et al., 1969; Yolton e Savage, 1976; Gilliland & Speck, 1977; Ramotar et al., 1984; Venter et al., 1990; Conly et al., 1994; Brighenti et al., 1995; Roberfroid, et al., 1995; Miyazawa et al., 1996; Hill, 1997; Younes, et al., 2001).

#### **5.4.2 FUNÇÃO PROTETORA**

A microbiota gastrointestinal possui função protetora e atua de forma significativa na estimulação do sistema imune, na competição por sítios com bactérias patogênicas e na regulação da resposta de hipersensibilidade (Berg, 1996; Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996; Taguchi et al., 2002; Bik, 2009).

Durante a maturação intestinal e do sistema imune em neonatos, a microbiota exerce função essencial no desenvolvimento de um sistema imunológico competente (Berg, 1996; Bik, 2009). Trabalhos que avaliaram animais criados em ambiente livre de germes demonstraram uma menor quantidade de células linfóides, com estruturas foliculares pequenas e concentrações circulantes mais baixas de imunoglobulinas (Falk et al., 1998; Butler et al., 2000; Tannock, 2001). É observado que, imediatamente após a exposição aos microrganismos luminais, o número de linfócitos próximos à mucosa aumenta consideravelmente (Umesaki et al., 1993; Helgeland et al., 1996), são formados os centros germinativos nos folículos ou distribuídos pela lâmina própria (Cebra et al., 1998). Além disso, é observado um aumento na concentração de imunoglobulinas presentes no sangue (Butler et al., 2000).

A interação entre microrganismo, epitélio e tecido linfóide associado ao intestino auxilia no desenvolvimento dos mecanismos de memória do sistema imune e na modulação da tolerância à colonização de microrganismos em mucosas (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996).

Além da interação e modulação da resposta imune, a microbiota indígena age de forma direta no controle de microrganismos patogênicos, uma vez que, por meio da inibição competitiva, controlam a colonização dos sítios por microrganismos exógenos (Taguchi et al., 2002). O equilíbrio entre as espécies de bactérias residentes fornece estabilidade na população microbiana, entretanto, eventos que causam disbiose podem perturbar esse equilíbrio ecológico, levando à dominância de espécies oportunistas e ao desenvolvimento de enfermidades (Waaij, 1989).

#### **5.4.3 FUNÇÕES TRÓFICAS**

Em estudos com animais livres de germes, tem sido revelada a expansão da lâmina própria do intestino estimulada pela microbiota (Savage, 1977). O crescimento de células epiteliais e a diferenciação celular tem relação com o aumento de ácidos graxos de cadeia curta, produzidos pelo metabolismo microbiano. Em ratos criados em ambiente livre de germes, observa-se menor desenvolvimento das células da cripta, com menos células em relação a ratos colonizados pela microbiota convencional (Alam et al., 1994).

### **5.5 COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA FECAL DE SUÍNOS**

Segundo estimativas, a microbiota gastrointestinal dos mamíferos é composta por aproximadamente  $10^{14}$  bactérias (Luckey, 1972; Savage, 1977; Kim et al., 2011). As bactérias do filo Firmicutes representam a maior proporção da população total, seguido de Bacteroidetes. Estes dois filos correspondem por aproximadamente 90% de todas as bactérias presentes (Kim et al., 2011; Looft et al., 2012). Os primeiros estudos de sequenciamento que utilizaram amostras de fezes de suínos saudáveis realizados por Lamendella et al. (2011) revelaram que os filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria e Spirochaetes são considerados mais abundantes. Outros estudos relataram que 92% das bactérias isoladas de amostras de fezes de suínos, pertenciam aos gêneros Firmicutes e Bacteroidetes, independentemente da idade (Kim et al., 2012).

Ao longo do desenvolvimento dos animais, a microbiota é alterada até o estabelecimento de uma população estável (Palmer et al., 2007; Kim et al., 2011). Dentre os fatores que podem

influenciar na composição da microbiota, podemos destacar a idade, a linhagem, a localização no trato gastrointestinal, o uso de antimicrobianos, aditivos e probióticos, o tipo de dieta fornecida e o estado de saúde dos animais (Leser et al., 2000; Palmer et al., 2007; Ley et al., 2008; Pieper et al., 2009; Borewicz et al., 2015; Kim et al., 2011; Kim et al., 2015; Looft et al., 2014; Pajarillo et al., 2014A; Pajarillo et al., 2014B; Roca et al., 2014).

## 5.6 A MICROBIOTA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO

A colonização bacteriana do trato gastrointestinal dos mamíferos começa no nascimento. Durante o parto, são expostos a microrganismos presentes na vagina, de origem fecal e ambiental (Kenworthy e Crabb, 1963; Palmer et al., 2007). A composição da microbiota intestinal não é estática, ocorrendo a colonização por sucessão de microrganismos ao longo do tempo, que culmina para uma comunidade "*climax*", considerada estável (Palmer et al., 2007). A maturação intestinal ocorre rapidamente após o nascimento, em resposta à fatores como oxigenação, apresentação de nutrientes entéricos, desenvolvimento da microbiota e hormônios, tais como cortisol e fator de crescimento epidérmico (Cohen et al. 1991; Powell et al. 1999).

Os microrganismos que colonizam inicialmente os neonatos podem modular a expressão de genes em células epiteliais hospedeiras, o que cria um habitat favorável, além de impedir o crescimento de outras bactérias introduzidas posteriormente no ecossistema (Hooper et al., 2001). A colonização inicial é importante para a composição final da microbiota (Ducluzeau, 1993).

Muitos fatores contribuem para o processo de sucessão, como alterações fisiológicas no intestino, mudanças na dieta, consumo de alimentos sólidos (Palmer et al., 2007). Pajarillo et al. (2014A) em um estudo recente avaliaram as mudanças microbianas durante a transição do desmame de 15 suínos comerciais, medindo durante o período pré-desmame e pós-desmame. Ao nível de filo, as comunidades microbianas durante o período de pré-desmame foram compostas principalmente pelos filos Firmicutes (54%), Bacteroidetes (38,7%), Proteobacteria (4,2%), Spirochaetes (0,7%) e Tenericutes (0,2%). Em comparação, no período pós-desmame foram verificadas alterações na composição da microbiota fecal, na qual as proporções de cada filo foram Bacteroidetes (59,6%), Firmicutes (35,8%), Spirochaetes (2,0%), Proteobacteria (1%) e Tenericutes (1%).

Os filos mais abundantes na microbiota fecal de leitões são Firmicutes e Bacteroidetes e representa em média 90% da comunidade bacteriana. Em relação ao gênero, *Bacteroides*, *Blautia*, *Dorea*, *Escherichia* e *Fusobacterium* eram mais abundantes antes do desmame. Após o desmame, *Prevotella* e *Clostridium* tornaram-se mais abundantes, enquanto observou-se uma diminuição de *Bacteroides* (Pajarillo et al., 2014A).

Kim et al. (2011) descreveram a sucessão microbiana fecal de um total de 20 suínos de granjas comerciais e observaram que as mudanças na composição da microbiota continuam até por volta de 22 semanas de idade. Nesse trabalho, confirmou-se a dominância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes na microbiota fecal de suínos nas fases de crescimento e terminação. A composição microbiana é representada principalmente por cinco principais filos (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria e Spirochaetes), independentemente da idade.

Contraopondo os resultados anteriores observados por Pajarillo et al., (2014A), no trabalho de Kim et al. (2011) a proporção de bactérias Firmicutes aumenta ao longo do tempo, enquanto a proporção de Bacteroidetes diminui ao longo do desenvolvimento dos suínos. Em relação ao gênero, *Prevotella* representada até 30% de todas as bactérias classificáveis às 10 semanas de idade. No entanto, no momento em que estes suínos estão com 22 semanas de idade, *Prevotella* representava apenas 3,5-4,0% das bactérias. À medida que os níveis de *Prevotella* diminuem, há um aumento de *Anaerobacter*. Os gêneros mais abundantes em animais mais velhos são *Anaerobacter*, *Sporacetigenium*, *Oscillibacter* e *Sarcina*, foi observado um aumento na abundância ao longo do tempo. Já *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Faecalibacterium* e *Dialister* tiveram uma diminuição ao longo do tempo (Kim et al., 2011).

## 5.7 COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA NAS DIFERENTES PORÇÕES DO INTESTINO

O trato gastrointestinal é funcionalmente e anatomicamente diferente de acordo com sua localização em seus diferentes segmentos. A composição da microbiota também responde a essa diferença, uma vez que muitas espécies tem evoluído e se adaptado para colonizar determinadas porções do trato digestivo (Simon e Gorbach, 1984; Borriello, 1986).

Podemos observar que a diversidade microbiana aumenta significativamente nos segmentos gastrointestinais mais distais em relação às porções proximais (Wang et al., 2003; Konstantinov, et al., 2004; Roca, et al., 2014). Vários fatores, tais como pH mais neutro, baixo trânsito intestinal e ambiente anaeróbico estão associados com o aumento da sobrevivência das bactérias no intestino grosso (Stewart, 1997). Em contraste, as condições contrárias são aplicáveis às seções mais orais do trato digestivo como ambiente mais ácido, trânsito intestinal mais rápido e alta concentração de ácidos biliares (Cummings e Macfarlane, 1991).

Um estudo piloto para explorar as diferenças na composição do microbioma em porções do jejuno, íleo, ceco e cólon foi realizada por Isaacson et al. (2011). Ao nível do filo, as composições da microbiota do cólon e do ceco foram muito semelhantes, representadas pelos filos Firmicutes e Bacteroidetes. Contudo, as composições da microbiota do jejuno e íleo foram bastante diferentes. No jejuno, bactérias do filo Firmicutes representaram mais de 90% da microbiota, seguido por bactérias dos filos Proteobacteria, Cianobacteria e Actinobacteria. No íleo, Firmicutes e Proteobacteria foram os dois filos dominantes.

Trabalhos recentes como os de Isaacson e Kim (2012), Looft et al., (2014) e Burrough et al., (2017) confirmaram diferenças nas composições da microbiota em diferentes locais do intestino de suíno. Isaacson e Kim (2012) mostraram que as composições microbianas do íleo de animais com 11 semanas de idade foram muito diferentes do ceco e cólon. No íleo, o filo Firmicutes foi dominante e representa mais de 95% das bactérias detectadas. No entanto, a composição da microbiota do cólon e do ceco em relação ao filo foram muito semelhantes entre si, representadas pelo filo Firmicutes e Bacteroides (Isaacson e Kim, 2012).

No trabalho realizado por Looft et al., (2014), as diferenças entre o íleo e cólon foram observadas em relação ao gênero sendo detectada a dominância dos gêneros *Anaerobacter* e *Turicibacter* no íleo e no cólon gêneros como *Prevotella*, *Oscillibacter* e *Succinivibrio*. Além disso, Looft et al. (2014) mostrou que as comunidades bacterianas no lúmen são diferentes quando comparadas com a população presente na mucosa intestinal. Estas diferenças eram devido à maior abundância na mucosa incluindo o gênero *Prevotella*, *Coprococcus* e *Papillibacter* (Looft et al., 2014). Em outro estudo, a microbiota no íleo de leitões desmamados era constituída por membros do filo Firmicutes como *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Sarcina* (Dowd et al., 2008).

No trabalho de Burrough et al., (2017) foram avaliados animais inoculados por *B. hyodysenteriae* e os perfis microbianos provenientes de raspagem de mucosa foram diferentes do perfil encontrado no lúmen intestinal, sendo assim, dependendo da amostra coletada, o resultado pode ser diferente.

## 5.8 COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA ENTRE OS MAMÍFEROS

Segundo Ley et al. (2008) em um trabalho foi comparada a microbiota de várias espécies de mamíferos, e foi observado que a dieta e filogenia podem influenciar na diversidade bacteriana, com um aumento da diversidade em relação à classificação com os carnívoros seguido de onívoros e herbívoros com maior diversidade, respectivamente. A maioria das sequências, em todos os grupos testados, pertencem ao filo Firmicutes e Bacteroidetes. Outros filos representados foram Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Spirochaetes. Dos filos que foram detectados, apenas Firmicutes foram encontrados em todas as amostras. No entanto, cada hospedeiro mamífero possui grupos de espécies que não são encontradas em qualquer outra amostra (Ley et al., 2008).



## 5.9 COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA COMPARANDO RAÇAS DE SUÍNOS

Vários estudos têm mostrado importantes interações entre fatores genéticos e ambientais na definição da microbiota intestinal de roedores e seres humanos (Ley et al., 2006; Ley et al., 2008; McKnite et al., 2012). A composição da microbiota intestinal em suínos também é passível de ser moldada pela genética do hospedeiro (Pajarillo et al., 2014B).

Um estudo foi realizado para investigar as semelhanças e as diferenças na microbiota fecal de três raças puras de suínos (Duroc, Landrace e Yorkshire) (Pajarillo et al., 2014B). A comparação mostrou que estas três raças compartilham composições bacterianas semelhantes, mas são observadas diferenças intrínsecas nas raças. Ao nível de gênero, *Catenibacterium*, *Phascolarctobacterium* e *Subdoligranulum* foram mais abundantes em suínos Duroc, enquanto *Dialister* foi mais abundante em suínos Yorkshire. Os autores deste estudo sugeriram que as diferenças na comunidade bacteriana intestinal podem ser devidas aos efeitos genéticos específicos de cada raça. No entanto, não é possível excluir fatores ambientais (Pajarillo et al., 2014B). Dieta, genética e manejo têm influências importantes sobre o desempenho de crescimento e desenvolvimento de suínos (Li et al., 2012; Rydhmer et al., 2013).

## 5.10 EFEITOS DOS ANTIMICROBIANOS NA COMPOSIÇÃO MICROBIOMA

Os antimicrobianos são amplamente utilizados e funcionam no controle da microbiota intestinal, fazendo com que ocorra maior desempenho zootécnico dos animais no sistema de produção de suínos, no entanto, quando ocorre o uso em excesso pode haver um aumento da resistência antimicrobiana (Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001; Dibner e Richards, 2005).

Kim et al. (2012) em um estudo de microbiota de suínos que receberam como promotor de crescimento tilosina, demonstrou que animais não tratados apresentam variação na composição da microbiota em resposta à utilização desse antimicrobiano que leva a composição microbiana similar a de um animal adulto após a utilização do promotor de crescimento na dieta. Esta mudança resulta na promoção de efeitos benéficos de crescimento. Somente quando os suínos não tratados atingiram a maturidade (22 semanas de idade), a composição da microbiota fecal tornou-se semelhante ao dos suínos no grupo de tratamento de tilosina.

Looft et al. (2012) relataram efeitos de uma combinação de antimicrobianos na microbiota intestinal de suínos. Com duas semanas de tratamento houve diminuição de bactérias do filo Bacteroidetes, juntamente com diminuição nos gêneros *Anaerobacter*, *Barnesiella*, *Papillibacter*, *Sporacetigenium* e *Sarcina*. Houve um aumento nos membros do filo Proteobacteria e esse aumento foi correlacionado com aumento de *E. coli*. Um fator importante observado nesse estudo foi o aumento de genes associados à resistência aos antimicrobianos.

## 5.11 EFEITOS DA DIETA SOBRE O MICROBIOMA

A importância do microbioma gastrointestinal de suínos em relação à dieta tem sido avaliada em vários trabalhos. O microbioma intestinal descrito por Lamendella et al. (2011) revelou genes presentes na microbiota relacionados com o metabolismo de carboidratos. Esta observação é consistente com a hipótese de que o microbioma é importante na digestão dos alimentos (Backhed et al., 2005; Ley et al., 2008). Dessa forma, é observado que mudanças na dieta resultam em diferenças na composição da microbiota pseudo influencia o bom desempenho zootécnico dos animais (Lamendella et al., 2011).

Leser et al. (2000) compararam os microbiomas colônicos de suínos alimentados com duas dietas: uma dieta convencional e uma dieta suplementada com arroz cozido associado à fibra. Foi observada uma mudança na composição do microbioma da qual auxilia na digestão do suplemento com arroz.

O óxido de zinco (ZnO) é um suplemento alimentar que é utilizado para evitar a diarreia em suínos. Em um trabalho em que o ZnO foi avaliado em relação à interferência na composição do microbioma ileal, não foram detectadas diferenças significativas em relação ao filo ou ordem, mas foram observadas alterações no perfil do gênero. Foi detectado um aumento de *Weissella*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e uma diminuição de *Sarcina* (Vahjen et al., 2010).

## 5.12 EFEITOS DOS PROBIÓTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL DE SUÍNOS

O uso de probióticos tornou-se um tema de grande interesse, uma vez que podem conferir efeitos benéficos sobre os animais como a produção de substâncias antimicrobianas, imunomodulação, exclusão competitiva de bactérias patogênicas e modulação da microbiota intestinal (Cammarota et al., 2014).

Pieper et al. (2009), em um trabalho que avaliou a influência do uso de probióticos na composição da microbiota, forneceu para suínos desmamados *Lactobacillus plantarum*. A administração de *L. plantarum* teve um efeito significativo nas comunidades microbianas. Foi observado um aumento de *Clostridium glycolicum*, *Lactobacillus sobrius*, *Eubacterium rectale* e *Roseburia faecalis*. Os resultados mostram que a administração de *L. plantarum* ao desmame pode influenciar a microflora gastrointestinal tendo resultados positivos para a saúde gastrointestinal.

Estudos que verificaram a ação de leveduras, demonstraram que a suplementação com esses microorganismos melhorou o desempenho do crescimento em suínos recém-desmamados (Li et al., 2006; Upadrasta et al., 2013). Ao contrário de outros probióticos baseados em bactérias, houve alteração significativa na composição da microbiota intestinal de suínos no nível filo que leva à uma redução na proporção de Firmicutes e um aumento na proporção de Bacteroidetes, sugerindo que a levedura tem o potencial para inibir seletivamente enterobactérias patogênicas tais como, *Salmonella* spp. e *Escherichia* spp. (Upadrasta et al., 2013).

## 5.13 USO DE ADITIVOS NA RAÇÃO E VARIAÇÃO DA MICROBIOTA

Roca et al. (2014) em um trabalho que avalia a utilização de diferentes aditivos alimentares na ração de suínos divididos em quatro grupos (controle e três dietas enriquecidas, com avilamicina, butirato de sódio e uma mistura de extrato vegetal). encontrou diferenças na diversidade microbiana. Dessas, as mais relevantes foram entre o butirato de sódio e a mistura de extrato vegetal. Assim, os animais alimentados com a butirato de sódio possuem uma diversidade microbiana maior, enquanto que os animais que foram alimentados com extratos vegetais têm uma menor diversidade bacteriana e uma diminuição na proporção de bactérias coliformes com um aumento simultâneo de *Lactobacillus* (Roca et al., 2014). A diminuição da diversidade microbiana em animais alimentados com extratos vegetais foi previamente relatada em outro trabalho (Namkung, et al., 2003). Esta redução na diversidade microbiana provavelmente ocorre devido ao efeito antimicrobiano, que inibe alguns grupos de bactérias e promove grupos específicos de microrganismos (Roca et al., 2014).

Além disso, acidificantes usados na alimentação também têm demonstrado um efeito sobre a diversidade microbiana. Torrallardona et al. (2007) detectaram um aumento da diversidade microbiana no íleo utilizando uma dieta com 0,5% de ácido benzoico. Por outro lado, Canibe et al. (2005) detectou uma redução da diversidade microbiana quando a dieta foi enriquecida com ácido fórmico.

## 5.14 ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA DE ACORDO COM ESTADO DE SAÚDE

A composição do microbioma gastrointestinal também varia de acordo com o “status” de saúde do hospedeiro. Uma das mais importantes funções atribuídas ao microbioma é a capacidade de controlar a colonização de microrganismos patogênicos (Berg, 1996).

Leser et al. (2000) compararam a microbioma de suínos saudáveis em relação a de animais com DS por análise de T-RFLP do gene 16S rRNA. Eles encontraram mudanças que sugerem que a *B. hyodysenteriae* desestabiliza o microbioma. Kim et al. (2015) demonstraram que suínos desafiados com *Salmonella enterica* Typhimurium, *L. intracellularis* ou com ambos tiveram mudanças específicas e consistentes na microbiota do cólon e ceco. Além disso, a coinfeção de suínos resulta num aumento da excreção de *Salmonella enterica* Typhimurium ao longo do tempo e em concentrações mais elevadas.

Em um trabalho que observou a mudança da microbiota em suínos afetados pelo vírus da diarreia epidêmica suína (PED), foram observadas diferenças significativas na microbiota entre o

grupo controle e os grupos infectados, tanto a nível de gênero e filo. A maioria das bactérias comensais como *Psychrobacter*, *Prevotella* e *Faecalibacterium*, presentes no trato gastrointestinal saudável diminuíram devido ao desbalanço da microbiota induzido pela infecção (Koh et al., 2015).

## 5.15 ANÁLISE FUNCIONAL DO MICROBIOMA SUÍNO

O conhecimento da composição taxonômica e a capacidade funcional dos consórcios microbianos auxiliam na melhor compreensão dos papéis que os microrganismos desempenham na fisiologia do hospedeiro. Em um trabalho executado por Lamendella et al. (2011) foi feita análise funcional do metagenoma de suínos e revelou que o metabolismo de carboidratos foi mais abundante e representa 13% do metagenoma suíno associado com estresse, virulência, parede celular também foram abundantes. Já, proteínas que são abundantes no o intestino grosso, possuíam elevada homologia de sequências para transportadores de membrana de hidratos de carbono. Ao comparar os genes prófago e transposons de cada microbioma intestinal, o microbioma suíno abrigava uma variedade abundante e diversificada de mecanismos de transferência horizontal de genes. As maiorias destes elementos transponíveis pertenciam aos genomas de Bacteroidetes. Genes para resistência à tetraciclina, fluoroquinolonas e genes ligados à *Staphylococcus* resistente à meticilina também foram encontrados neste estudo. Mais de 12% dos subsistemas identificados foram classificados com mecanismos de resistência a múltiplas drogas, sugerindo que o intestino de suíno pode ser um local para o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias para vários antibióticos (Lamendella et al., 2011).

Dois subsistemas em particular, o UDP-N-acetilmuramato, biossíntese de frutose-6-fosfato e biossíntese de folato, foram significativamente abundantes em relação a todos os outros metagenomas intestinais (Lamendella et al., 2011). UDP- N-acetylmuramato está ligado a fatores de virulência de vários agentes patogênicos intestinais especificamente envolvidos na produção de biofilme (Boneca, 2005). Uma maior abundância de genes relacionados à biossíntese de folato foi observada e pode ser um resultado da suplementação de ácido fólico em alimentos para suínos ou um aumento da produção pelos consórcios microbianos suínos (Lamendella et al., 2011; Lindemann, 1993).

## 6. DISENTERIA SUÍNA

### 6.1 FILO SPIROCHAETES

Spirochaetes são microrganismos heterotróficos, gram-negativos (Paster et al., 1991), delgados em formato helicoidal, com flagelos periplasmáticos que conferem motilidade a este grupo (Paster e Dewhirst, 2000). Possuem comprimento variando entre 2,0 µm e 14,0 µm, e sua largura entre 0,19 µm e 0,40 µm. O número de flagelos periplasmáticos varia entre as diferentes espécies (Sellwood e Bland, 1997).

Foram catalogadas por volta de 2000 espécies ou filotipos como espiroquetas, dos quais podemos incluir os gêneros *Leptospira*, *Borrelia*, *Brevinema*, *Clevelandina*, *Cristispira*, *Diplocalyx*, *Hollandia*, *Pillotina* e *Treponema* (Paster e Dewhirst, 2000).

Dentro do filo são encontradas diferenças quanto a tolerância ao oxigênio, podendo ser anaeróbios tolerantes ao oxigênio (*Brachyspira* spp.), anaeróbios estritos (*Treponema* spp.), aeróbios (*Leptospira* spp.), microaerófilos (*Borrelia* spp.) e de vida livre (*Spirochaeta aurantia*) (Canale-Parola et al., 1967). Outra característica observada é a capacidade de se transformar em esferas, um fenômeno relatado em certas espécies como *Borrelia*, *Leptospira* e *Brachyspira* em resposta ao ambiente desfavorável (Stanton e Lebo, 1988; Faine, 1998; Murgia e Cinco, 2004).

### 6.2 GÊNERO *Brachyspira*

O gênero *Brachyspira* é o único presente na família "*Brachyspiraceae*" na Ordem Spirochaetales (Paster e Dewhirst, 2000). *Brachyspira* spp. coloniza o trato gastrointestinal, especificamente ceco e cólon, próximo ao epitélio intestinal (Stanton, 1997). São bactérias

hemolíticas em ágar sangue (Trott et al., 1996) e crescem preferencialmente em ágar seletivo e em meio líquido sob agitação entre 37-42 °C (Stanton e Lebo, 1988; Hampson e Stanton, 1997).

Inicialmente, as espiroquetas eram incluídas no gênero *Treponema*. No entanto, após a comparação genotípica, foi proposto o novo gênero *Serpulina*, devido à existência de um gênero fúngico de nome semelhante (Stanton et al., 1991; Stanton, 1992). Mais tarde, ocorreu uma unificação do gênero *Brachyspira*, que incluiu *B. aalborgi* e todas as bactérias do gênero *Serpulina* (Ochiai et al., 1997).

As espiroquetas intestinais são um grupo diverso de microrganismos pertencentes ou não à microbiota residente (Hudson et al., 1976). Podemos diferenciar-las de acordo com a intensidade da hemólise, ocorrendo forte  $\beta$  hemólise em cultivos de *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina*, *B. hampsonii* (Taylor e Alexander, 1971; Rasback et al., 2007; Chander et al., 2012), enquanto as demais espécies geralmente apresentam fraca beta hemólise em ágar sangue (Hudson et al., 1976) como *B. innocens* (Ochiai et al., 1997), *B. intermedia*, *B. pilosicoli* (Trott et al., 1996), *B. murdochii*, *B. intermedia* (Stanton et al., 1997), *B. alvinipulli* (Stanton et al., 1998), *B. aalborgi* (Hovind-Hougen et al., 1982).

### 6.3 ESPÉCIES PRESENTES NO GÊNERO *Brachyspira*

Como descrito anteriormente, são múltiplas espécies presentes no gênero, com particularidades para cada uma, podendo ser encontradas em múltiplos hospedeiros diferentes.

*B. hyodysenteriae* é conhecida por colonizar naturalmente suínos, camundongos, emas e patos, sendo considerado o principal agente da DS (Joens e Kinyon, 1982; Jensen et al., 1996; Jansson et al., 2001, 2004). Através de infecção experimental, foi possível desenvolver doença clínica em suínos, camundongos e aves (Taylor e Alexander, 1971; Joens e Glock, 1979; Sueyoshi e Adachi, 1990; Trott e Hampson, 1998).

A mais recente espécie proposta foi *B. hampsonii* (Chander et al., 2012), sendo dividida em grupo I e II. A doença clínica associada é indistinguível da DS causada pela *B. hyodysenteriae* (Rubin et al., 2013; Costa et al., 2014). Outra espécie não muito recente pertencente às espécies causadoras de disenteria em suínos foi *B. suanatina*, caracterizada em 2007 (Rasback et al., 2007).

Além das espécies causadoras de quadros de disenteria, podemos encontrar outras espécies no gênero que ocasionalmente podem causar diarreia. *B. pilosicoli* é considerado o agente etiológico da colite espiroquetel, no qual são observados quadros de diarreia mucoide, por vezes auto limitante, comum em suínos e capaz de infectar uma grande variedade de outros mamíferos como, roedores, primatas, canídeos, gambás, aves e humanos (Lee et al., 1993; Lee e Hampson, 1994; Duhamel et al., 1995; Trott et al., 1996; McLaren et al., 1997; Trott et al., 1998; Duhamel, 2001).

*B. intermedia* tem sido observada como agente causador de colite em suínos e aves (Hampson e Trott, 1995; McLaren et al., 1997; Stanton et al., 1997). Originalmente *B. intermedia* não era considerada patogênica para suínos, embora tenha sido associada com doença clínica em alguns casos. Essa espécie possui alto grau de diversidade intraespecífica e, por vezes, questionou-se essa classificação em uma única espécie (Phillips et al., 2010).

*B. innocens* e *B. murdochii* são considerados microrganismos comensais, no entanto podem causar diarreia em suínos (Hampson e Trott, 1995; Stanton et al., 1997; Weissenbock et al., 2005; Jensen et al., 2010; Osorio et al., 2013). *Brachyspira alvinipulli* e *B. pulli* são encontradas em aves (Swayne et al., 1995; Stanton et al., 1998). Em cães podemos encontrar *Brachyspira (Serpulina) canis* (Duhamel et al., 1998). *B. aalborgi* (Hovind-Hougen et al., 1982) foi detectada em humanos, primatas e gambás (Takeuchi e Zeller 1972; Duhamel, 2001).

Além das espécies mais conhecidas, espiroquetas semelhantes à *Brachyspira* foram observadas em alguns trabalhos em lontras (Molnár, 1986), gambás (Turek e Meyer, 1979), cobaias (Vanrobaeys et al., 1998), equinos (Davies e Bingham, 1985), guaxinins (Hamir et al., 2001) e cervo selvagem japonês (Shibahara et al., 2000), sendo assim importante o desenvolvimento de mais trabalhos para completar a caracterização e avaliação da evolução deste gênero.

Quanto à interação com o hospedeiro, algumas espécies como *Brachyspira pilosicoli*, *B. aalborgi* possuem capacidade de colonizar superfícies mucosas intestinais ligando-se a

enterócitos (Barrett, 1997; Swayne e McLaren, 1997; Taylor e Trott, 1997; Mikosza et al., 1999; Jensen et al., 2000), forma uma "falsa borda em escova" (Duhamel, 1997).

#### 6.4 CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS DA *Brachyspira*

O DNA das espécies de *Brachyspira* possui uma baixa relação de guanina e citosina, na faixa de 24,6-28%. O tamanho do genoma para as espécies varia de aproximadamente entre 2,5 e 3,2 milhões de pares de base (Mbp), com aproximadamente 2300 sequências codificadoras de proteínas (Bellgard et al., 2009; Hampson, 2012). A maioria das espécies compartilha semelhanças nas suas sequências, conseqüentemente foi relativamente recente a separação entre as espécies (Bellgard et al., 2009; Pati et al., 2010; Wanchanthuek et al., 2010).

Até a data, os genomas depositados incluem uma estirpe de *B. intermedia*, *B. murdochii* e *B. innocens*, cinco cepas de *B. hampsonii*, quatro cepas de *B. pilosicoli*, duas estirpes de *B. suanatina* e 20 cepas de *B. hyodysenteriae* (Bellgard et al., 2009; Pati et al., 2010; Wanchanthuek et al., 2010; Håfström et al., 2011; Mapple et al., 2012; Lin et al., 2013; Black et al., 2015; Mushtaq et al., 2015; Mirajkar et al., 2016b; 2017a,b)

*B. hyodysenteriae* mostrou-se diferente de todas as outras espiroquetas, incluindo *Leptospira*, *Borrelia*, *Treponema*, com relativa escassez de mecanismos de transdução de sinal, o que provavelmente reflete o nicho ecológico relativamente estreito ocupado pelo microrganismo no intestino grosso suíno (Bellgard et al., 2009).

Avaliando múltiplos genomas de *B. hyodysenteriae*, 88% dos genes identificados são considerados "núcleo", sendo compartilhados pelas diferentes cepas, 8,6% são genes auxiliares e 2,9% eram únicos e específicos de estirpes. As seqüências únicas não alinhadas entre isolados foram investigadas para 13 estirpes, um total de 271. Dos 271 genes, 215 (79%) eram desconhecidos hipotéticos, 11 (4%) conhecidos hipotéticos e 17 (6%) genes relacionados à fagos (Black et al., 2015).

Genes que codificam proteínas envolvidas na degradação das células hospedeiras, hemolisinas e fosfolipases são conservados dentro da espécie, além de apresentar pouca variação entre as cepas. Foram detectadas no total sete hemolisinas e três fosfolipases na cepa de referência WA1 e nos demais isolados avaliados por sequenciamento do genoma completo (Black et al., 2015).

O genoma da *B. hyodysenteriae* WA1 possui genes com alto grau de identidade semelhantes à *E. coli* e espécies de *Clostridium* provavelmente foram adquiridas durante a sua adaptação à vida no ambiente do intestino grosso (Bellgard et al., 2009).

*B. hyodysenteriae* contém um agente de transferência de genes (*Gene Transfer Agent - GTA*) (Matson et al., 2005). Os GTAs auxiliam nos rearranjos genéticos que ocorrem dentro e entre as espécies de *Brachyspira* (Zuerner et al., 2004). Além disso, foi encontrado um plasmídeo nas espécies de *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia* e *B. suanatina* (Bellgard et al., 2009; Black et al., 2015; Håfström et al., 2011; Mushtaq et al., 2015).

Os genes com maior índice de variação foram associados à quimiotaxia, adesão celular, lipoproteínas e proteínas de superfície (Black et al., 2015). Para investigar o significado funcional dessas e outras mudanças genéticas, é importante o desenvolvimento de mais trabalhos, estudando transcriptoma e proteômica, com o intuito de investigar a expressão e função desempenhada por esses genes (La et al., 2016).

#### 6.5 DISENTERIA SUÍNA

*B. hyodysenteriae* é o agente primário da DS, caracterizada por colite muco-hemorrágica grave, com alta morbidade, podendo ser fatal em alguns casos (Taylor e Alexander, 1971). É uma bactéria móvel, gram-negativa, espiralada, anaeróbia e de crescimento fastidioso (Lemcke et al., 1979; Hampson, 2012).

Os primeiros relatos de DS ocorreram em 1921 por Whiting et al., (1921), no entanto os trabalhos que detectaram espiroquetas como agente causador da doença iniciaram na década de 60 (Terpstra et al., 1968; Alexander e Taylor, 1969). Foram observadas espiroquetas, sob microscopia eletrônica, na mucosa do cólon de animais com quadros clínicos de DS (Blakemore

e Taylor, 1970; Taylor e Balkemore, 1971) e, anos depois, a doença foi reproduzida com sucesso, confirmando *B. hyodysenteriae* como o causador dessa enfermidade (Taylor e Alexander, 1971).

O período de incubação é variável, e ocorre entre 2 dias a 3 meses, mas a doença geralmente é observada entre 10 e 14 dias em animais naturalmente expostos. O curso varia entre animais dentro e entre rebanhos. Após o aparecimento de sinais clínicos os animais possuem sintomatologia recorrente, com intervalos entre 3 a 4 semanas (Suh e Song, 2005). Geralmente um animal com diarreia clínica elimina por volta de  $10^7$  a  $10^{10}$  células por ml de fezes ou tecido intestinal (Kinyon e Harris, 1979).

Os sinais clínicos observados iniciam com fezes pastosas, de coloração amarelo esverdeada e, com a evolução da enfermidade, progride para fezes aquosas contendo sangue, muco e fibrina associada (Lussier, 1962). Dependendo da resposta individual, os animais se recuperam, no entanto, tem seu desenvolvimento comprometido. A diarreia prolongada leva à desidratação e os animais tem emagrecimento progressivo rápido (Hampson, 2012). Pode ocorrer anorexia parcial e aumento da temperatura retal entre 40-40.5 °C (Jonasson et al., 2007).

A DS é endêmica no mundo todo (Kunkle e Kinyon, 1988), com uma prevalência que varia nos rebanhos suínos entre 0 a 40% (Fellstrom et al. 1997, Stege et al., 2000, Suh e Song 2005). Esta pode ocasionar entre 10 a 90% de redução da conversão alimentar e entre 13 e 62% de redução no ganho de peso (Zlotowski et al., 2008).

No Brasil, a DS ocorre desde a década de 1970 e afeta muitos rebanhos. Até 2010 eram observados casos esporádicos, com baixa importância epidemiológica (Barcellos, 2000b). A partir dessa data, houve a reemergência de surtos em vários estados brasileiros (Daniel et al., 2017).

## 6.6 ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

As lesões na DS são restritas ao intestino grosso (Hughes et al., 1975) e resultam em colite muco-hemorrágica severa, com desidratação e morte em animais não tratados (Kinyon e Harris., 1979). A disenteria é facilmente reproduzida por alimentação ou inoculação intragástrica em suínos normais com culturas de *B. hyodysenteriae* (Kinyon et al., 1977; Kennedy et al., 1988).

Dentre as alterações macroscópicas típicas, podemos observar: hiperemia, edema de mesocólon, aumento dos linfonodos mesentéricos, áreas brancacentas multifocais na superfície da serosa. Na mucosa é observado espessamento com acúmulo de sangue, muco e fibrina e material necrótico no lúmen, podendo, em casos mais graves, ocorrer a formação de pseudomembrana (Achacha et al., 1996).

Histologicamente, as lesões agudas incluem espessamento da mucosa e submucosa, coagulação vascular com edema, além de hiperplasia de células caliciformes, perda da arquitetura do órgão associada à necrose e erosão do epitélio intestinal. Em alguns casos é possível observar espiroquetas nas colorações convencionais. Observa-se ainda infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, na lâmina própria e lúmen. Hemorragia é presente e está associada às áreas mais afetadas, com acúmulo de fibrina, muco e restos celulares. Na forma crônica, as lesões são inespecíficas e podem ser observadas necrose avançada e formação de pseudomebrana (Taylor e Blakemore, 1971; Glock et al., 1974; Whipp et al., 1979; Wilcock e Olander, 1979).

## 6.7 PATOGÊNESE

Por ser uma doença multifatorial, a patogênese da DS é complexa e pouco compreendida. Alguns trabalhos avaliaram o processo inicial ligado à colonização e ao desenvolvimento da lesão. Foi observado que nos estágios iniciais da disenteria, *B. hyodysenteriae* colonizam a superfície da mucosa do ceco e do cólon e, posteriormente, se estabelece entre as células epiteliais e caliciformes (Glock et al., 1974; Kubo et al., 1979; Joens et al., 1981; Kennedy et al., 1988).

Em um trabalho que utilizou a microscopia eletrônica como ferramenta, foi demonstrada a presença de espiroquetas nas criptas, associadas a células epiteliais necróticas e a lamina própria (Kennedy e Straffuss, 1976), mas a evidência se a invasão celular é essencial para produção de lesão ainda não foi totalmente esclarecida (Glock et al., 1974; Albassam et al., 1985).

A íntima associação ao muco presente na superfície do epitélio é importante para o estabelecimento da infecção, uma vez que, o muco promove nutrição, proteção contra o fluxo intestinal, além de auxiliar e manter a baixa tensão de oxigênio no ambiente próximo à mucosa (Kennedy et al., 1988). O aumento na produção de muco está associado à perda da organização estrutural do muco por aumento na expressão do gene MUC5AC (Quintana-Hayashi et al., 2015; Wilberts et al., 2014).

Outros fatores essenciais são a motilidade e a quimiotaxia. Em trabalhos avaliando essas características, observaram alta motilidade em regiões ricas em muco além de forte atração das bactérias do gênero *Brachyspira* à mucina gástrica suína, sangue, L-fucose e L-serina (Kennedy et al., 1996; Kennedy et al., 1988).

A diarreia na DS resulta em má absorção por falha nos mecanismos de transporte epitelial de sódio e cloreto (Argenzio et al., 1980, Argenzio 1981). Com a evolução da doença, os níveis de sódio, cloreto e bicarbonato diminuem na corrente sanguínea dos animais podendo levar à acidose metabólica marcada e uma hipercalemia (Hampson, 2012).

Em trabalhos com tecido “ex-vivo” de suíno, foi observado um aumento da morte celular, aumento da espessura do exsudato catarral e um aumento de l-citrulina como resultado da síntese de NO que, por sua vez, leva a vasodilatação, secreção de muco, abertura de canais de cloreto e inflamação, sendo um importante mecanismo para desencadear diarreia muco-hemorrágica “*in vivo*” (Welle et al., 2017).

Após a invasão, são observadas alterações nas junções celulares (ter Huurne e Gastra, 1995). À medida que a doença avança, é observada uma esfoliação do epitélio e as células sanguíneas passam para o lúmen intestinal e leva à uma colite fibrinohemorrágica (Glock et al., 1974; Kennedy e Straffuss, 1977; Kubo et al., 1979). Os mecanismos de destruição de tecido são ligados às hemolisinas e aos lipooligossacarídeos na quebra da barreira epitelial no cólon, resulta em desprendimento epitelial, o que permite a invasão da submucosa por bactérias secundárias e eventualmente pelo protozoário *Balantidium coli*, agravando as lesões (Hampson, 2012).

Embora a infecção pela *B. hyodysenteriae* possa causar doença clínica, isolados foram recuperados de rebanhos aparentemente saudáveis (La et al., 2016). O aparecimento de sinais clínicos está associado à dose infectante, grau de virulência da cepa (Hampson et al., 2015), uso de um regime de medicação eficaz, dieta (Jacobson et al., 2004), idade (Olson 1974) e secreção ácida no estômago (Savage 1980). O estresse do desmame não é considerado como predisponente à disenteria, uma vez que quando submetidos a tratamento com glicocorticoide os animais não desenvolveram doença clínica (Jacobson et al., 2004).

## 6.8 INFLUÊNCIA DA DIETA

Sabe-se que a dieta e a microbiota possuem uma forte influência na ocorrência de sinais clínicos de DS (Durmic et al., 1998). Alguns estudos demonstram os efeitos de diferentes dietas na colonização e a presença de microrganismos importantes para o estabelecimento de sinais clínicos (Meyer et al., 1975; Wipp et al., 1979). Dessa forma, ao manipular as condições ambientais do meio, há possibilidade de controlar essa população.

A colonização por *B. hyodysenteriae* pode ser inibida por dietas altamente digestíveis (Pluske et al., 1996) ou ricas em inulina (Thomsen et al., 2007; Hansen et al., 2010). O mecanismo de proteção pode envolver mudanças na microbiota colônica inibindo a infecção (Leser et al., 2000). Por outro lado, algumas outras bactérias anaeróbicas que fazem parte da microbiota podem facilitar a colonização de *B. hyodysenteriae*, aumentando as chances do estabelecimento da doença (Whipp et al., 1979; Joens et al., 1981). A utilização de alimentos pouco digestíveis aumenta a fermentação intestinal e a colonização bacteriana (Pluske et al., 1998). É observado que quando são utilizados carboidratos de fácil digestão e absorção no intestino delgado, resta pouco substrato energético para as bactérias presentes no intestino grosso, reduzindo a fermentação e o pH do intestino apresenta-se elevado, com baixa produção de ácidos graxos voláteis (Siba et al., 1996).

No caso da inulina é observado um aumento na concentração luminal de ácidos graxos voláteis, que por sua vez diminuem o pH luminal (Jensen e Jørgensen 1994), levando a uma diminuição na proporção dos ácidos graxos de cadeia ramificada como ácido isobutírico e o ácido

isovalérico (Hansen et al., 2011). A inulina é principalmente fermentada no intestino grosso. Ela aumenta a produção de lactato e gás pelas *Bifidobacterias* e *Lactobacillus* (Roberfroid et al., 1998). Foi relatada que a inclusão dietética inferior a 80 g/kg de inulina na dieta pode impedir o desenvolvimento da doença (Hansen et al., 2011). De forma similar, as dietas compostas por matérias-primas cultivadas organicamente como carboidratos fermentáveis de raízes de chicória, tremoços doces, arroz cozido associado a proteína animal, sorgo, silagem de milho, demonstram efeito protetivo no desenvolvimento de disenteria após o desafio experimental com *B. hyodysenteriae* (Prohaszka e Lukacs 1984; Pluske et al., 1996<sup>a</sup>; Siba et al., 1996; Pluske et al., 1998; Thomsen et al., 2007; Hansen et al., 2011).

Por outro lado, uma alimentação rica em soja e uma alta porcentagem de fibras aumentam as chances de aparecimento da doença (Durmic et al., 2000, Jacobson et al., 2004). Os polissacarídeos não amiláceos presentes na soja aumentam a fermentação microbiana e a produção de ácidos graxos voláteis (VFA) no intestino grosso, predispondo à disenteria (Siba et al., 1996; Jacobson et al., 2004).

## 6.9 INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA

O efeito sinérgico entre a microbiota e as espiroquetas para o aparecimento da disenteria pode envolver entre os microrganismos no qual os mesmos se beneficiam dos produtos do metabolismo dos demais e auxiliam na produção de um microambiente favorável para a colonização, interferindo na interação dos microrganismos presentes na mucosa e facilita a permanência das espiroquetas no ambiente colônico (Whipp et al., 1979).

Em alguns trabalhos foi observado que animais gnotobióticos, inoculados experimentalmente com *B. hyodysenteriae*, não possuem capacidade de desenvolver quadro clínico típico (Meyer et al., 1974a; Meyer et al., 1974a; Brandenburg et al., 1976; Kinyon et al., 1977; Whipp et al., 1979), sendo necessária a presença de uma microbiota que auxilie na colonização.

Animais gnotobióticos quando inoculados associado ao *Fusobacterium necrophorum*, três estirpes de *Bacteroides vulgatus*, espécies de *Clostridium* e *Listeria* individualmente e em diferentes combinações conseguem desenvolver disenteria suína, no entanto, quando inoculada em animais gnotobióticos sem a presença desses microrganismos não é possível o desenvolvimento de doença clínica (Whipp et al., 1979).

Em um trabalho com sequenciamento de nova geração, nos animais com DS foram observadas alterações na microbiota próximas à mucosa e no lúmen, detectando diferenças de riqueza e diversidade (Burrough et al., 2017). A abundância relativa de *Brachyspirales*, *Campylobacteriales*, *Desulfovibrionales* e *Enterobacteriales* foram maiores em animais com disenteria na mucosa enquanto que *Clostridiales*, *Erysipelotrichales* e *Fusobacteriales* foram significativamente mais abundantes no conteúdo luminal. Para suínos inoculados que não desenvolveram disenteria, *Burkholderiales* foram mais abundantes em ambos os tipos de amostras, *Bacteroidales* e *Synergistales* foram mais abundantes em raspagens mucosas, e *Lactobacillales* e *Bifidobacteriales* foram mais abundantes em conteúdo luminal quando comparado com suínos doentes (Burrough et al., 2017; Kelly et al., 2017).

Em relação às espécies presentes sem sinais clínicos são observadas maiores proporções de espécies de Bifidobactéria e Megasphaera que inibem a colonização da *B. hyodysenteriae* (Mølbak et al., 2007).

Em animais com DS observa-se uma maior porcentagem de Firmicutes e Bacteroidetes, que se encontram significativamente mais altos (Chaban et al., 2012; Youmans et al., 2015; Burrough et al., 2017). É verificado ainda um aumento nos gêneros *Brachyspira*, *Campylobacter*, *Mogibacterium*, *Anaerotruncus*, *Oscillospira* e múltiplo *Desulfovibrio* spp. em animais com disenteria, enquanto *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Synergistales*, *Bifidobacterium* spp., e um *Desulfovibrio* spp. foram encontrados em animais resistentes (Burrough et al., 2017).

*Fusobacteria* são mais abundantes nos conteúdos luminiais de suínos com DS (Burrough et al., 2017). Um aumento significativo de *Fusobacterium* também foi relatado em amostras de suínos com diarreia associadas à infecção pelo vírus da diarreia epidêmica suína (PED) (Koh et



al., 2015), bem como animais com diarreia inespecífica (Yang et al., 2017), sugerindo que esse fato também pode refletir a disbiose associada com certos tipos de diarreia.

Bactérias do gênero *Campylobacter* tem sido associadas à suínos com disenteria (Doyle, 1948). Em uma investigação de amostras fecais, a cultura de *Campylobacter* foi obtida de animais com diagnóstico laboratorial da doença associada à *Brachyspira*, sugerindo uma interação potencial entre essas bactérias no intestino grosso (Burrough et al., 2013).

*Desulfovibrio* spp. foi mais prevalente na superfície mucosa dos animais positivos. Estas são bactérias redutoras de sulfato com potencial para degradar as mucinas sulfatadas, que compõem parte da barreira do muco (Earley et al., 2015). De fato, uma redução nas mucinas sulfatadas foi relatada anteriormente em suínos com DS aguda (Wilberts et al., 2014) e esta quebra na organização do muco colônico mostrou fornecer locais de ligação para *B. hyodysenteriae* (Quintana- Hayashi et al., 2015). *Desulfovibrio* spp. também estão presentes em biópsias colônicas de pessoas com colite ulcerativa (Rowan et al., 2010).

Tem sido observada uma diminuição do *Lactobacillus* em animais com disenteria suína (Burrough et al., 2017). *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* produzem lactato, que, por sua vez, pode ser usado por certas bactérias produtoras de butirato, como *Megasphaera* (Molbak et al., 2007).

## 6.10 FATORES DE VIRULÊNCIA

Dentre os fatores de virulência mais importantes, destaca-se a atividade hemolítica (ter Huurne et al., 1992; Hyatt et al., 1994), a motilidade bacteriana, a quimiotaxia (Milner e Sellwood 1994; Kennedy e Yancey, 1996; Rosey et al., 1996), os lipooligossacarídeos (LOS), a resistência a toxicidade do oxigênio (Nuessen et al., 1983; Nibbelink e Wannemuehler, 1991; Stanton et al., 1999; Naresh e Hampson, 2010) e a ligação de ferro. Além disso, seis genes de função incerta sobre o plasmídeo ~36 kB foi sugerido como fatores “life style” de virulência, promovendo a colonização (La et al., 2011; La et al., 2014). Foi observado que alterações relacionadas à ausência do plasmídeo interfere na habilidade das espiroquetas sobreviverem e colonizarem o intestino (Bellgard et al., 2009; La et al., 2011).

Em decorrência do sequenciamento de genomas completos, houve uma ampliação nas informações relacionadas a genes de fatores de virulência e “life style” (Belgard et al., 2009; Black et al., 2015; La et al., 2016). Em um trabalho executado por La et al., (2016), 332 genes codificam fatores de virulência ou “life style” estavam bem conservados. Anteriormente, foram sequenciadas 20 cepas de *B. hyodysenteriae*, sendo também encontrados genes associados à virulência altamente conservados (Black et al., 2015). Esses achados indicam que a maioria dos genes associados à virulência descritos anteriormente fazem parte do genoma núcleo da espécie (La et al., 2016).

A atividade hemolítica é um fator de virulência essencial. Oito genes codificam hemolisinas, dentre eles os mais estudados são *tlyA*, *tlyB* e *tlyC* que codificam hemolisinas e *hlyA* que codifica uma proteína transportadora com atividade hemolítica (ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001; Belgard et al., 2009; Black et al., 2015). A  $\beta$ -hemólise forte é considerada um importante fator que demonstra patogenicidade (Hyatt et al., 1994). É observada citotoxicidade para células “*in vitro*” quando em contato com hemolisinas (Kent, 1984). Alças intestinais expostas a hemolisinas purificadas desenvolvem lesões semelhantes a infecção natural por *B. hyodysenteriae* (Lyson et al., 1991). A hemolisina presente na *B. hyodysenteriae* denominada *tlyA* foi estudada como uma potencial vacina obtendo uma proteção parcial para *B. hyodysenteriae* (Hyatt et al., 1994). Em rebanhos com animais assintomáticos foram observadas substituições de aminoácidos na proteína da hemolisina III e cinco na proteína de ativação da hemolisina em comparação com a estirpe de referência WA1 e apresentaram uma ruptura no sítio promotor do gene *hlyA* (La et al., 2016) e sinaliza uma perda de virulência dessas cepas com alteração nessas regiões.

A motilidade é um importante fator de virulência e permite que as bactérias se movimentem no muco. Essa motilidade é devido à presença de flagelos periplasmáticos, que ajudam a atravessar o muco permitindo que as bactérias acessem as células epiteliais dentro das criptas do intestino grosso (Milner e Sellwood, 1994; Kennedy e Yancey, 1996; Naresh e Hampson, 2010). Bactérias como *B. hyodysenteriae* com morfologia espiroquetal possuem

vantagem seletiva em meio viscoso, quando comparadas aos demais microrganismos (Lee, 1985). Em pH 7 e 8 foi observada motilidade ótima em relação aos demais valores avaliados (Kennedy e Yancey Jr., 1996).

A quimiotaxia ao muco é considerada uma importante ferramenta que permite a competição por ambiente e facilita a sobrevivência no cólon (Kennedy et al., 1987). O processo de quimiotaxia ao muco de espécies de *Brachyspira* foi avaliado por Milner e Sellwood (1994) sendo observado que espécies mais virulentas possuíam significativa quimiotaxia ativa, quando comparadas às estirpes de baixa de virulência. As bactérias possuem um sistema sensorial e respondem ao meio ambiente mudando de direção por esse mecanismo (Armitage, 1992; Manson, 1992).

Outro fator de virulência importante é a resistência à toxicidade do oxigênio conferido pelo gene NADH oxidase (*nox*). A enzima NADH oxidase tem a capacidade de proteger contra a toxicidade do oxigênio para *B. hyodysenteriae*, esse fator desempenha importante papel nos primeiros estágios da doença, antes do estabelecimento no ambiente colônico sob estresse em altas tensões de oxigênio, como próximo ao epitélio intestinal e em estágios posteriores quando os eritrócitos portadores de oxigênio entram no habitat das espiroquetas e são lisados pela hemolisina. Além disso, a NADH oxidase protege as células da exposição ao oxigênio durante a passagem fecal-oral entre os hospedeiros (Stanton et al., 1999).

Cepas com inativação da NADH oxidase (*nox*) mostram uma capacidade reduzida para colonização da *B. hyodysenteriae* (Stanton et al., 1999). Além da enzima descrita acima, espécies de *Brachyspira* possuem substâncias adicionais para proteção contra estresse oxidativo, como superóxido dismutase e catalase (Jensen e Stanton, 1993b, Stanton et al., 1999b).

Consideradas importantes proteínas externas da *B. hyodysenteriae* os lipooligossacarídeos (LOS) são importantes fatores de virulência (Halter e Joens, 1988). Possuem propriedades biológicas semelhantes aos lipooligossacarídeos (LPS) de outras bactérias e provoca efeitos tóxicos que interferem na barreira epitelial do epitélio intestinal (Nuessen et al., 1983; Greer e Wannemuehler, 1989; Nibbelink et al., 1997). Vários estudos demonstraram que o lipooligossacarídeo (LOS) possui uma variedade de efeitos, que podem induzir inflamação local e danos nos tecidos que podem contribuir para as lesões DS (Nuessen et al., 1983; Nibbelink et al., 1997).

O agrupamento de genes *Bit ABC* potencialmente pode influenciar a capacidade das espiroquetas de se ligar ao ferro e, portanto, alterar sua capacidade de sobreviver no cólon (Wassenaar e Gaastra, 2001; La et al., 2016).

## 6.11 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A DS possui distribuição mundial e varia entre regiões a sua prevalência, no entanto continua sendo um problema comum na Europa, América e Ásia. Foi observado que após a tecnificação ocorrida na década de 90, a prevalência da DS diminuiu drasticamente, devido à melhora no status sanitário das granjas, sistema de desmame precoce, uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e implementação de programas de biossegurança (Hampson, 2012). Recentemente, tem sido observada uma reemergência de casos semelhantes à disenteria, muitas vezes relacionados ao aumento de resistência aos antimicrobianos ou ao aparecimento de novas espécies (Rasback et al., 2007; Harding et al., 2010a,b; Clothier et al., 2011; Schwartz 2011; Chander et al., 2012; Mirajkar e Gebhart, 2014)

*B. hyodysenteriae* é transmitida principalmente pela ingestão de fezes infectadas. Em surtos de disenteria, a morbidade pode atingir 90% e a mortalidade por volta de 30% se o tratamento efetivo for instituído. Experimentalmente, a mortalidade pode atingir 50% (Jacobson et al., 2004; Hampson, 2012).

Como vetores, os roedores adultos são os principais agentes disseminadores. Uma série de estudos mostraram que roedores são suscetíveis a infecção por *B. hyodysenteriae* e demonstraram a transmissibilidade do patógeno para suínos via fezes roedores (Hampson et al., 1991; Trott et al., 1996). Outros reservatórios importantes são as aves. Trabalhos que avaliaram a transmissibilidade da disenteria pelas aves foram executados e obteve-se isolamento em aves aquáticas migratórias na Europa (Martinez-Lobo et al., 2013), em gansos da neve (Rubin et al.,

2013) no Canadá, sendo assim uma via importante de disseminação e modificação genotípica de cepas de *Brachyspira* pelo mundo, além da transmissão da doença entre fazendas vizinhas (Jansson et al., 2004; Phillips et al., 2009). Outro grupo importante na disseminação são os insetos, que constituem um reservatório e fonte de infecção na suinocultura (Blunt et al., 2011). Suínos asselvajados são comprovadamente uma fonte potencial de infecção (Philips et al., 2009). Além de animais asselvajados, os animais domésticos presentes nas fazendas, principalmente cães e patos, podem ser um reservatório de *Brachyspira* spp. (Songer et al., 1978; Råsbäck et al., 2005).

Quando as medidas apropriadas não são tomadas, a DS torna-se endêmica dentro de uma fazenda afetada. Dessa forma, a infecção se espalha facilmente devido ao transporte de reprodutores infectados latentemente ou pela introdução de marrãs infectadas (Harris e Lysons 1992). Outro fator essencial para disseminação de cepas de *Brachyspira* é a colonização em baixo grau de forma subclínica em fazendas, levando a persistência e disseminação da doença. Animais assintomáticos podem desenvolver diarreia após manejos estressantes, como transferir para novas baias e mistura de animais de origem diferentes (Hampson, 2012). Em um trabalho que estudou fatores de risco realizado por Robertson et al., (1992), o transporte de alimentos ou visitas à fazenda estavam ligados à prevenção ou à presença de DS na fazenda.

A DS pode ser um problema de difícil eliminação nas granjas, uma vez que a dispersão do patógeno nas fezes acontece de forma intermitente. Animais podem eliminar o microrganismo sem apresentar sinais clínicos, além de possuir capacidade de resistência no meio ambiente por longos períodos. Fômites, equipamentos como botas, veículos de transporte, vestuário, equipamentos agrícolas, solo, água da lagoa ou habitação contaminada também podem espalhar a bactéria (Taylor, 1978; Chia e Olson, 1995; Boye, et al., 2001). A eficiência dos desinfetantes é dificultada caso não seja feita limpeza correta dos dejetos e se o desinfetante for misturado com matéria orgânica, como fezes (Corona-Barrera et al., 2004b).

A DS é distribuída de forma ampla, no entanto os dados são difíceis de comparar, uma vez que existem poucos trabalhos relacionados, sendo encontrada prevalência variando entre 0% a 40% nos rebanhos (Fellstrom et al., 1996; Moller et al., 1998; Stege et al., 2000; Suh e Song, 2005; Carvajal et al., 2006). Outro fator que dificulta é o fato do uso de antimicrobianos que dificulta a detecção do agente no rebanho (Barcellos et al., 2000a).

A DS foi detectada pela primeira vez na Itália, em 2001 (Calderaro et al., 2001), e sua prevalência na Europa é consideravelmente importante. A prevalência da *B. hyodysenteriae*, varia em média entre 2% e 30% nos rebanhos em outros países europeus (Fellstrom et al., 1998; Heinonen et al., 1998; Møller et al., 1998, Thomson et al., 1998, Stege et al., 2000, Thomson et al., 2001, Magistrali et al., 2002; Carvajal et al., 2006).

Na Espanha a prevalência da DS foi investigada sendo encontrada em mais de 30% das fazendas espanholas e 12% de espécimes fecais positivos para *B. hyodysenteriae* (Carvajal et al., 2006). Em uma pesquisa sueca feita em 19 rebanhos selecionados aleatoriamente, 65% de todas as amostras e 89% dos rebanhos foram positivos para espiroquetas intestinais fracamente β-hemolíticas. Na mesma pesquisa, *B. pilosicoli* foi isolada de seis dos sete rebanhos com diarreia, mas de apenas um dos oito rebanhos sem diarreia (Fellstrom et al., 1996). Entre 1996 e 1997 foi detectado na Suécia 27% de *B. hyodysenteriae* e 18% de *B. pilosicoli* em animais de 894 granjas com histórico de diarreia (Fellstrom et al., 1998). Na Finlândia em 1997 foi observado 28% *B. pilosicoli*, no entanto não foi possível avaliar a presença ou ausência de diarreia associada (Heinonen et al., 1998).

No Reino Unido foram executados importantes trabalhos de prevalência relacionados às espiroquetas. Um estudo realizado entre 1992 e 1996 foi reportada a presença de *B. pilosicoli* nos animais em crescimento em 32,9% das granjas. Infecções mistas de *B. pilosicoli* associada foram detectadas com *Yersinia pseudotuberculosis* (9,4%), *L. intracellularis* (7,1%) e *B. hyodysenteriae* (2,4%) em 18,8% das granjas avaliadas (Thomson et al., 1998). Em outro trabalho Thomson et al. (2001), realizado entre os anos de 1997 e 1999, foram avaliadas as causas de colite em 98 granjas de suínos no reino unido. *B. pilosicoli* foi detectada em 18% dos rebanhos e em 24% de infecções mistas. *B. hyodysenteriae* foi prevalente em 13% dos rebanhos e em 16% em infecções mistas.

Em um trabalho executado por Stege et al. (2000), avaliou-se a prevalência de enterites bacterianas, sendo encontrado para *B. hyodysenteriae* (2.5%), *B. intermedia* (12.7%), *B. innocens*

(34.2%), *B. pilosicoli* (19.0%) das granjas. A prevalência de *L. intracellularise* e *B. hyodysenteriae* juntas foram  $25 \pm 30\%$ . Isolados mistos de *Brachyspira* também tem sido reportados em 1,7 a 3,8% entre animais doentes e saudáveis (Rhode et al., 2002; La et al., 2003).

Nos Estados Unidos foi feito um trabalho com base em um teste sorológico e 11% dos rebanhos nos EUA eram infectados com *B. hyodysenteriae* (Mapother, 1993). Já em um trabalho de Moller et al. (1998), 39% e 14% dos rebanhos com diarreia foram positivos para espiroquetas intestinais fracamente b-hemolíticas e *B. hyodysenteriae*, respectivamente. Na Austrália, em um trabalho sorológico, 33% dos rebanhos foram infectados com *B. hyodysenteriae* (Mhoma et al., 1992).

No Brasil, a DS ocorre desde a década de 1970 e afeta muitos rebanhos no país. Até 2010 eram observados casos esporádicos com baixa importância epidemiológica (Barcellos, 2000). A partir dessa data houve a reemergência de surtos em vários estados brasileiros (Daniel et al., 2017). Existem poucos trabalhos relatando a prevalência no país. Em um dos primeiros trabalhos que avaliou a presença de espiroqueta no Brasil foi por Barcellos et al., (2000b), encontrou 35,3% de *B. hyodysenteriae* em 17 fazendas de suínos comerciais no Brasil, das quais os suínos não eram medicados e apresentavam sinais clínicos de diarreia (Barcellos et al., 2000a). Em um trabalho feito em São Paulo foi detectada também uma baixa prevalência de *B. hyodysenteriae* (1,4%) e *Brachyspira pilosicoli* (1%) (Bacarro et al., 2003). Em Minas Gerais, em um trabalho feito por Viott et al. (2013), foram detectadas apenas duas granjas positivas para *B. pilosicoli* e nenhuma para *B. hyodysenteriae*. Recentemente em um trabalho feito em 30 granjas do Espírito Santo não foram detectados animais positivos para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* (Oliveira et al., 2016).

## 6.12 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DS depende principalmente do histórico do rebanho e da observação típica dos sinais clínicos de diarreia. Para diagnóstico definitivo é importante utilizar técnicas como isolamento, identificação fenotípica, avaliação histológica de lesões induzidas por espiroquetas, além de ensaios baseados em DNA e utilização de hibridização in situ (Park et al., 1995; Fellstrom et al., 1997; Atyeo et al., 1998; Boye et al., 1998; Fellstrom et al., 2001; La et al., 2003). Os diagnósticos diferenciais para a infecção por *Brachyspira* em geral são executados para agentes como *L. intracellularis*, *Salmonella* sp., *E. coli* e *Trichuris suis* (Taylor, 2005).

A cultura é considerada padrão ouro, no entanto é laboriosa, uma vez que as bactérias têm um crescimento lento ou podem ser inibidas pelo uso de antimicrobianos (Duhamel et al., 1995; Kraaz, et al., 2000). As espécies de *Brachyspira* demoram entre 2 e 7 dias para obter um crescimento satisfatório utilizando uma temperatura entre 37 e 42°C (Hovind-Hougen, et al., 1982) sob condições anaeróbicas, embora que, pequenas quantidades de oxigênio sejam importantes para permitir um crescimento eficiente (Stanton e Lebo, 1988).

Dentre as análises fenotípicas, encontramos os testes de avaliação da hemólise em agar sangue, produção de indol, hidrólise do hipurato, e atividade de galactosidase e glucosidase que se correlacionam com os agrupamentos filogenéticos (Pettersson et al., 1996) e correspondem aproximadamente as espécies do gênero *Brachyspira* isoladas de suínos para *B. hyodysenteriae* (grupo I), *B. intermedia* (grupo II), *B. murdochii* (grupo IIIa), *B. innocens* (grupo IIIbc) e *B. pilosicoli* (grupo IV). Fellstrom et al., (1995) e Fellstrom e Gunnarsson (1995) separaram as espécies de *Brachyspira* em seis grupos com características bioquímicas diferentes. No entanto, para *B. intermedia* é possível observar dificuldade em diferenciação (Duhamel e Joens 1994; Duhamel et al., 1995; Pettersson et al., 1996; Stanton et al., 1997, Fellstrom et al., 1997, Umniappa et al., 1997).

Existem testes sorológicos afim de identificar rebanhos positivos, no entanto, ainda não foram desenvolvidos “kits” comerciais. A extensa diversidade dos sorogrupos é a grande limitação para produção de testes sorológicos com alta sensibilidade e especificidade (Songer et al., 2015; Herbst et al., 2017). Os sorotipos 8 e 9 são comuns no Canadá e 1 e 2 nos Estados Unidos (Joens et al., 1982; Li et al., 1991). Dessa forma, é importante desenvolver um teste sorológico que detecte todos os sorogrupos e não demonstre reação cruzada com outras espécies. O uso de proteínas recombinantes é uma potencial alternativa para utilização em testes sorológicos, e com o sequenciamento genômico completo é possível uma evolução no que diz

respeito à busca de proteínas candidatas para serem utilizadas (Belgard et al., 2009; Casas et al., 2017; Black et al., 2015). Estudos recentes utilizam proteínas recombinantes têm sido realizados com intuito de desenvolver um teste sorológico como ferramenta importante para detectar rebanhos positivos de *B. hyodysenteriae* sem sinais clínicos de DS (Song et al., 2015; Hampson et al., 2016).

Em relação aos testes baseados em DNA, vários métodos são utilizados para análise de espécies de *Brachyspira* como, reação em cadeia da polimerase (PCR), análise com endonuclease de restrição (REA – *Restriction endonuclease analysis*), eletroforese enzimática multilocus (MLEE – *Multilocus enzyme electrophoresis*), polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Polymorphism*), eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE – *Pulsed-field Gel Electrophoresis*) e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*) (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).

Os testes de PCR utilizam DNA extraído diretamente de fezes podem utilizar da técnica convencional (La et al., 2003) ou em tempo real (Song e Hampson, 2009; Willems e Reiner, 2010). Foi desenvolvido um PCR tempo real multiplex para várias espécies de *Brachyspira* sendo considerado promissor ao obter bons valores de sensibilidade e especificidade (Borgström et al., 2017).

Através do sequenciamento de determinados genes é possível identificação de espécies. Os genes que são utilizados para o diagnóstico incluem: o gene NOX (Atyeo et al., 1999; La et al., 2003) o gene 23S rRNA (Leser et al., 1997; Barcellos et al., 2000b) o gene tlyA (Fellström, et al., 2001); o gene 16S rRNA (Park et al., 1995; Fellström et al., 1997; La et al., 2003). O gene NADH-oxidase (NOX) é um marcador genético comumente usado para *Brachyspira*, pois proporciona maior diferenciação de espécies de *Brachyspira* que outros alvos de genes universais, como o gene 16S rRNA (Chander et al., 2012) uma vez que pode ser insuficiente para a identificação das espécies por ser muito conservado (Pettersson et al., 1996; Stanton, et al., 1996). O gene 23S rRNA também é utilizado para estudos filogenéticos de membros do gênero *Brachyspira* (Leser, et al., 1997; Atyeo, et al., 1999).

A tipagem de sequências de múltiplos *locus* gênicos (MLST - *Multilocus sequence typing*) (La et al., 2009) e análise em *multilocus* das repetições em *tandem* de número variável (MLVA – *Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis* e sequenciamento do genoma completo são técnicas que auxiliam na classificação mais completa dos grupos dentro da espécie, além de ser possível uma análise de epidemiologia molecular ao trabalhar os dados obtidos (Råsbäck et al., 2007; Belgard et al., 2009; Laet al., 2009; Hidalgo et al., 2010; Phillips et al., 2010; Osorio et al., 2012; Neo et al., 2013; Mirajkar e Gebhart, 2014). O MLST utiliza genes conservados para determinação de grupos clonais (Råsbäck et al., 2007; La et al., 2009; Osorio et al., 2012). O uso de MLST com sete loci foi altamente discriminatório comparado com demais técnicas moleculares (La et al., 2009). O sequenciamento é considerado o “padrão-ouro” para a identificação a nível de espécies (Rohde et al., 2014; Perez et al., 2016).

Os sistemas de espectrometria de massa de tempo de voo de ionização de desorção com laser matricial (MALDI-TOF) são ferramentas utilizados para a identificação de microrganismos em geral. O MALDI-TOF MS tem a vantagem de identificar isolados bacterianos de forma precisa e econômica, apesar dos custos iniciais de instalação serem onerosos (Bizzini e Greub, 2010). Demonstrou-se que é um método útil para a identificação de espécies de *Brachyspira*, no entanto, não é suficiente para se diferenciar entre grupos de "*B. hamptonii*" (Calderaro et al., 2013; Warneke et al., 2014).

### 6.13 RESPOSTA IMUNE

A resposta imune para suínos que se recuperam da DS é considerada duradoura podendo proteger contra o desafio subsequente por até 17 semanas (Olson, 1974; Joens et al., 1979). No entanto, uma proporção de animais ainda continua susceptível (Joens et al., 1979; Rees et al., 1989A), e cerca de 10% podem tornar-se totalmente protegidos após responder duas vezes à infecção (Rees et al., 1989A). Além da resposta humoral, a imunidade celular é considerada importante em animais convalescentes (Jenkins et al., 1982).

*B. hyodysenteriae* induz resposta específica ao sorotipo, dirigido contra antígenos (LOS) presentes na parede celular (Joens et al., 1983). Após infecção, observa-se um aumento nos títulos de anticorpos presentes no soro. Os títulos elevados de IgG coincidem com a fase clínica. Títulos elevados de IgA em lavados colônicos são indicativos de recente exposição (Rees et al., 1989B).

Anticorpos IgG, IgM e IgA foram detectados após o desafio em suínos anteriormente vacinados com inóculo inativado em formalina (Fernie et al., 1983). O aparecimento destes anticorpos não tem sido relacionado com recuperação da doença (Rees et al., 1989A), mas podem estar envolvidos na proteção contra a reinfeção (Joens et al., 1979). A produção sistêmica de IgG e uma produção local de IgA foram detectadas em soros de suínos convalescentes (Mahu et al., 2017), sendo assim, indícios da importância da resposta proveniente de IgA na mucosa (Rhess et al., 1989A,B).

Em um trabalho recente, foi observado um aumento de nove vezes nos níveis de ILR-17A (Quintana-hawashi et al., 2017). Além disso, suínos infectados experimentalmente com *B. hyodysenteriae* foi observado um aumento dos níveis séricos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  durante os sinais clínicos, no entanto, não foram detectadas concentrações de IFN- $\gamma$  antes e após a inoculação (Kruse et al., 2008).

*In vitro* também foi detectado um aumento de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  no processo de infecção quando avaliada em explantes. Após o pico na expressão dos mediadores inflamatórios foi detectado um aumento do exsudato catarral e número de células necróticas da cripta (Costa et al., 2017). TNF- $\alpha$  tem sido ligado em outros trabalhos à danos histológicos (Arnold et al., 1993), dessa forma as lesões podem ser exarcebadas dependendo da resposta do hospedeiro.

A importância das células CD4 + na resposta imune após uma infecção por *B. hyodysenteriae* foi descrita por vários autores (Waters et al., 1999, Hontensillas et al., 2005). Além de CD4 +, estudos de imunização em suínos com bacterina em *B. hyodysenteriae* indicam um aumento de células T CD8<sup>+</sup> tanto no sangue periférico quanto na mucosa (Waters et al., 1999B). Corroborando com esses resultados, outros trabalhos detectaram um aumento nas células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> e T $\gamma\delta$  circulantes. As células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> aumentam com a idade e são consideradas células de memória (Pescovitz et al., 1994; Zuckermann e Husmann, 1996). As células T $\gamma\delta$  são consideradas importantes na resposta precoce contra infecções em superfícies epiteliais (Boismenu e Havran, 1994; Ishigami et al, 1999) e na resposta imune de suínos jovens (Yang e Parkhouse, 1996).

Em relação a evasão do sistema imune executada pelas espiroquetas ainda não está totalmente elucidado, porém foram encontrados um conjunto de genes que codificam uma proteína de superfície variável que possui uma expressão diferencial (Witchell et al., 2006).

## 6.14 VACINAS

Desde 1979, grandes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de vacinas para controlar a DS (Joens et al., 1979). Várias tentativas foram feitas para usar vacinas avirulentas vivas atenuadas ou modificadas geneticamente para DS, no entanto sem sucesso (Hudson et al., 1976; Hyatt et al., 1994; Rosey et al., 1996; Stanton et al., 1996; Kennedy et al., 1997; Stanton et al., 1999). A falta de dados a respeito da resposta imune impediu o desenvolvimento de eficientes vacinas comerciais (Song et al., 2015).

Vacinas a base de bacterina e isolados atenuados fornecem proteção contra DS (Hampson et al., 1993; Hyatt et al., 1994; Diego et al., 1995; Waters et al, 1999a). No entanto, não fornecem imunidade cruzada contra cepas de diferentes sorogrupos, sendo assim necessário o uso de vacinas autógenas ou polivalentes. Além disso, a produção em larga escala é onerosa e difícil de ser executada, devido aos requisitos de crescimento fastidiosos da espiroqueta (Hampson et al., 2015).

Isolados não virulentos, de baixa virulência têm sido usados isolados ou combinados à bacterinas (Lysons et al., 1986), mutantes produzidos com menor capacidade hemolítica, com baixa motilidade, baixa capacidade de sobreviver sob tensão de oxigênio, no entanto, devido a ausência desses fatores de virulência, observou-se uma reduzida capacidade de colonização produzindo imunidade protetora limitada (Hyatt et al., 1994; Kennedy et al., 1997; Rosey et al., 1996; Stanton et al., 1999).

Uma alternativa utilizada é a produção de vacinas de proteínas recombinantes (Song et al., 2009). As investigações sobre potenciais alvos de tais vacinas recombinantes têm-se centrado sobre as proteínas da membrana externa (Joens et al., 1993; La et al., 2004), presente nos flagelos (Boyden et al., 1989) ou proteínas de armazenamento de ferro, no entanto essas vacinas não conseguiram fornecer proteção suficiente em suínos (Davis et al., 2005).

O uso de proteínas recombinantes também tem potencial para auxiliar no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico. Com genomas sequenciados cada vez mais completos e anotados nos bancos de dados (Bellgard et al., 2009, Black et al., 2015, Mirajkar et al., 2016b), aumentou relativamente as informações relacionada às possíveis proteínas candidatas.

A lipoproteína de membrana externa (Bhlp29.7) foi testada como uma alternativa de vacina para o controle da DS (La et al., 2009; Lobo et al., 2011). No entanto, o gene também não é encontrado em todos os sorotipos de *B. hyodysenteriae* (Barth et al., 2012). Mais recentemente, a proteína de superfície denominada H114 também foi testada, porém os autores encontraram um número elevado de rebanhos falso-positivos (Song et al., 2015). Em outro estudo, a vacinação de suínos com a proteína recombinante BmpB reduziu a incidência de doença em aproximadamente 50% após o desafio com *B. hyodysenteriae* (La et al., 2004).

Uma pesquisa com exoproteínas detectou 42 de 307 proteínas de superfície comumente observadas em cepas de *B. hyodysenteriae*, incluindo McpA, McpC e Vsp. A proteína Vsp é considerada a mais sintetizada pela *B. hyodysenteriae* (Witchell et al., 2011; Casas et al., 2016). Essas proteínas recém-detectadas são um caminho importante para a obtenção de uma nova vacina eficiente.

Mais recentemente, uma patente foi registrada para o desenvolvimento de uma vacina que se propõe incluir 33 genes de superfície externa candidatos, proteínas segregadas e de fatores de virulência descritos em bancos de dados público (Bellgard et al., 2015).

## **6.15 TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA**

### **6.15.1 USO DE ANTIMICROBIANOS**

A DS é geralmente controlada por terapia antimicrobiana associado à um programa de erradicação com acompanhamento sanitário e manejo em granjas infectadas (Hampson et al., 1997). Os fármacos mais comumente utilizados são as pleromutilinas (tiamulina e valnemulina) (Novotna e Skardova, 2002). Tilosina, virginiamicina, bacitracina são utilizados, porém em menor volume (Rhode et al., 2004). Em geral, as espécies de *Brachyspira* apresentaram alta suscetibilidade à tiamulina, valnemulina e carbadox, sendo possível observar susceptibilidade heterogênea à doxiciclina e baixa susceptibilidade à lincomicina e tilosina (Mirajkar et al., 2016; Daniel et al., 2017).

Antes de 1980, a tilosina, lincomicina e carbadox foram amplamente utilizados para tratar e prevenir a disenteria suína. No entanto a porcentagem de isolados resistentes à lincomicina e tilosina aumentou consideravelmente em vários países. Isolados multirresistentes foram descritos em macrolídeos, lincosamidas, pleuromutilinas, doxiciclina, cloranfenicol e florfenicol (Molnar 1996; Karlsson et al., 2002, 2003, 2004; Lobo et al., 2004; Pringle et al., 2004; Rohde et al., 2004; Pringle et al., 2007; Duinhof et al., 2008; Hidalgo et al., 2011; Verlinden et al., 2011; Sperling et al., 2011; Pringle et al., 2012; van Duijkeren et al., 2014; Hillen et al. 2014; Rugna et al., 2015; Mirajkar et al., 2016; Daniel et al., 2017).

Uma alternativa recentemente utilizada são os compostos nutracêuticos e óleos essenciais no controle da DS. Em um trabalho feito por de Nova et al., (2017) um composto de extrato cítrico foi avaliado obtendo bons resultados “*in vitro*”. Extratos à base de tomilho são considerados eficientes no controle da DS (Kutasi et al., 2016), e tem funcionado como uma alternativa adicional para controle dessa enfermidade (Alvarez-Ordóñez et al., 2013).

## 6.15.2 PROGRAMAS DE ERRADICAÇÃO E CONTROLE

Para eliminação da DS é necessária a criação de um programa de controle e erradicação do patógeno na granja. Para isso são utilizados os projetos de despovoamento parcial ou total, considerados os mais eficientes quando associados à desinfecção, uso de antimicrobianos em pulsos durante o processo e mudanças de manejo em geral (Speiser et al., 2011).

Wood e Lysons (1988) sugeriram que as chances de um programa de erradicação ter sucesso são de cerca de 80 a 90% em rebanhos cuidadosamente selecionados. O custo para a eliminação da DS pode ser recuperado entre 6 a 12 meses (Windsor e Simmons 1981; Wood e Lysons, 1988).

A utilização de despovoamento parcial com medicação associada à utilização de desmame precoce medicado, vazio, desinfecção de cada unidade em um ciclo e introdução de animais medicados para unidades limpas e desinfetadas é uma alternativa utilizada, no entanto é necessário bom planejamento, organização e cooperação do corpo de trabalho para a granja manter-se livre após a erradicação (Hampson, 2012).

O despovoamento total, a limpeza, a desinfecção às vezes são o único método viável para eliminar *B. hyodysenteriae*, no entanto, só deve ser instituído após cálculos financeiros precisos (Wood e Lysons, 1988).

Durante o período de erradicação e após eliminação do agente da granja são necessárias mudanças principalmente relacionadas ao manejo em geral. É importante comprar apenas animais provenientes de granjas livre de DS. Associado a esse trabalho, é necessário o gerenciamento completo e integral com limpeza e desinfecção entre lotes afim de reduzir os riscos de reinfecção e limitar a propagação da infecção. A técnica de todos dentro todos fora facilita a interrupção da transmissão de infecção entre os estágios de produção. O controle de roedores e insetos deve ser eficiente uma vez que podem funcionar como disseminantes. O controle da entrada de animais, trânsito de pessoas, entrada e saída de veículos, controle da entrada de fomites através de, implementos agrícolas também são essenciais para o sucesso desse processo (Hampson, 2012).

A amostragem de um grande número suínos em grupos etários susceptíveis em ocasiões repetidas, combinada com análises de amostras agrupadas por meio de testes bioquímicos/PCR, funcionam como métodos úteis em um programa de monitoria (Fellstron et al., 2001).

A contaminação ambiental de todas as áreas, deve ser removida com lavagem sob alta pressão de água quente seguida de desinfecção. A água da lagoa contendo efluente pode ser uma fonte de infecção. Dessa forma, não deve ser reciclada. Afim de controlar a contaminação é necessário conhecer a susceptibilidade quanto à desinfetantes e tempo de sobrevivência como serão descritos (Glock et al., 1975).

É observada susceptibilidade de *Brachyspira* spp. para os desinfetantes mais comumente usados nas concentrações recomendadas para formalina (0,4%), cloroxyleno (2,5%), fenol (1%) hipoclorito (2%), carbonato decahidrato (4%) após cinco minutos de ação. Compostos fenólicos são os mais efetivos (Chia, 1977).

Em trabalhos “*in vitro*” foi observada a viabilidade em fezes diluídas armazenadas a 5 °C por até 60 dias. Em temperaturas abaixo de 10°C por 30 dias e sob 22°C por 8 dias (Chia e Taylor, 1978).

Culturas puras de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* adicionadas em concentrações elevadas às fezes suínas ou solo à 10 °C permanecem viáveis entre 78 a 210 dias (Boye et al., 2001). Fatores ambientais como a umidade e a temperatura, afetam a sobrevivência.

Em um trabalho feito por Barcellos et al., (2002) foi observado o tempo de sobrevivência de espiroquetas sendo que, *B. pilosicoli* tem maior capacidade de sobrevivência do que *B. hyodysenteriae* sob 24°C e 37°C.

A sobrevivência em efluentes é por volta de 5 dias, no entanto sendo capaz de infectar animais saudáveis em temperaturas entre 13 e 32°C (Olson et al., 1995). As células de *B. pilosicoli* sobrevivem em água do lago durante 66 dias a 4 °C (Oxberry et al., 1998).



## 7. ENTEROPATIA PROLIFERATIVA

A enteropatia proliferativa suína EPS é uma enfermidade que cursa em diarreia causada pela bactéria *Lawsonia intracellularis*, um importante patógeno principalmente nas fases de recria e terminação (Smith e McOrist, 1997; Lawson e Gebhart, 2000), endêmica em granjas de suínos em sistema intensivo (Kroll et al., 2005), além de considerada patógeno emergente para equinos (Lavoie et al., 2000). As perdas econômicas devidas à EPS foram estimadas em alguns trabalhos chegando a 20 milhões de dólares anuais (Winkelman e Dee, 1996) e custo médio anual de 20 dólares por matriz (Lawson e McOrist, 1993).

*L. intracellularis* é um bacilo gram-negativo microaerófilo, de forma curva ou sigmoide e a única bactéria presente em seu gênero. É revestido por envelope externo trilaminar com dimensões celulares totais entre 0,25 a 0,43 µm de largura e 1,25 a 1,75 µm de comprimento (Lawson et al., 1993; McOrist et al., 1995). Possui flagelo unipolar conferindo motilidade (Lawson e Gebhart, 2000).

Foi relatada pela primeira vez em 1931 (Biester, 1931). Na década de 1970 foram observados microrganismos em lesões proliferativas em suínos com o quadro de enterite proliferativa, no entanto o isolamento e caracterização ainda era distante (Rowland et al. em 1973; Lawson et al., 1979). Em 1993, o mesmo grupo de pesquisa concluiu o postulado de Koch (Gebhart et al., 1993; Lawson et al., 1993; McOrist et al., 1993) e, em 1995, foi possível a classificação taxonômica (McOrist et al., 1995).

O isolamento e o cultivo “*in vitro*” são os fatores limitantes na pesquisa, uma vez que ainda não foi possível o cultivo sem a presença de células devido à necessidades metabólicas estritas (Schmitz-Esser et al., 2008), além disso, poucos grupos de pesquisas dominam as técnicas de cultivo no mundo.

Pela classificação taxonômica, pertence à subdivisão delta das Proteobactérias da família Desulfovibrionaceae (Gebhart et al., 1993). Em trabalhos em que avaliaram a proximidade taxonômica com outros microrganismos, *Bilophila wadsworthia* e *Desulfovibrio desulfuricans* foram consideradas as espécies geneticamente relacionadas à *L. intracellularis* (Gebhart et al., 1993; Sapico et al., 1994).

Em relação ao genoma da *L. intracellularis* com base em sequenciamento completo, foram detectados um total de 1.457.619 pares de bases presentes em 1 cromossomo e 3 plasmídeos além de 1 elemento proveniente de prófago (Vannucci et al., 2013a). Possui o genoma pequeno, baixo conteúdo de guanina e citosina e expressão significativa de proteínas presentes em bactérias intracelulares simbiotes (Dale et al., 1998).

### 7.1 SINAIS CLÍNICOS

A EPS pode apresentar três tipos de apresentação clínica: forma aguda, crônica e subclínica (Lawson e Gebhart, 2000; Kroll et al., 2005).

Suínos jovens entre 6 e 20 semanas tendem a possuir o quadro de adenomatose intestinal suína associado à anorexia, diarreia e diminuição no ganho de peso, caracterizado como a forma crônica (Lawson e Gebhart, 2000). Em casos graves de adenomatose intestinal é possível observar enterite necrosante caracterizada por necrose de coagulação da mucosa (Rowland & Hutchings, 1978).

Na forma aguda é observado um quadro grave de enterite hemorrágica podendo levar à morte súbita (Lawson & Gebhart, 2000). A forma hemorrágica é comumente observada em animais mais velhos e fêmeas de reposição que são introduzidos recentemente no rebanho (Rowland & Lawson 1975; Kroll et al., 2005). Alguns animais podem morrer sem anormalidade fecal e pode ser observada apenas palidez acentuada (McOrist et al., 1999).

A forma subclínica é associada à uma conversão alimentar ruim dos animais com queda de desempenho zootécnico, no entanto não é possível observar claramente quadro de diarreia (Collins & Barchia, 2014). Os casos subclínicos são frequentes em rebanhos e são de grande importância para permanência do agente na granja, uma vez que ocorre eliminação intermitente de *L. intracellularis* associado a um desenvolvimento retardado (Jacobson et al., 2003).

Em fazendas de um único sítio, a infecção geralmente ocorre algumas semanas após o desmame quando os anticorpos maternos desaparecem (Stege et al., 2004). Em todas as formas de EPS é observada proliferação de células epiteliais intestinais (Lawson & Gebhart, 2000).

Outro fator observado é a perda proteica devido à diarreia e a absorção de nutrientes reduzida pela mucosa intestinal, considerado um dos importantes fatores para perda de peso e diminuição no desempenho (Rowan & Lawrence, 1982; Gogolewski et al., 1991, Vanucci et al., 2010).

No caso da eliminação do agente nas fezes estudos anteriores indicam que animais naturalmente expostos à *L. intracellularis* eliminam entre  $10^5$  e  $10^8$  *L. intracellularis* por grama de fezes, enquanto animais clinicamente afetados eliminam em média  $10^8$  chegando à  $10^{10}$  em animais inoculados (Collins et al., 2011; Johansen et al., 2013).

## 7.2 ACHADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

A lesão comumente observada é o espessamento da mucosa do intestino devido à proliferação de enterócitos de forma difusa ou multifocal no íleo e, em alguns casos, no jejuno, ceco e cólon (McOrist & Gebhart, 2012).

Macroscopicamente, animais jovens têm o íleo como sítio primário de infecção e, menos comumente, o intestino grosso. Lesões como edema de serosa, áreas de necrose com espessamento da mucosa e epitélio são consideradas típicas desse quadro. Em animais nas fases finais acometidos pela forma aguda, é possível observar espessamento de mucosa, lesões proliferativas, conteúdo hemorrágico associado à fibrina e congestão acentuada (Lawson & Gebhart, 2000).

A enterite proliferativa desenvolve-se inicialmente com uma proliferação progressiva de células epiteliais imaturas. Na maioria dos casos, não é possível observar facilmente reação inflamatória significativa. Nos casos graves é possível observar aumento de volume dos linfonodos mesentéricos (Roberts et al., 1980; Jensen et al., 2000) e, microscopicamente, são encontradas células epiteliais imaturas associada à hiperplasia de enterócitos e diminuição das células caliciformes (Smith & Lawson, 2001; Vannucci et al., 2013b). As lesões se tornam severas por volta de 21 a 28 dias pós infecção em cerca de 50% a 100%, dos animais desafiados (Guedes & Gebhart 2003b). As lesões não causam comprometimento sistêmico, é observado em alguns casos alterações circulatórias como hiperemia e edema (Smith & Lawson, 2001).

Em alguns trabalhos utilizando imunomarcacção foi possível positividade específica no interior de macrófagos, no entanto tem sido relacionado a transporte de antígenos (Gebhart & Guedes, 2010), sendo considerada uma possível via de disseminação da infecção para criptas distantes (Boutrup et al., 2010).

## 7.3 PATOGÊNESE

Existem alguns trabalhos à respeito da patogênese da enteropatia proliferativa, no entanto vários aspectos relacionados à fisiopatologia dessa enfermidade ainda não foram completamente elucidados (Vannucci & Gebhart, 2014).

A doença é reproduzida através da utilização de cultura pura em passagens baixas (McOrist et al., 1993; McOrist et al., 1996 Guedes & Gebhart, 2003c) com atenuação dos isolados entre 20 e 40 passagens. A perda da virulência ocorre devido à adaptação “*in vitro*” e perda de partes do genoma bacteriano (Vannucci et al., 2013b).

Até a chegada aos enterócitos, *L. intracellularis* passa por condições adversas que limitam a colonização, sendo o pH ácido do estômago um dos maiores limitantes até a sua chegada ao intestino. Existem mecanismos que auxiliam a sobrevivência desenvolvidos com intuito de manter o pH e a homeostase denominado operon FOF1-ATPase e o sistema glutamato descarboxilase (GAD) (Vannucci et al., 2013c). O operon FOF1-ATPase mantém a homeostase dos microrganismos nesse ambiente (Ryan et al., 2008). O sistema (GAD) está presente em outras espécies que transitam em ambientes com baixo pH (Smith, 2003). Em uma avaliação do perfil de transcrição de *L. intracellularis* foram encontrados níveis elevados de expressão de mecanismos que auxiliam na proteção oxidativa (Vannucci et al., 2013c; Vannucci et al., 2012a),

importante para o metabolismo da *L. intracellularis* e demais bactérias intracelulares (Schmitz-Esser, et al., 2004; Schmitz-Esser et al., 2008).

Além de mecanismos físico-químicos, a presença de um flagelo unipolar representa um componente importante para infecção (Smith & Lawson, 2001), uma vez que auxilia na chegada e entrada do microrganismo no epitélio intestinal (Vannucci et al., 2012a).

Um fator relevante presente que auxilia na colonização do ambiente intestinal é a inibição da produção de muco via *MUC2*, e genes como *RETNLB*, *TFF2*, *TFF3* e *CLDN15* diminuindo a barreira protetiva da célula e permitindo a invasão celular (Smith et al., 2014; Bengtsson et al., 2015).

Em um trabalho de proteômica foram identificadas 19 proteínas com papéis importantes no metabolismo celular, síntese proteica e proteção ao estresse oxidativo, além de proteínas associadas a membranas exteriores, importantes na patogênese, incluindo a adesão e invasão, proteínas essas que podem futuramente auxiliar no avanço de estudos de patogênese (Watson et al., 2014).

Após o estabelecimento no ambiente intestinal, a internalização e replicação celular ainda não são totalmente elucidadas nos primeiros cinco dias após infecção (Lawson & Gebhart, 2000). *L. intracellularis* infecta enterócitos imaturos em criptas intestinais e estimula a divisão celular contínua, fator considerado como pré-requisito para a replicação bacteriana (Smith & Lawson, 2001).

Em um trabalho “*in vitro*”, as bactérias foram encontradas associadas com superfícies celulares depois de 10 minutos e internalizadas sendo formado um vacúolo de entrada que se rompe no citoplasma em média após 3 horas (McOrist, et al., 1995B). Essa internalização foi dependente da atividade da célula hospedeira, polimerização de actina e outros mecanismos específicos envolvidos, no entanto independe da viabilidade da bactéria (Lawson et al., 1995), uma vez que foi observada a internalização de organismos mortos e diminuição da invasão bacteriana após bloqueio do citoesqueleto utilizando citocalasina D “*in vitro*” (Lawson et al., 1995; McOrist, et al., 1995B). Não foram identificados mecanismos específicos, no entanto a *L. intracellularis* possui um sistema de secreção tipo III conservado entre os isolados, do qual permite a bactéria infectar mais facilmente a célula hospedeira (Alberdi et al., 2009).

Os mecanismos que levam à proliferação celular estão relacionados à interferência no processo de diferenciação das células da cripta (McOrist et al., 2006; Oh et al., 2009) baseados na alteração da expressão de proteínas que atuam na fase G1 do ciclo celular no hospedeiro (Vannucci et al., 2013c; Vannucci et al., 2012a). Os enterócitos infectados mostram ativação significativa da transcrição do DNA, biossíntese de proteínas e genes RhoA, RhoB e Rho GTPase (Boutrup et al., 2010). As proteínas Rho especificamente são “G1-check point” liberam sinais dos quais avisam quanto à ativação da célula no estágio proliferativo. Se os sinais responsáveis por promover esta transição não estão presentes, as células entram na fase não-proliferativa (Oswald et al., 2005).

A ativação de genes que atuam na fase G1 do ciclo celular tem sido bem descrito na oncogênese (Pruitt & Der, 2001), dessa forma trabalhos relacionados à aspectos da oncogênese e a infecção por *Lawsonia* podem dar novas informações quanto à patogênese da EPS a nível celular.

Dentro das criptas, a propagação de *L. intracellularis* ocorre por divisão celular e consequente disseminação para áreas não afetadas (Smith & Lawson, 2001). As células infectadas ao dividir-se passam células bacterianas para as células filhas (Lawson et al., 1993).

Não existem informações concretas sobre a importância dos macrófagos na patogênese da enteropatia proliferativa, no entanto estudos recentes identificaram genes com função de interferir no tráfego intracelular e sobrevivência em macrófagos (Uchiya et al., 1999; Boutrup et al., 2010), sendo assim considerado um potencial mecanismo de disseminação do agente para criptas distantes.

Outro aspecto importante observado, foi a expressão reduzida de genes envolvidos em apoptose aos 21 dias pós-infecção por *L. intracellularis* (Vannucci et al., 2013c). Nos estágios tardios da infecção, o desaparecimento da bactéria nos enterócitos foi associado a retomada de eventos apoptóticos e a aparência histológica normal da mucosa intestinal (McOrist et al., 1996). A diminuição da apoptose foi sugerida como um mecanismo pelo qual *L. intracellularis* induz a

proliferação de enterócitos infectados. (McOrist et al., 1996; Vannucci et al., 2013c). Contrapondo estes trabalhos outros estudos sugerem um aumento na apoptose (Guedes et al., 2017; Huan et al., 2017). Em um trabalho realizado por Guedes et al. (2017) foram observados eventos apoptóticos elevados nos dias 11, 15, 19 e 24 pós-infecção em células de animais suínos inoculados experimentalmente com *L. intracellularis*. Embora a análise da transcrição tenha demonstrado estímulos para diminuir a apoptose, existem eventos pós-transcrição que regulam o ciclo celular concluindo assim que a inibição da apoptose dos enterócitos não está envolvida na patogênese da EPS (Guedes et al., 2017).

#### **7.4 FISIOPATOLOGIA DA DIARREIA PELA *L. intracellularis***

A diarreia observada ocorre devido à hiperplasia das células da cripta tornando-as imaturas e com baixa capacidade absorptiva (McOrist et al., 1996). Tem sido observada uma menor expressão dos transportadores de membrana envolvidos na digestão e absorção de nutrientes como de hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos biliares, lipídios, e vitamina B12. Esse déficit na absorção de nutrientes provoca um acúmulo de solutos no lúmen intestinal, sendo caracterizado por uma diarreia malabsortiva (Jacobson et al., 2011; Vannucci et al., 2013b). As células secretam eletrólitos para o lúmen intestinal (Welsh et al., 1982; Moeser & Bliklager, 2007), e tem sido observado que o gene que codifica este canal de cloreto responsável pelo transporte na infecção por *Lawsonia* é regulado negativamente resultando diarreia osmótica (Vannucci et al., 2010).

#### **7.5 INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NA ENTEROPATIA PROLIFERATIVA SUÍNA**

Acredita-se que a microbiota intestinal tenha influência na capacidade de sobrevivência e colonização da *L. intracellularis* (McOrist & Lawson, 1989). Além disso, existem trabalhos que relatam a importância da dieta auxiliando na colonização (Boesen et al., 2004; Molbak et al., 2008). Molbak et al. (2008) descrevem uma redução de *L. intracellularis* na microbiota ileal de suínos alimentados com uma dieta não peletizada.

Em um trabalho que avaliou a composição da microbiota de animais acometidos pela EPS observou-se que suínos desafiados com *L. intracellularis* exibiram redução de Proteobacteria e os filos mais comuns presentes foram Firmicutes seguido por Bacteroidetes. Os animais infectados apresentaram níveis aumentados de actinobactérias em relação aos demais grupos e em animais com 9 semanas de idade, houve uma diminuição significativa em número de espiroquetas em todos os grupos de desafio em comparação com o grupo controle (Borewicz et al., 2015).

#### **7.6 FATORES DE VIRULÊNCIA**

Os fatores de virulência presentes na *L. intracellularis* ainda não são bem caracterizados. Seu principal mecanismo patogênico é a invasão de enterócitos e indução de hiperplasia nas células (Lawson & Gebhart, 2000).

A atividade hemolítica é um fator de virulência importante observado infecção por *L. intracellularis* “in vitro” (Hannigan, 1997). Uma hemolisina pode estar envolvida na fixação e invasão bacteriana, o que facilita a evasão de vacúolos intracelulares (McCluskey et al., 2002). A sequência de aminoácidos presente no gene *LhlyA* mostrou aproximadamente 60% de homologia com proteínas semelhantes a hemolisina de outras bactérias (Kim et al., 2017).

Vannucci et al. (2013a) identificaram a presença um prófago em cepa de baixa passagem (10ª passagens) de *L. intracellularis* cultivada “in vitro”, e sua ausência em cepas atenuadas não patogênicas podendo ser considerado um potencial fator de virulência presente nessa região.

## 7.7 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A doença é distribuída em todo o mundo (McOrist, 2005) sendo relatada em vários países com produção expressiva de suínos. A prevalência varia em média entre 48% e 100% (Stege et al., 2000, Lee et al., 2001, Jacobson et al., 2005, Hands et al., 2010).

A transmissão da EPS ocorre pela ingestão de fezes contaminadas (Cooper & Gebhart, 1998). A propagação fecal-oral, o contato direto entre animais saudáveis e infectados, fezes contaminadas, fômites ou vetores são as principais fontes de disseminação. O tipo de instalação também facilita a propagação como pisos contaminados principalmente com lâminas de madeira, o que dificulta a limpeza (Guedes, 2004; Friedman et al., 2008).

A excreção é persistente na maioria dos animais contaminados, que dura de quatro a dez semanas após a infecção (Kroll et al., 2005), fazendo com que o agente seja dificilmente eliminado do rebanho.

*L. intracellularis* afeta principalmente suínos (Lawson & Gebhart, 2000) e equinos, no entanto tem sido demonstrado um aumento na importância desse agente para outras espécies (Arroyo et al., 2013; Guttmann et al., 2014) sendo encontrada em cobaias, coelhos, hamsters (Cooper & Gebhart 1998, Pusterla et al., 2009), cães, cervos, raposas, aves (Cooper & Gebhart, 1998; Feary et al., 2007; Klein et al., 1999) gatos, coelhos (Pusterla et al., 2012), lebres, gambás, coiotes (Pusterla et al., 2008), roedores (Collins et al., 2011; Pusterla et al., 2012; Gabardo, 2015), ema (Lemarchand et al., 1997), avestruz (Cooper et al., 1997), primatas não humanos (Klein et al., 1999; Lafortune et al., 2004; Wamsley et al., 2005), suínos selvagens (Dezorzova-Tomanova et al., 2006) em fezes de lobos (*Canis lupus*), raposa (*Vulpes vulpes*), veado (Tomanova et al., 2003; Dezorzova-Tomanova et al., 2006) roedores e gatos silvestres (Hwang et al., 2017), coruja águia da Eurásia (*Bubo bubo*, Strigidae), magpie preto (*Pica pica sericea*, Corvidae) e um corvo da selva (*Corvus macrorhynchos*, Corvidae) ( Yeh et al., 2017).

Ainda não foi possível confirmar a capacidade de infecção cruzada entre isolados de espécies diferentes. Vannucci et al. (2012c) detectou que animais com cepas de outras espécies não manifestam sinais clínicos quando inoculados, no entanto, são um risco de transmissão por veicular o agente. Collins et al., (2011) mostraram que a quantidade de *L. intracellularis* isolada em um grama de fezes de ratos selvagens é suficiente para causar infecção e, conseqüentemente, sinais clínicos de doença em leitões.

Em relação à sobrevivência no meio ambiente é possível encontrar bactérias viáveis por até duas semanas em (15 °C) (Collins et al., 2000), dessa forma medidas de higiene desenvolvidas são importantes para o controle do agente no ambiente.

Em relação aos desinfetantes utilizados, a amônia quaternária associada com aldeídos, agentes oxidantes ou peroximonossulfato de potássio (Collins et al., 2000; Wattanaphansak et al., 2009) utilizados sob pressão são eficientes para inativação da bactéria no ambiente (Corzo et al., 2005).

Alguns fatores predisponentes contribuem para a prevalência e a gravidade dos quadros de infecção, podendo variar de acordo com o tipo de sistema produtivo status sanitário, idade, nutrição, manejo (Kroll et al., 2005). Em relação aos fatores de risco foram observados que propriedades de ciclo completo que utilizam extensivamente antimicrobianos, com frequência de introdução de animais de outros rebanhos, e longo tempo de uso de instalações, utilização de piso de concreto aumentam a chance do estabelecimento da EPS no rebanho (Bane et al., 2001; Resende, 2015).

A lavagem e a limpeza rigorosas de fezes, instalações, botas e equipamentos em fazendas, controle de insetos e roedores, uso de sistema semi intensivo, uso de quarentena são as técnicas eficientes para diminuir o desafio (Smith et al., 1998; Bronsvort et al., 2001; Corzo et al., 2005; Resende, 2015).

A ocorrência de *L. intracellularis* foi relatada em vários países ao longo do mundo com prevalência entre 15% e 100% nos rebanhos (Thomson et al., 1998; Stege et al., 2000, Lee et al., 2001, Jacobson et al., 2005, Jensen et al., 2006; Biksiet al., 2007; Hands et al., 2010).

Dependendo da técnica de detecção utilizada, quanto à sensibilidade e especificidades dos testes, os resultados são variáveis. Em um trabalho de Moller et al. (1998), *L. intracellularis* foi detectado em 75% dos rebanhos com diarreia. Em um trabalho executado por Dors et al.,

(2015) foi encontrada prevalência dentro das granjas positivas prevalência de 51,5%. Em alguns trabalhos tem sido detectada a presença conjunta com *B. hyodysenteriae* como relatado no trabalho de Stege et al., (2000) que detectou em (93,7%) infecção única e juntamente com *B. hyodysenteriae* uma porcentagem entre 25 e 30% nos rebanhos.

Na polônia foi detectado em 62,1% dos animais (Pejsak et al., 2007), Ungria 93,55% dos rebanhos (Biksi et al., 2007), Alemanha entre 33,7% e 48,4% (Wendt et al., 2004; Reiner et al., 2011), 16% no Reino Unido (Thomson et al., 2001), Itália 44,6% (Meriardi et al., 2003), Rússia 86,5% (Kukushkin & Okovytaya, 2012), República Tcheca 31,8% (Cizek et al., 2006) 88% na França e 89,7% na Espanha (Chouet et al., 2003). Na Coreia do Sul foi detectada em 46,5% (Suh & Song 2005), na China por volta de 77% (Wu et al., 2014) e no Japão, 94% (McOrist, 2005).

Na Austrália, todos os rebanhos foram positivos para anticorpos anti-*L. intracellularis*, com 84,2% de positividade em animais em fases de engorda (Holyoake et al., 2010). McOrist et al., (2003) estimou uma prevalência de 96% nos EUA por sorologia. Ainda nesse país, 48,9% multiplicadoras e granjas com recria e terminação apresentaram 66,9% de soropositividade (Bronsvort et al., 2001) estima-se que *L. intracellularis* esteja presente em mais de 90% das fazendas suínas (Armbruster et al., 2007).

No Brasil, a doença, na forma hemorrágica, foi diagnosticada no país pela primeira vez em um rebanho em 1983 (Barcellos, 2000). Posteriormente, foram feitos trabalhos avaliando a prevalência da *L. intracellularis* no rebanho. Utilizando a técnica de PCR, a prevalência foi estimada em 30%, com 37% em São Paulo, 35% em Santa Catarina, 20% no Paraná, 16% em Minas Gerais, 40% em Goiás, 40% em Mato Grosso do Sul e 25% no Rio Grande do Sul. Em outras regiões, como o Distrito Federal, Pernambuco, Ceará e Rio de Janeiro, não foram encontradas amostras positivas (Moreno et al., 2002).

Em um estudo mais recente realizado em Minas Gerais, 100% dos rebanhos avaliados foram positivos pela técnica Imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) (Resende, 2015). Viott et al. (2013) encontraram, em um estudo de prevalência no Brasil, em 19% dos animais totalizando 50% das granjas positivas para este agente isoladamente ou em associação.

## 7.8 DIAGNÓSTICO

A dificuldade em cultivar rotineiramente *L. intracellularis* levou ao desenvolvimento de métodos alternativos para o diagnóstico da enteropatia proliferativa. Em geral o diagnóstico preconizado é feito clinicamente, por sorologia e PCR (Guedes et al., 2002c; Chouet et al., 2003) e, posteriormente em caso de óbito é associado às alterações “*post mortem*” como histopatologia e execução de exames complementares como PCR, imuno-histoquímica e hibridização fluorescente *in situ* (Boye et al., 1998; Guedes et al., 2002c; Guedes & Gebhart, 2003a).

A sorologia é uma ferramenta importante na compreensão da infecção e cinética nos rebanhos. Além disso, a utilização de soroperfil na granja auxiliam nas estratégias de vacinação e medicação em granjas acometidas por essa enfermidade. O período ideal para vacinação é após a queda dos anticorpos maternos (Walter et al., 2004).

A respeito de testes sorológicos, teste de imunofluorescência e imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) é considerado altamente eficiente exibindo resultados com alta especificidade e sensibilidade (89% e 100%, respectivamente), o que dispensa o uso do microscópio de fluorescência (Guedes et al., 2002b). Outro método utilizado em menor escala é o ELISA de bloqueio (Hammer 2003, Boesen et al., 2005; Keller et al., 2005; Lee, 2006; Frazer et al., 2008).

Uma técnica recentemente padronizada é a sorologia através do fluido oral e mostrou sensibilidade na técnica de IPMC para detecção de IgG no soro de 100% e 84,62% e 88,46% para IgA e IgG respectivamente com especificidade de 100% para todos, além de obter concordância entre os resultados do soro funciona como uma alternativa eficiente e que traz melhor bem-estar por ser menos invasivo (Gabardo, 2015).

Em estudos de inoculação experimental em suínos com inóculo padrão de  $10^8$  bactérias, microrganismos intracelulares, as bactérias podem ser visualizadas no intestino e fezes 1-3 semanas após a inoculação com um pico de infecção e lesões três semanas posterior ao desafio. Na maioria dos suínos, a infecção, lesões proliferativas e eliminação nas fezes persistem por

aproximadamente quatro semanas, mas em alguns suínos expostos, a excreção pode persistir durante pelo menos 10 semanas (Smith & McOrist 1997; Guedes et al., 2002a). Através da técnica de PCR é possível monitorar a eliminação do agente nas fezes a partir de 4 semanas após o desmame (Müller et al., 1998; Stege et al., 2004).

A alta correlação entre detecção da *L. intracellularis* e o escore fecal sugere que o PCR fornece uma indicação da presença do agente no rebanho (Collins & Barchia, 2014), dessa forma é considerada uma boa ferramenta de monitoria do rebanho (Guedes et al., 2002c; Paradis et al., 2012). Um fator limitante é a baixa sensibilidade da técnica. A explicação para limitação da técnica está ligada a presença de inibidores de PCR nas fezes (Guedes et al., 2002c).

Em relação às técnicas “post mortem”, a histopatologia de rotina corada por hematoxilina e eosina permite a identificação de lesões e a presença de bactérias intracelulares no citoplasma dos enterócitos proliferativos pode ser demonstrada por coloração pela prata Warthin-Starry, no entanto não é considerada uma técnica específica (Jensen et al., 1997).

A identificação específica das lesões de *L. intracellularis* é melhor determinada através da imuno-histoquímica de tecidos fixados (Guedes & Gebhart 2003a; Ladinig et al., 2009) A bactéria também pode ser identificada em esfregaços ligados à anticorpos monoclonais, especialmente em casos que há grande quantidade de bactéria nas fezes (McOrist et al., 1987; Guedes & Gebhart, 2003a).

## 7.9 RESPOSTA IMUNE

Em relação à resposta imune na infecção por *L. intracellularis*, a infiltração de células inflamatórias é limitada durante o desenvolvimento de lesões proliferativas, sugerindo a presença de um mecanismo imunossupressor induzido pela *L. intracellularis* (Lawson & Gebhart, 2000; Boutrup et al., 2010). Em outro trabalho observaram a redução no número de células T e B em suínos infectados (MacIntyre et al., 2003). Estudos de expressão gênica “*in vivo*” têm mostrado consistente inativação de genes relacionados à resposta imune, incluindo os que atuam contra agentes patogênicos intracelulares, confirmando o caráter imunossupressor da infecção (Jacobson et al., 2011; Vannucci et al., 2013c), favorecendo a persistência da infecção bacteriana (Bearson et al., 1997).

Em relação à resposta por macrófagos, eles estão presentes nas fases de desenvolvimento de lesões induzindo uma resposta imune celular típico do tipo Th1 na lâmina própria, induzindo um aumento da resposta celular e produção de IFN- $\gamma$  (McOrist et al., 1992; MacIntyre et al., 2003). A apresentação e reconhecimento dos antígenos de *L. intracellularis* ocorrem via MHC de classe I, sendo apresentado a células T citotóxicas localizadas na lâmina própria (Vannucci et al., 2013c).

Em relação aos anticorpos produzidos, a primeira imunoglobulina IgM responde precocemente durante doença clínica, posteriormente os títulos de IgG aumentam por volta de 2 semanas após o desafio, atingindo um pico na terceira semana (Lawson et al., 1988; Knittel et al., 1998; Guedes et al., 2002a; Hands et al., 2010). Células epiteliais afetadas contêm um grande acúmulo intracelular de IgA (Lawson et al., 1979; McOrist et al., 1992), e lavagens intestinais contêm um alto nível de Lawsonia-IgA específica (Guedes et al., 2002a). É observada produção de IgA aos 22 dias pós inoculação (Guedes & Gebhart, 2010).

Apesar disso, os animais que recuperam da doença clínica possuem títulos de IgG detectáveis e estão protegidos da recolonização e doença clínica (Collins & Love 2007). A resposta imune é detectada duas semanas após a exposição (Guedes & Gebhart 2003a; Riber et al., 2015) sendo detectável por até 13 semanas após a exposição. Um trabalho feito por McOrist et al. (1992) demonstrou uma infiltração de células T citotóxicas, macrófagos, e linfócitos B, sendo a resposta celular na EPS a mais importante.

Em relação à resposta celular ligada à interferon gama é a mais frequente devido a natureza da bactéria colonizar o meio intracelular (Lawson et al., 1993). A resposta específica do antígeno é provavelmente mediada através da apresentação do MHC de classe I ao T citotóxico CD8 + (Riber et al., 2015). Em um trabalho que avalia os mecanismos que desencadeiam a produção de IFN- $\gamma$ , observaram que produção de IFN- $\gamma$  específico é mediada por células T

efetoras CD8 + e CD4 + associada à interleucinas como principais contribuintes para a produção de antígeno-específica IFN- $\gamma$  (Riber et al., 2015).

## 7.10 TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA

Diversas abordagens de tratamento são possíveis dependendo da idade dos animais envolvidos. Para a enteropatia aguda, é necessário tratamento mais intensivo nos animais afetados e os que entraram em contato com os animais doentes. A administração de antimicrobianos deve ser programada e embasada em dados fornecidos pelo soroperfil da granja (Resende, 2014).

Os fármacos geralmente utilizados são tiamulina, tilosina, tetraciclina (McOrist et al., 1999; Kyriakis et al., 2002; Collins, 2012a, b) administrados oral ou via intramuscular (McOrist et al., 1999). Outros fármacos também utilizados são penicilina, fluoroquinolonas e oxitetraciclina (Sobestiansky et al., 1998; Radostitis et al., 2002 & Kroll et al., 2005; Larsen et al., 2016).

A eficácia de cada via de administração varia com o quadro clínico apresentado. A forma injetável possui vantagem sobre a medicação na ração devido a melhor absorção com a dose necessária para obter bons resultados, sobretudo pelo fato de que os animais doentes consomem menos ração (Apley et al., 2012; Karriker et al., 2012).

Além da medicação, uma ferramenta eficiente para controle é a vacinação. Em um estudo de caso, Bak & Rathkjen (2009), mostrou que a vacina foi responsável por diminuir o uso de oxitetraciclina em 79%. A vacina comercial disponível no mercado (Enterisol®, Boehringer Ingelheim) é composta pela cepa de *L. intracellularis* viva atenuada. Em um trabalho, foram obtidos níveis significativos de resposta protetora contra o subsequente desafio com *L. intracellularis* (Kroll et al., 2004) sendo observado um aumento nos títulos de IgG e produção de IFN- $\gamma$  (Riber et al., 2015).

A vacina deve ser administrada quando os títulos de anticorpos maternos estão ausentes no rebanho e a possibilidade de infecção natural nula, por volta de 3 a 4 semanas de idade de modo que não ocorra neutralização do antígeno e garanta que ocorra soroconversão e promova boa resposta frente ao patógeno (Walter et al., 2004). A administração oral induz de forma confiável a imunidade podendo ser administrada intramuscular (Hardge et al., 2004; McOrist & Smits, 2007). Todos os animais vacinados apresentam níveis séricos aumentados de anticorpos específicos e concentrações aos 17 dias após vacinação (Nogueira et al., 2015). Guedes & Gebhart (2003b) detectaram IgG sérica específica de 5 a 13 semanas e resposta específica de IFN entre 4 e 13 semanas após a vacinação oral. A soroconversão em outro trabalho ocorreu 2 semanas após o desafio (Kroll et al., 2004).

A vacinação contra *L. intracellularis* é usada também como nova ferramenta para auxiliar no controle de Salmonella em fazendas suínas, uma vez que foi observada uma diminuição na eliminação de *Salmonella* sp. em animais vacinados para *L. intracellularis* (Leite et al., 2017).

Um trabalho relacionado à proteômica revelou a presença de duas proteínas, (LI0841 e LI0902) com caráter antigênico, sendo um potencial alvo no desenvolvimento de vacinas, no entanto são necessários mais estudos para comprovar essa hipótese (Watson et al., 2014).

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microbiota exerce importantes funções que auxiliam o hospedeiro. Firmicutes e Bacteroidetes são os filos mais prevalentes na microbiota intestinal em suínos, podendo ser modificada pela dieta, estado de saúde do hospedeiro, uso de promotores de crescimento, antimicrobianos e aditivos. As ferramentas de sequenciamento de nova geração auxiliaram de forma significativa nos estudos relacionados à microbiota, uma vez que permitiu a identificação de microrganismos não cultiváveis. A DS e a EPS são doenças de caráter distinto, no entanto elas podem acontecer simultaneamente. Acredita-se que o perfil da microbiota possa influenciar no estabelecimento das duas enfermidades. A DS é uma enfermidade importante na produção de suínos. Sabe-se que na patogênese desta doença, fatores de virulência e resposta imune são ferramentas importantes para a colonização e para o desencadeamento da doença. Porém, essas condições ainda não foram totalmente elucidadas. São conhecidos o caráter multifatorial e a



relação da microbiota no estabelecimento da *B. hyodysenteriae* no intestino grosso, porém não existem muitos trabalhos que avaliem esta relação de forma conclusiva.

A EPS é também uma importante enfermidade, no entanto ela ainda não foi completamente elucidada. Esse fato se dá devido ao laborioso cultivo da bactéria, o que acaba sendo um fator limitante para o seu desenvolvimento científico. A infecção primária pela *L. intracellularis* pode ser um “abridor de portas” para patógenos entéricos ou mesmo potencializar a manifestação de enfermidades intestinais. Entretanto, essa interação com outros patógenos intestinais é pobremente conhecida.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHACHA, M., MESSIER, S., MITTAL, K.R., (1996). Development of an experimental model allowing discrimination between virulent and avirulent isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Can. J. Vet. Res.* 60, 45–49.
- ACHTMAN, M. & WAGNER, M., (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(6), 431-440.
- ALBASSAM, M. A., OLANDER, H. J., THACKER, H. L., (1985). Ultrastructural characterization of colonic lesions in pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*. *Can. J. Comp. Med.* 49, 384–390.
- ALAM, M., MIDTVEDT, T., URIBE, A. (1994). Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 29(5), 445-451.
- ALEXANDER, T.J. & TAYLOR, D.J., (1969) The clinical signs, diagnosis and control of swine dysentery. *Vet. Rec.* 85, 59–63.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A., MARTÍNEZ-LOBO, F.J., ARGUELLO, H., et al., (2013) Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 10, p.1927-1947.
- APLEY, M. D., BUSH, E. J., MORRISON, R. B (2012). Use estimates of in-feed antimicrobials in Swine production in the United States. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 272-279
- ARGENZIO, R. A., (1981). Glucose-stimulated fluid absorption in the pig small intestine: An approach to oral fluid therapy in swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.* 41:2000–2006.
- ARGENZIO, R. A., WHIPP, S. C., GLOCK, R. D., (1980) Pathophysiology of swine dysentery: Colonic transport and permeability studies. *J. Infect. Dis.*, v. 142, p. 676-684.
- ARMBRUSTER, G. A., DEEN, J., GEBHART, C. J., PELGER, G. A (2007). Review of *Lawsonia intracellularis* seroprevalence screening in the United States, June 2003 to July 2006. In: *38th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, pp. 231–233
- ARMITAGE, J. P. (1992). Behavioral responses in bacteria. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 683-714.
- ARNOLD JW, NIESEL DW, ANNABLE CR et al., (1993). Tumor necrosis factor alpha mediates the early pathology in Salmonella infection of the gastrointestinal tract. *Microb. Pathog.* 14:217–27.
- ATYEO, R. F., OXBERRY, S. L., COMBS, B. G. et al. (1998) Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, p. 126-130.
- ATYEO, R. F., STANTON, T. B., JENSEN, N. S., (1999) et al. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*Nox*) sequence comparisons and *Nox*-based polymerase chain reaction tests. *Vet. Microbiol.*, v. 67, p. 47-60.
- BACKHED, F., LEY, R. E., SONNENBURG, J. L. et al., (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920.
- BAK, H. & RATHKJEN P.H. (2009). Reduced use of antimicrobials after vaccination of pigs against porcine proliferative enteropathy in a Danish SPF herd. *Acta Vet. Scandinavica.*, 51(1)
- BANE, D. P., NEUMANN, E.; GEBHART, C. et al., (2001) Porcine proliferative enteropathy: a case control study in swine herds in the United States. *J. Swine Health Prod.*, v.4, p.155-158.
- BARCELLOS, D. E. S. N. (2000) Infecção por *Brachyspira* spp. em suínos: epidemiologia e caracterização fenotípica e genotípica das espécies. 2000. 163f. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes”, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- BARCELLOS, D. E. S. N. D., MATHIESEN, M., DUHAMEL, G. (2002). Survival of pathogenic intestinal spirochetes kept in pure cultures and in pig feces held at four different temperatures. *Act. Sci. Vet.*, Porto Alegre, RS. 30, n. 3 (2002), p. 151-157.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; UZEDA, M. de; MATHIESEN, M.R.; et al., (2000a) Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet. Rec.*, 146,.398-403, 2000
- BARCELLOS, D. E. S. N., M. DE UZEDA, N. IKUTA, V. R., (2000b). Identification of porcine intestinal spirochetes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. *Vet. Microbiol.* 75:189-198.
- BARRETT, S. P. (1997) Human intestinal spirochaetosis. In: D. J. HAMPSON AND T. B. STANTON (Eds.) *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. CAB International. New York, NY. 243–265
- BARTH, S., GÖMMEL, M., BALJER, G., et al., (2012). Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. *Vet. Mic.* 155, 438–443.
- BEARSON S, BEARSON B, FOSTER JW. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;147(2):173–180.
- BELLEGARD, M., HAMPSON, D. J., AND LA, T. (2015). Genes and Proteins of *Brachyspira hyodysenteriae* and Uses Thereof. Patent US8992938. Washington, DC: US Patent and Trademark Office.
- BELLEGARD, M. I., WANCHANTHUEK, P., LA, T. et al., (2009). Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. *PLoS One*, 4(3), e4641.
- BENGTSSON, R. J., MACINTYRE, N., GUTHRIE, J., et al. (2015). *Lawsonia intracellularis* infection of intestinal crypt cells is associated with specific depletion of secreted MUC2 in goblet cells. *Vet. Immunol Immunopathol.*, 168(1-2), 61-67.
- BERG, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends. Microbiol.*, 4(11), 430-435.
- BIESTER H.E, SCHWARTE L.H. (1931) Intestinal Adenoma in Swine. *Am. J. Pathol.* 7: 175–185.176.
- BIK, E. M. (2009). Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr. Rev.* 67(suppl 2), S164-S171.
- BIKSI I, LŐRINCZ M, MOLNÁR B, et al., (2007). Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. *Act. Vet. Hungarica.*, 55(2):219-227
- BIZZINI, A., GREUB, G., (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight massspectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1614-1619.
- BLACK M, MOOLHUIJZEN P, BARRERO R, et al., (2015) Analysis of multiple *Brachyspira hyodysenteriae* genomes confirms that the species is relatively conserved but has potentially important strain variation. *PLoS ONE* 10(6):e0131050.
- BLAKEMORE, W. F., AND D. J. TAYLOR. (1970). An agent possibly associated with swine dysentery. *Vet. Rec.* 87(2):59-6
- BOISMENU, R. & HAVRAN, W. L. (1994). Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial <sup>a</sup> T cells. *Science* 266, 1253–1255.
- BONECA, I. G. (2005). The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8(1), 46-53.
- BOUTRUP, T.S.; BOESEN, H.T.; BOYE, M.; et al. (2010) Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Comp. Pathol.*, 143, n.2–3, p.101–109.
- BOREWICZ, K. A., KIM, H. B., SINGER, R. S. et al., (2015). Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PloS one*, 10(10), e0139106.
- BORGSTRÖM, A., SCHERRER, S., KIRCHGÄSSNER, C., et al., ( 2017). A novel multiplex qPCR targeting 23S rDNA for diagnosis of swine dysentery and porcine intestinal spirochaetosis. *BMC Vet. Res.* 13, 1–8. doi:10.1186/s12917-016-0939-6

BORRIELLO S. P. (1986) Microbial flora of the gastrointestinal tract. MJ Hill (Ed.), Microbial metabolism in the digestive tract, CRC Press, Boca Raton, 2–16.

BOYDEN, D. A., ALBERT, F. G., AND ROBINSON, C. S., (1989). Cloning and characterization of *Treponema hyodysenteriae* antigens and protection in a CF-1 mouse model by immunization with a cloned endoflagellar antigen. *Infect.Immun.* 57, 3808–3815.

BOYE M, BALODA SB, LESER TD, MØLLER. (2001). Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet Microbiol* 81:33–40.

BOYE, M., JENSEN, T. K., MØLLER, K., et al.,. (1998). Specific detection of the genus *Serpulina*, *Serpulina hyodysenteriae* and *Serpulina pilosicoli* in porcine intestines by rRNA in situ hybridisation. *Mol Cell Probes* 12, 323–330.

BOWRA, B.J., AND M.J. DILWORTH.,(1981). Motility and chemotaxis towards sugars in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 126: 231-235

BRADY, S. F., (2007). Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. *Nat Protoc*, 2(5), 1297-1305.

BRIGHENTI, F., CASTELLANI, G., BENINI, L. et al., (1995). Effect of neutralized and native vinegar on blood glucose and acetate responses to a mixed meal in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* , 49(4), 242-247.

BRONSVOORT M, NORBY B, BANE D AND GARDNER I (2001). Management factors associated with seropositivity to *Lawsonia intracellularis* in US swine herds. *J SWINE HEALTH PROD*9: 285–290.

BURROUGH, E. R., ARRUDA, B. L., PLUMMER, P. J., (2017). Comparison of the Luminal and Mucosa-Associated Microbiota in the Colon of Pigs with and without Swine Dysentery. *Front. Vet. Sci.* , 4, 139.

BURROUGH, E., TERHORST, S., SAHIN, O., et al.,. (2013) Prevalence of *Campylobacter spp.* relative to other enteric pathogens in grow-finish pigs with diarrhea. *Anaerobe* 22: 111–114.

BUTLER, J. E., SUN, J., WEBER, P. et al., (2000). Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunol.*, 100(1), 119-130.

CALDERARO, A., PICCOLO, G., MONTECCHINI, S., (2013). MALDI-TOF MS analysis of human and animal *Brachyspira* species and benefits of database extension. *J Proteomics* 78: 273-280.

CAMMAROTA, G., IANIRO, G., GASBARRINI, A. (2014). Fecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *J Clin Gastroenterol*, 48(8), 693-702

CANALE-PAROLA, E., HOLT, S. C., UDRIS, Z. (1967), Isolation of free-living, anaerobic spirochetes, *Arch Microbiol.*, 59 (1), pp. 41-48.

CANIBE, N., HØJBERG, O., HØJSGAARD, S., et al., (2005). Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 83(6), 1287-1302.

CARVAJAL, A., ARRIBA, M. L. D., RODRIGUEZ, H., et al., (2006). Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. *Vet. Rec.* 158, 700–701.

CASAS, V., RODRÍGUEZ-ASIAIN, A., PINTO-LLORENTE, R., et al. (2017). *Brachyspira hyodysenteriae* and proteins recognized by sera of challenged pigs. *Front. Microbiol.*, 8, 723.

CASAS, V., VADILLO, S., SAN JUAN, C., et al., (2016). The exposed proteomes of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. *Front. Microbiol.*, 7, 1103.

CEBRA, J. J., PERIWAL, S. B., LEE, G. et al., (1998). Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *J. Immunol Res.*, 6(1-2), 13-18.

CHANDER, Y., PRIMUS, A., OLIVEIRA, S., et al. (2012) Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated " *Brachyspira hamptonii* ". *J. VET. Diagn. Invest.* 24, 5, 903–910.

CHIA, S. P. (1977 ). M.V.M. thesis, University of Glasgow.

CHIA, S. P., TAYLOR D.J., (1978) Factors affecting the survival of *Treponema hyodysenteriae* in dysenteric pig faeces. *Vet Rec*;103(4):68–70

CHOUET, S., PRIETO, C., MIELI, L., et al., (2003). Patterns of exposure to *Lawsonia intracellularis* infection on European pig farms. *Vet. Rec.* 152, 14–17

CLOTHIER, K.A., KINYON, J.M. FRANA, T. S. et al., (2011). Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. *J. Vet. Diag. Invest.* 23, 6, 1140–1145, 2011.

COHEN, I.T., NELSON, S.D., MOXLEY, R.A., et al., (1991). Necrotizing enterocolitis in a neonatal piglet model. *J Pediatr Surg*, 26(5), 598-601.

COLLINS, A., (2012a). Duration of *Lawsonia intracellularis* shedding after oxytetracycline treatment following an outbreak of proliferative enteropathy. *22nd International Pig Veterinary Society Congress*, 674.

COLLINS, A.,(2012b). Efficacy of antibiotics to terminate faecal shedding of *Lawsonia intracellularis*. *22nd International Pig Veterinary Society Congress*,

COLLINS, A.M., BARCHIA, I.M., (2014) The critical threshold of *Lawsonia intracellularis* in pig faeces that causes reduced average daily weight gains in experimentally challenged pigs. *Vet. Microbiol.* 168, 455–458.

COLLINS A.M, FELL S, PEARSON H, TORIBIO JA. (2011). Colonisation and shedding of *Lawsonia intracellularis* in experimentally inoculated rodents and in wild rodents on pig farms. *Vet Microbiol*;150:384–388.

COLLINS, A.M., LOVE, R.J., (2007). Re-challenge of pigs following recovery from proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* 120, 381–386 *Pig Veterinary Society Congress*, 675.

COLLINS A, LOVE R.J., POZO J., et al., (2000). Studies on the *ex vivo* survival of *Lawsonia intracellularis*., *J. SwineHealth Prod.* 8: 211–215

COMBS, B.G. & HAMPSON, D.J., (1992). Identification of *Serpulinu hyodysenteriae* using a cloned DNA sequence. *Proceedings Int. Pig Vet. Sot. Congr.*, p. 275

CONLY, J. M., STEIN, K., WOROBEZ, L. et al., (1994). The Contribution of Vitamin K 2 (Menaquinones) Produced by the Intestinal Microflora to Human Nutritional Requirements for Vitamin K. *Am J Gastroenterol.*, 89(6).

COOPER, D.M., GEBHART, C.J. (1998) Comparative aspects of proliferative enteritis. *J. Am.Vet. Med. Ass.*, v.212, p.1446-1451.

COOPER, D.M., SWANSON, D.L., BARNES, S.M (1997). Comparison of the 16S ribosomal DNA sequences from the intracellular agents of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis* *Int J. Syst. Evol. Microbio* .147(3), 635-639.

CORONA-BARRERA E., SMITH D.G.E., MURRAY B., (2004). Efficacy of seven disinfectant sanitisers on field isolates of *Brachyspira pilosicoli*. *Vet. Rec.* 154: 473–474.

CORZO, C.A., FRIENDSHIP, R.M., DEWEY, C.E., et al., (2005). Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in Ontario swine herds. *J. SwineHealth Prod.* 13, 314–317

COSTA, M.O., CHABAN, B.; HARDING, J.C., et al., (2014) Characterization of the fecal microbiota of pigs before and after inoculation with “*Brachyspira hampsonii*”. *PLoS One*, 9(8): e106399.

COSTA, M. O., FERNANDO, C., NOSACH, R., et al., (2017). Infection of porcine colon explants with “*Brachyspira hampsonii*” leads to increased epithelial necrosis and catarrhal exudate. *Path. and dis.*, 75(3).

CUMMINGS, J. H., BEATTY, E. R., KINGMAN, S. M. et al., (1996). Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br. J. Nutr.*, 75(05), 733-747.

CUMMINGS, J. H., & MACFARLANE, G. T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 443-459.

CUMMINGS, J. H., POMARE, E. W., BRANCH, W. J. et al., (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221-1227.

DALE, C.J.H., MOSES, E.J., ONG, C., et al. (1998). Identification and sequencing of the groE operon and flanking genes of *Lawsonia intracellularis*: Use in phylogeny. *Microbiology* 144:2073–2084

DANIEL, A. G.S., SATO, J.P.H., GABARDO, M. P., et al., (2017). Minimum inhibitory concentration of Brazilian *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *Pesqui. Vet. Bras.*, 37(4), 331-338.

DE NOVA, P. J., CARVAJAL, A., PRIETO, M., et al., (2017). *In vitro* susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to a commercial citrus fruit extract. *Research in veterinary science*, 115, 318-324.

DAVIES, M.E.&BINGHAM, R.W. (1985). Spirochaetes in the equine caecum. *Res. Vet. Sci.* 39: 95–98.

DAVIS, A.J., SMITH, S.C., MOORE, R.J., (2005). The *Brachyspira hyodysenteriae* *ftnA* gene: DNA vaccination and real-time PCR quantification of bacteria in a mouse model of disease. *Curr. Microbiol.* 50, 285–291.

DEZORZOVA-TOMANOVA K, SMOLA J, TRCKA I, (2006). Detection of *Lawsonia intracellularis* in wild boar and fallow deer bred in one game enclosure in the Czech Republic. *J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Publ. Health.*, 53(1): 42-44.

DIBNER, J. J.,&RICHARDS, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci.*84(4), 634-643.

DIEGO, R., CK-MENES, P. CARVAJAL, A. (1995). *Serpulina hyodysenteriae* challenge of fattening pigs vaccinated with an adjuvanted bivalent bacterin against swine dysentery. *Vaccine*, 13, 663-667

DORS, A., POMORSKA-MÓL, M., CZYŻEWSKA, E., et al., (2015). 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(4), 825-831.

DOYLE LP (1948). The etiology of swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.* (1948) 9:50–1.

DOWD, S.E., SUN, Y., WOLCOTT, R.D., et al., (2008). Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. *Foodborne Pathog. Dis.*, 5(4), 459-472.

DUBOS, R., SCHAEGLER, R. W., COSTELLO, R. et al., (1965). Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 122(1), 67-76.

DUCLUZEAU. R., (1993). Development, equilibrium and role of microbial flora in the newborn. *Ann Pediatr. Paris* 40: 13-22.

DUGOURD, D.; JACQUES, M.; BIGRAS-POULIN, M.; et al., (1996) Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 by random amplification of polymorphic DNA analysis. *Vet Microbiol.* 48, p.305-314,

DUHAMEL GE, ELDER RO, MUNIAPPA et al., (1997). Colonic spirochetel infections in nonhuman primates that were associated with *Brachyspira aalborgi*, *Serpulina pilosicoli*, and unclassified flagellated bacteria. *Clin. Infect. Dis.*25 (Suppl. 2): S186–S188.

DUHAMEL, G.E.& JOENS, L.A., (1994). Laboratory procedures for the diagnosis of swine dysentery. *Am. Assoc. Lab. Diagn*, Columbia, 94 pp.

DUHAMEL G.E., KINYON J.M., MATHIESEN M.R (1998). *In vitro* activity of four antimicrobial agents against North American isolates of porcine *Serpulina pilosicoli*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10(4):350-356.

DUHAMEL, G.E., MUNIAPPA, N., MATHIESEN, M.R., et al. (1995). Certain canine weakly b-hemolytic intestinal spirochetes are phenotypically and genotypically related to spirochetes associated with human and porcine spirochetosis. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2212–2215.

DUINHOF, T.F., DIERIKX, C.M., KOENE, M.G., et al. (2008) Multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* in a Dutch sow herd. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 133, 604-608.

DURMIC Z., PETHICK D.W., PLUSKE J.R., et al., (1998) Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection. *J. Appl. Micro-biol.* 85:574–582.

EARLEY, H., LENNON, G., BALFE, A., et al. (2015) A preliminary study examining the binding capacity of *Akkermansia muciniphila* and *Desulfovibrio* spp., to colonic mucin in health and ulcerative colitis. *PLoS One* 10:e0135280.

- FAINE S. (1998). *Leptospira*. In: COLLIER L, BALOWS A, SUSSMAN M. (eds.) Microbiology and microbial infections, Vol. 2, Systematic bacteriology. Arnold, London NW1 3BH, U.K. pp. 1287–1303.
- FALK, P.G., HOOPER, L.V., MIDTVEDT, T. et al., (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4), 1157-1170.
- FEARY, D.J., GEBHART, C.J. PUSTERLA, N., 2007. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a foal. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 149, 129–133.
- FELLSTROM, C. et al. Isolation of *Serpulina* species in Swedish pig herds with diarrhoea.(1998) In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 1998, Birmingham. Proceedings Birmingham, V.2, p.59.
- FELLSTROM, C.,&GUNNARSSON. A (1995). Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Res. Vet. Sci.* 59:1–4. FELLSTROM, C., FELLSTROM, C., PETTERSSON, B., THOMSON, J., et al., (1997). Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35, 462–467.
- FELLSTROM C., PETTERSSON B., THOMSON J., et al., (1995): Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 2357–2360.
- FELLSTROM C., ZIMMERMAN U., ASPAN A. et al, (2001).The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Anim. Hlth. Res. Revs.* 2(1):37-43.
- FERNIE, D.S., RIPLEY, P.H., WALKER, P.D., (1983). Swine dysentery: protection against experimental challenge following single dose parenteral immunisation with inactivated *Treponema hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* 35, 217–221.
- 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.
- FOX, G. C. A., STACHEBRANDT, E., HESPELL, R. B. et al., (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science (New York, NY)*, 209(4455), 457.
- FRIEDMAN M, BEDNÁŘ V, KLIMEŠ J, et al. (2008) *Lawsonia intracellularis* in rodents from pig farms with the occurrence of porcine proliferative enteropathy. *Applied Microbiol.* 47: 117 – 121.
- GABARDO, M. DE P., (2015). *Lawsonia intracellularis*: estudo da transmissão interespecies e da utilização do fluido oral na detecção de imunoglobulinas. Universidade federal de Minas Gerais.
- GEBHART CJ, BARNES SM, MCORIST S, et al.(1993) Ileal symbiont *intracellularis*, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int. J. Syst. Bacterio.* 1;43(3):533–538.
- GILLILAND, S.E.&SPECK, M.L. (1977). Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(1), 15-18.
- GLOCK, R. D.&HARRIS, D. L. (1972). Swine dysentery. 11. Characterization of lesions in pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae* in pure and mixed culture. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinical* 67, 65-68.
- GLOCK, R.D., HARRIS, D.L., KLUGE, J.P., (1974). Localization of spirochetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the lesions of swine dysentery. *Infect. Immun.* 9, 167-178.
- GLOCK, R.D., VANDERLOO, K.J., KINYON, J.M., (1975). Survival of certain pathogenic organisms in swine lagoon effluent. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 166, 273–5.
- GOGOLEWSKI RP, COOK RW, BATTERHAM ES. (1991). Suboptimal growth associated with porcine intestinal adenomatosis in pigs in nutritional studies. *Aust Vet J* 68:406–408.
- GUARNER, F. & MALAGELADA, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
- GUEDES, R.M.C., 2010. Controle racional das diarreias de recria e terminação. *Acta Sci. Vet.* 38, 247–256.
- GUEDES, R.M.C. (2008) Infecção por *Lawsonia intracellularis*: um problema recorrente na suinocultura do Brasil. *Acta Sci. Vet.*, v.36, p.77-s80.

- GUEDES, R.M.C. (2004) Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J. Swine. Health Prod.*, v 12.
- GUEDES, R.M.C.& GEBHART, C.J., (2010). Evidence of cell-mediated immune response and specific local mucosal immunoglobulin (Ig) A production against *Lawsonia intracellularis* in experimentally infected swine. *Can. J. Vet. Res.* 74, 97–101.
- GUEDES, R.M.C.& GEBHART, C.J. (2003a) Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* v.15, p.438–446.
- GUEDES, R.M.C.& GEBHART, C.J., (2003b). Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Microbiol.* 91, 135–145.
- GUEDES, R.M., GEBHART, C.J., (2003c). Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet. Microbiol.* 93, 159–166.
- GUEDES RMC, GEBHART CJ, ARMBRUSTER G, et al., (2002a). Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. *Can J Vet Res* 66:258–263.
- GUEDES, R.M.C.; GEBHART, C.J.; DEEN, J. et al. (2002b) Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.14, p.528–530.
- GUEDES, R.M.C., GEBHART, C.J., WINKELMAN, N.A. et al. (2002c) Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can. J. Vet. Res.*, v.66, p.99–107.
- GUEDES, R. M., MACHUCA, M. A., QUIROGA, M. A., et al., (2017). *Lawsonia intracellularis* in Pigs: Progression of Lesions and Involvement of Apoptosis. *Vet. Pathol.* , 54(4), 620-628.
- GUTTMANN P.M., VISCARDI V., LESSA D.A.B. et al., (2014). Equine Proliferative Enteropathy Caused by *Lawsonia intracellularis* in a Foal in Brazil. *J. Equine. Vet. Sci.* 34(5):701–703.
- HÅFSTRÖM, T., JANSSON, D.S., SEGERMAN, B., (2011). Complete genome sequence of *Brachyspira intermedia* reveals unique genomic features in *Brachyspira* species and phage-mediated horizontal gene 27 transfer. *BMC Genomics* 12, 395.
- HALTER, M. R.& JOENS, L. A. (1988). Lipooligosaccharides from *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Infect.Immun.*, 56, 3152-3156.
- HAMADY, M., LOZUPONE, C., KNIGHT, R. (2010) Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J* 4: 17–27
- HAMIR, A.N., TROTT. D., PALMER, M., et al., (2001). Naturally occurring spirochetes in the colonic mucosa of raccoons (*Procyon lotor*). *Vet. Pathol.* 38: 233–236.
- HAMPSON, D.J. *Brachyspira* l colitis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; et al., eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; p.680-696, 2012.
- HAMPSON, D.J., ATYEO, R.F., COMBS, B.G., (1997) Swine dysentery. In: *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. Edited by: HAMPSON, D.J., STANTON, T.B., CAB International, England, 175–209.
- HAMPSON, D. J., COMBS, B. G., HARDERS, S. J., et al.(1991) Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from a wild rat living on a piggery. *Aust. Vet. J.*, 68, 308.
- HAMPSON, D.J.& STANTON, T. B. (1997), Detection, identification and subspecific differentiation of intestinal spirochaetes. In: *Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans*, CAB International, New York, pp. 323-341
- HAMPSON, D.J. & TROTT, D.J. (1995) A review – Intestinal spirochetal infections of pigs: an overview with an Australian perspective. In: *Manipulating Pig Production* Werribee: Australian Pig Science Association. Edited by: HENESSY, D.P. e CRANWELL, P.D.V. 139-169.
- HAMPSON, D. J., LA, T., PHILLIPS, N. D. (2015). Emergence of *Brachyspira* species and strains: reinforcing the need for surveillance. *Porcine. Health. Manag.* , 1, 8-8.

HAMPSON, D.J., LA, T., PHILLIPS, N.D. et al. (2016). *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from apparently healthy pig herds following an evaluation of a prototype commercial serological ELISA. *Vet. Microbiol.* 191, 15–9.

HAMPSON, D.J., ROBERTSON, I.D., MHOMA, J.R.L., (1993). Experiences with a vaccine being developed for the control of swine dysentery. *Aust. Vet. J.* 70, 18–20.

HANNIGAN J. (1997) Identification and preliminary characterization of *Lawsonia intracellularis* cytolytic activity. M.Sc. Thesis. Edinburgh: University of Edinburgh.

HANDS, I., MCRIST, S., BLUNT, R., et al., (2010) Current 830 A. *Dors et al.* PM infection patterns of porcine proliferative enteropathy in Great Britain and the Republic of Ireland. *Vet Rec* 167: 343-344

HANSEN, C.F., HERNANDEZ, A., MANSFIELD, J., et al. (2011) A high dietary concentration of inulin is necessary to reduce the incidence of swine dysentery in pigs experimentally challenged with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Br. J. Nutr.* 106(10):1506–13.

HANSEN, C. F., PHILLIPS, N. D., LA, T., et al., (2010). Diets containing inulin but not lupins help to prevent swine dysentery in experimentally challenged pigs 1. *J. Anim. Sci.* , 88(10), 3327-3336.

HAREL, J., BÉLANGER, M., FORGET, C., et al. (1994) 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.

HEINONEN, M. et al. (1998) Prevalence of *Serpulina* species in herds rearing health class (LSO 2000) feeder pigs. In:International Pig Veterinary Societycongress, 1998, Birmingham. Proceedings...Birmingham, 1998. V.2, p.57.

HELGELAND, L., VAAGE, J. T., ROLSTAD, et al., (1996). Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V $\beta$  repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunol.*, 89(4), 494-501.

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, LA T, et al., (2010) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of the swine dysentery pathogen, *Brachyspira hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol* 48:2859–2865.

HIDALGO, A., CARVAJAL, A., VESTER, B. et al., Trends towards Lower Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Acquired Resistance among Clinical Isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55, 7, 3330– 3337, 2011.

HILL, M. J. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 6(2), S43-S45.

HILLEN, S., WILLEMS, H., HERBST, W., (2014). Mutations in the 50S ribosomal subunit of *Brachyspira hyodysenteriae* associated with altered minimum inhibitory concentrations of pleuromutilins. *Vet. Microbiol.* 172(1–2): 223–229.

HOLLAND, R.E. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev* 3(4), 345-375.

HOLYOAKE, P., HJULSAGER, C.K., LARSEN, L.E et al., (2010). A preliminary study of the effects of treating diarrhoeic pigs with oxytetracycline on shedding of Porcine Circovirus Type 2 and *Lawsonia intracellularis*. 21st International Pig Veterinary Society Congress, 464.

HOOPER, L. V., WONG, M. H., THELIN, A., et al., (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505), 881-884.

HONTECILLAS, R., BASSAGANYA-RIERA, J., WILSON, J., et al. (2005). CD4+ T-cell responses and distribution at the colonic mucosa during *Brachyspira hyodysenteriae*-induced colitis in pigs. *Immunology*, 115(1), 127-135.

HOVIND-HOUGEN, K., BIRCH-ANDERSEN, A., HENRIK-NIELSEN, R., et al., (1982). Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol* 16(6): 1127-1136.

HUDSON, M.J., ALEXANDER, T.J., LYSONS, R.J., (1976). Diagnosis of swine dysentery: spirochaetes which may be confused with *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.* 99, 498–500.

HUGHES R, OLANDER, H.J., WILLIAMS, C.B. (1975). Swine dysentery: Pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. *American Journal of Veterinary Research* 36: 971–977.



HUGENHOLTZ, P. & TYSON, G. W. (2008). Microbiology:metagenomics. *Nature*, 455(7212), 481.

HWANG, J.M., SEO, M.J., YEH, J.Y. (2017). *Lawsonia intracellularis* in the feces of wild rodents and stray cats captured around equine farms. *BMC Vet. Res.* 13(1), 233.

HYATT, D. R., TER HUURNE, A. A., ZEIJST, B. A. V. D. et al. (1994). Hemolysin-negative mutants in pigs and their reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect. and Immun.*, 62, 2244-2248.

ISAACSON, R., BOREWICZ, K., KIM, H.B., et al., (2011). *Lawsonia intracellularis* increases *Salmonella enterica* levels in the intestines of pigs. In *Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, Illinois, abstract* (Vol. 107).

ISAACSON, R. E., FIRKINS, L. D., WEIGEL, R. M. et al., (1999). Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella typhimurium* among experimentally infected pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 60(9), 1155-1158.

ISAACSON, R.E. & KIM, H. B. (2012). The intestinal microbiome of the pig. *Anim Health Res Rev.*, 13(01), 100-109.

ISHIGAMI, M., NISHIMURA, H., YOSHIOKA, K., et al. (1999). The role of intrahepatic <sup>a</sup>-T cells for liver injury induced by *Salmonella* infection in mouse. *Microbiol Immunol* 43, 461-469.

JACOBSON, M., ANDERSSON, M., LINDBERG, R., FOSSUM, C., et al., (2011). Microarray and cytokine analyses of field cases of pigs with diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 153, 307-314.

JACOBSON, M.; FELLSTROM, C.; LINDBERG, R. et al., (2004) Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J. Med. Microbiol.*, 53, 273-280.

JACOBSON, M., GERTH LÖFSTEDT, M., HOLMGREN, N et al., (2005). The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. *J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal.* 52, 386-391.

JACOBSON, M., SEGERSTAD, C. H., GUNNARSSON, A., et al., (2003). Diarrhoea in the growing pig—a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res Vet Sci.* , 74(2), 163-169.

JANCZYK, P., PIEPER, R., SMIDT, H. et al., (2007). Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 61(1), 132-140.

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

JANSSON, D.S., JOHANSSON, K.E., OLOFSSON, T., et al., (2004). *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly beta-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Med. Microbiol.* 53, 293-300.

JENKINS, E.M., MOHAMMAD, A., KLESZIUS, P.H., (1982). Evaluation of cell mediated immune response to *Treponema hyodysenteriae*. In 6th Proc Congr Int Pig Vet Soc, p. 41.

JENSEN, B.B., & JØRGENSEN. H. (1994). Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1897-1904.

JENSEN, N.S., & STANTON, T.B. (1993). Production of a hydrogen peroxide-inducible catalase activity by *Serpulina hyodysenteriae*. In: Ann. Mtg. ASM 93rd. Atlanta, GA. Abstract D-175:126.

JENSEN, T.K., MOLLER, K., LESER, T.D (1997). Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy. *Eur. J. Vet. Pathol.* 3, 115.

JENSEN, T.K., MØLLER, K., BOYE, M., et al., (2000). Scanning electron microscopy and fluorescent in situ hybridization of experimental *Brachyspira* (*Serpulina pilosicoli*) infection in growing pigs. *Vet. Path.* 37: 22-32.

JENSEN, N.S., STANTON, T.B., SWAYNE, D.E., (1996). Identification of the swine pathogen *Serpulina hyodysenteriae* in rheas (*Rhea americana*). *Vet. Microbiol.* 52, 259-269.

- JENSEN, T.K., VIGRE, H., SVENSMARK, B., et al. (2006). Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Comp. Pathol.*, 135(4), 176-182.
- JOENS, L.A. & KINYON, J.M., (1982). Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *J Clin Microbiol* 15, 994-997.
- JOENS, L.A., GLOCK, R.D., WHIPP, S.C. et al., (1981). Location of *Treponema hyodysenteriae* and synergistic anaerobic bacteria in colonic lesions of gnotobiotic pigs. *Vet. Microbiol.*6(1), 69-77.
- JOENS, L.A., HARRIS, D.L., BAUM, D.H. (1979). Immunity to Swine dysentery in recovered pigs. *Am. J. Vet. Res.* 40, 1352-1354.
- JOENS, L.A., NORD, N.A., KINYON, J.M., et al. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Treponema hyodysenteriae* antigens. *J. Clin. Microbiol* 15, 249-252.
- JOENS GF, WARD GE, MURTAUGH MP, (1993) Relationship between ileal symbiont *intracellularis* and porcine proliferative enteritis. *Infection and Immunity*, 61, 5237e5244.
- JOENS, L.A., WHIPP, S.C., GLOCK, R.D., et al. (1983). Serotype-specific protection against *Treponema hyodysenteriae* infection in ligated loops of pigs recovered from swine dysentery. *Infect. Immun.* 39, 460-462.
- JOHANSEN, M., NIELSEN, M., DAHL, J., et al., (2013). Investigation of the association of growth rate in grower-finishing pigs with the quantification of *Lawsonia intracellularis* and porcine circovirus type 2. *Prev. Vet. Med.* 108, 63-72.
- JONASSON R, ESSE N-GUSTAVSSON B, JENSEN-WAERN M. (2007) Blood concentrations of amino acids, glucose and lactate during experimental swine dysentery. *Res Vet Sci.*;82(3):323-331.
- JENSEN, T.K., CHRISTENSEN, A.S. BOYE, M. (2010). *Brachyspira murdochii* colitis in pigs. *Vet. Pathol.*, 47, 334-338.
- KARLSSON, M., ASPÁN, A., LANDÉN, A., et al. (2004) Further characterization of porcine 32 *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *J. Med. Microbiol.* 53, 281-285.
- KARLSSON, N.M., FELLSTROM, C., GUNNARSSON, A., et al., (2003) Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira (Serpulina)* species isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2596-2604.
- KARLSSON M., OXBERRY S.L., HAMPSON D.J. (2002) Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Vet. Microbiol.* 84, 123-133.
- KELLY, D., KING, T., AMINOV, R. (2007). Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat. Res.* 622, 58-69.
- KENNEDY, G. A. & STRAFUSS, A. C. (1976). Scanning electron microscopy of the lesions of swine dysentery. *American Journal of Veterinary Research* 37, 395-401.
- KENWORTHY, R., & CRABB, W. E. (1963). The intestinal flora of young pigs, with reference to early weaning, *Escherichia coli* and scours. *J Comp Pathol Ther.*, 73, 215-228.
- KENNEDY, M. J., ROSEY, E.L., YANCEY JR. R.J. (1997). 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.* 153:119-128.
- KENNEDY, M. J., ROSNICK, D. K., ULRICH, R. G. et al., (1988). Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. *J. Gen. Microbiol.* , 134, 1565-1576.
- KENNEDY, M.J.ER. J. YANCEY, J.R. (1996). Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*. *Vet. Microbiol.* 49:21-30.
- KIM, H.B., BOREWICZ, K., WHITE, B.A., et al., (2012). Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), 15485-15490.
- KIM, H.B., BOREWICZ, K., WHITE, B. A. et al., (2011). Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet. Microbiol.*, 153(1), 124-133.
- KIM, J., NGUYEN, S.G., GUEVARRA, R.B. et al., (2015). Analysis of swine fecal microbiota at various growth stages. *Arch. Microbiol*, 197(6), 753-759.

- KIM, J., WON, G., PARK, S., LEE, J.H. (2017). Identification of *Lawsonia intracellularis* putative hemolysin protein A and characterization of its immunoreactivity. *Vet. Mic.*, 205, 57-61.
- KINYON, J.M., HARRIS, D.L., (1979). *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae* Harris *et al.* *International Journal of Systematic Bacteriology* 29: 102-109.
- KINYON, J.M., HARRIS, D.L., GLOCK, R.D. (1977). Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 15: 638-646.
- KLEIN E, GEBHART, C.J., DUHAMEL G (1999). Fatal outbreaks of proliferative enteritis caused by *Lawsonia intracellularis* in young colony-raised rhesus macaques. *Journal of Medical Primatology* 28: 11-18.
- KNITTEL, J.P., JORDAN, D.M., SCHWARTZ, K.J., et al., (1998). Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-infected pigs. *Am. J. Vet. Res.* 59:722-726.
- KYRIAKIS, S.C., BOURTZI-HATZOPOULOU, E., ALEXOPOULOS, C., et al. (2002). Field evaluation of the effect of in-feed doxycycline for the control of ileitis in weaned piglets. *J. Vet. Med. B.* 49, 317-321.
- KOH, H.W., KIM, M.S., LEE, J.S., et al., (2015). Changes in the Swine Gut Microbiota in Response to Porcine Epidemic Diarrhea Infection. *Microbes Environ.* 30(3), 284.
- KONSTANTINOV, S. R., AWATI, A., SMIDT, H. et al., (2004). Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl Environ Microbiol*, 70(7), 3821-3830.
- KRAAZ, W.B., PETTERSSON, U., THUNBERG, L., et al., (2000). *Brachyspira aalborgi* infection diagnosed by culture and 16S ribosomal DNA sequencing using human colonic biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 38:3555-3560.
- KROLL, J.J., ROOF, M.B., HOFFMAN, L.J., et al., (2005). Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim. Health Res. Rev.*, 6(2), 173-197.
- KROLL, J.J., ROOF, M.B., MCRIST, S., (2004). Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. *Am. J. Vet. Res.* 65, 559-565.
- KRUSE, R., ESSE N-GUSTAVSSON, B., FOSSUM, C. et al. (2008). Blood concentrations of the cytokines IL-1beta, IL-6, IL-10, TNF-alpha and IFN-gamma during experimentally induced swine dysentery. *Acta Vet. Scand.* 50.
- KUBO, M., M. NAKAGAWA, M. KASHIWAZAKI, AND S. KONNO. (1979). Pathological observation on experimental swine dysentery. *Natl. Inst. Anim. Health Quart.* 19:83-90.
- KUKUSHKIN, S. & OKOVYTAYA, T. (2012) Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and PCV2 in commercial pig farms in Russia. *Vet. Rec.*
- KUTASI, J., JAKAB, L., JURKOVICH, V., et al., (2016). The in vitro effect of Garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) extract on *Brachyspira hyodysenteriae*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 63(4), 467-473.
- La, T., Phillips, N.D., Harland, B.L., et al., 2009. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet. Microbiol.*, 138(3-4), 330-338.
- LA, T., PHILLIPS, N.D., HAMPSON, D.J., (2003). Development of a duplex PCR assay for the detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3372-3375
- LA, T., PHILLIPS, N.D., REICHEL, M.P. et al., (2004) Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 102, 97-109.
- LA T, PHILLIPS ND, THOMSON J R et al., (2014) Absence of a set of plasmid-encoded genes is predictive of reduced pathogenic potential in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Res.*;45:131.
- LA, T., PHILLIPS, N.D., WANCHANTHUEK, P., et al., (2011) Evidence that the 36 kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence. *Vet Microbiol.* ;153:150-5.
- LA, T., ROHDE, J., PHILLIPS, N.D., HAMPSON, D.J. (2016) 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. 0362.

- LADINIG, A., SOMMERFELDSTUR, I., WEISSENBOCK, H. (2009) Comparative evaluation of diagnostic methods for *Lawsonia intracellularis* Infection in Pigs, with emphasis on cases lacking characteristic lesions. *J. Comp. Path.*, v. 140, n. 2-3, p. 140-148.
- LAFORTUNE, M., WELLEHA, J.F., JACOBSON, E.R., et al. (2004) Proliferative enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* in a Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *J. Zoo Wildl. Med.*;35(4): 549–552.
- LAMENDELLA, R., SANTO DOMINGO, J.W., GHOSH, S., et al., (2011). Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC microbiol.*, 11(1), 1.
- LARSEN, I., NIELSEN, S.S., OLSEN, J.E., et al., (2016). The efficacy of oxytetracycline treatment at batch, pen and individual level on *Lawsonia intracellularis* infection in nursery pigs in a randomised clinical trial. *Prev. Vet. Med.*, 124, 25-33.
- LAVOIE, J.P., DROLET, R., PARSONS, D. et al., (2000). Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada. *Equine Vet. J.* 32, 418–425.
- LAWSON G.H. & GEBHART C.J. (2000), Proliferative enteropathy. *J. Comp. Pathol.* 122:77–100.
- LAWSON, G.H.K., MACKIE, R.A., SMITH, D.G.E., et al. (1995) Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont *intracellularis* depends on host cell function and actin polymerisation. *Veterinary Microbiology*, 45, 339e350.
- LAWSON, G.H., MCORIST, S., (1993). The enigma of the proliferative enteropathies: A review. *J. Comp. Pathol.* 108, 41–46.
- LAWSON G.H.K., MCORIST S., JASNI S., et al., (1993) Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance “*in vitro*”. *J. Clin. Microb.* 31,1136-1142, 1993.
- LAWSON, G.H.K., MCORIST, S., ROWLAND, A.C., et al., (1988). Serological diagnosis of the porcine proliferative enteropathies: Implications for aetiology and epidemiology. *Vet Rec*122:554–557.
- LAWSON, G.H.K., ROWLAND, A.C., ROBERTS, L., et al., (1979). Proliferative haemorrhagic enteropathy. *Res. Vet. Sci.* 27:46–51.
- LEE, J.I. & HAMPSON, D.J. (1994) Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. *J. Med. Microbiol.*, 40, 365-371.
- LEE, J.I., HAMPSON, D.J., LYMBERG, A.J. et al., (1993) The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups. *Vet. Microbiol.* 34:273–285.
- LEE, S.W., KIM, T.J., PARK, S.Y., et al., (2001) Prevalence of porcine proliferative enteropathy and its control with tylosin in Korea. *J Vet Sci* 2: 209-212.
- LEITE, F., GEBHART, C., SINGER, R., et al., (2017). Vaccination Against *Lawsonia intracellularis* Decreases Shedding of *Salmonella Enterica* Serovar *Typhimurium* in Co-Infected Pigs and Changes the Host Gut Microbiome, in: 12th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork Foz Do Iguaçu - Brazil August 21-24, 2017. 107–111.
- LEMARCHAND, T.X., TULLY, T.N., SHANE, S.M. et al. (1997). *Intracellular Campylobacter*-like organism associated with rectal prolapse and proliferative enteroproctitis in emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.* 34:152-156.
- LEMCKE, R.M., BEW, J., BURROWS, M.R., et al. (1979) The growth of *Treponema hyodysenteriae* and other porcine intestinal spirochetes in a liquid medium. *Res Vet Sci.*, 26, p.315-319.
- LEY, R.E., HAMADY, M., LOZUPONE, C. et al., (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), 1647-1651.
- LEY, R.E., PETERSON, D.A., GORDON, J.I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848.
- LESER, T. D., LINDECRONA, R. H., JENSEN, T. K., et al., (2000). Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl Environ Microbiol.*, 66(8), 3290-3296.

- LESER, T.D., MØLLER, K., JENSEN, T.K. et al. (1997). Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol. Cell Probes* 11, 363–372.
- LI, Z.S., BÉLANGER, M., JACQUES, M., (1991). Serotyping of Canadian isolates of *Treponema hyodysenteriae* and description of two new serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2794–2797.
- LI, J., LI, D., GONG, L. et al., (2006). Effects of live yeast on the performance, nutrient digestibility, gastrointestinal microbiota and concentration of volatile fatty acids in weanling pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 60(4), 277–288.
- LI, Y. Z., WANG, L. H., JOHNSTON, L. J. (2012). Effects of farrowing system on behavior and growth performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci* , 90(3), 1008-1014.
- LIN, C., DEN BAKKER, H.C., SUZUKI, H., et al. (2013) Complete genome sequence of the porcine strain *Brachyspira pilosicoli* P43/6/78(T.). *Genome Announc.*
- LINDEMANN, M.D. (1993). Supplemental folic acid: a requirement for optimizing swine reproduction. *J. Anim. Sci.* 71(1), 239-246.
- LIU, H., IVARSSON, E., DICKSVED, J., et al. (2012), Inclusion of chicory (*Cichorium intybus* L.) in pigs' diets affects the intestinal microenvironment and the gut microbiota, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (12), pp. 4102-4109.
- LIU, S., ZHAO, L., ZHAI, Z. et al., (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection induced the unbalance of gut microbiota in piglets. *Curr Microbiol.*, 71(6), 643-649.
- LOBOVA, D., PRASEK, J., CIZEK, A., et al. (2011). Evaluation of the use of recombinant Bhlp29. 7 in immunoblotting with pig serum as a means to identify herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 53(4), 466-472.
- LOBOVA, D., SMOLA, J., CIZEK, A. (2004) Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J. Med. Microbiol.* 53, 287–291.
- LOOFT, T., ALLEN, H.K., CANTAREL, B.L. et al., (2014). Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J*, 8(8), 1566-1576.
- LOOFT, T., JOHNSON, T. A., ALLEN, H. K. et al., (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1691-1696.
- LUCKEY, T. D. (1972). Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 25(12), 1292-1294.
- LUSSIER, G. 1962. Vibrionic dysentery of swine in Ontario. I. Clinical aspects of pathology. *Can. Vet. J.* 3:228
- LYSONS RJ, BURROWS MR, DEBNEY TG, et al. (1986). Vaccination against swine dysentery—An effective novel method. In 9th *Proc Congr Int Pig Vet Soc*, p. 180.
- MACINTYRE, N., SMITH, D. G. E., SHAW, D. J., et al., (2003). Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Vet. Pathol.*, 40(4), 421–432.
- MAGURRAN, A. E. (2013). *Measuring biological diversity*. John Wiley e Sons.
- MANSON, M. D. 1992. Bacterial motility and chemotaxis. *Adv. Microb. Physiol.* 33: 277-346.
- MAHU, M., BOYEN, F., CANESSA, S., et al., (2017). An avirulent *Brachyspira hyodysenteriae* strain elicits intestinal IgA and slows down spread of swine dysentery. *Vet Res.* 48(1), 59.
- MAPOTHER, M.E., (1993) An estimate of the prevalence of swine dysentery in US swine herds during 1989–1991. National Animal Health Monitoring System Survey. National Veterinary Services Laboratory, US Department of Agriculture, Washington, DC.
- MAPPLEY, L.J., BLACK, M.L., ABUOUN, M., et al., (2012) Comparative genomics of *Brachyspira pilosicoli* strains: genome rearrangements, reductions and correlation of genetic complement with phenotypic diversity. *BMC Genom.* 13:454.
- MARTINEZ-LOBO, F.J., HIDALGO, A., GARCIA, M., et al., (2013). First identification of "*Brachyspira hampsonii*" in wild European waterfowl. *PLoS One* 8(12): e82626.

MATSON, E.G., THOMPSON, M.G., HUMPHREY, S.B., et al., (2005). Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira* hyodysenteriae. *J. Bacteriol.* 187, 5885–5892.

MARTINEZ-LOBO, F.J., HIDALGO, A., GARCIA, M., et al., (2013). First identification of "*Brachyspira hampsonii*" in wild European waterfowl. *PLoS One* 8(12): e82626

MCCLUSKEY J, HANNIGAN J, HARRIS J, et al. (2002). LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection "in vitro" and "in vivo". *Infect. Immun.* 70: 2899–2907.

MCKNITE, A. M., PEREZ-MUNOZ, M. E., LU, L. et al., (2012). Murine gut microbiota is defined by host genetics and modulates variation of metabolic traits. *PloS one*, 7(6), e39191.

MCLAREN A.J., TROTT D.J., SWAYNE D.E., et al., (1997). Genetic and Phenotypic Characterization of Intestinal Spirochetes Colonizing Chickens and Allocation of Known Pathogenic Isolates to Three Distinct Genetic Groups. *J Clin Microbiol*, 35, 2, p. 412–417.

MCORIST S, BARCELLOS D AND WILSON R (2003). Global patterns of porcine proliferative enteropathy. *The Pig Journal* 51: 26–35.

MCORIST S, BOID R, LAWSON GHK, et al., (1987). Monoclonal antibodies to intracellular *Campylobacter*-like organisms of the porcine proliferative enteropathies. *Vet Rec* 121:421–422.

McORIST, S. & GEBHART, C.J. (2012) Proliferative Enteropathy. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; et al., eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; p.680-696.

MCORIST S & LAWSON GH. (1989) Reproduction of proliferative enteritis in gnotobiotic pigs. *Res Vet Sci.*;46(1):27–33.

McORIST, S., GEBHART, C.J., BOID, R. et al. (1995) Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov, sp nov, the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 520-525, 1995.

MCORIST S, JASNI S, MACKIE RA, et al. (1993) Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont *intracellularis*. *Infect. Immun.* 61 (10):4286–4292.

MCORIST, S., MACINTYRE, N., STOKES, C. Ret al., (1992). Immunocytological responses in porcine proliferative enteropathies. *Infect. Immun.* 60, 4184–4191.

MCORIST, S., MACKIE, R.A., NEEF, N., et al. (1994) Synergism of ileal symbiont *intracellularis* and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Rec.* 134, 331–332.

MCORIST S, ROBERTS L., JASNI, S., et al. (1996) Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. *J Comp Pathol.* 1996;115(1):35–45.

MCORIST, S., SHEARN, M.F., MORGAN, J., (1999). Control of Porcine proliferative enteropathy by oral administration of chlortetracycline. *Vet. Rec.* 144, 48–49.

MCORIST, S., SMITS, R.J., (2007). Field evaluation of an oral attenuated *Lawsonia intracellularis* vaccine for porcine proliferative enteropathy (ileitis). *Vet. Rec.* 161, 26–28.

MERIALDI G, BONILAUDI P., GRANELLI F. et al., (2003) Bacterial pathogens in field cases of clinical colitis in growing and finishing pigs in Italy. *Vet Rec.* 153: 529-530.

MEYER R.C., SIMON J., BYERLY C.S. The etiology of swine dysentery. III. The role of selected gram-negative obligate anaerobes. *Vet. Pathol.* 12: 46–54, 1975.

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: 527–534, 1974.

MHOMA, J.R., HAMPSON, D.J., ROBERTSON, I.D., (1992). A serological survey to determine the 364 prevalence of infection with *Treponema hyodysenteriae* in Western Australia. 365 *Aust. Vet. J.* 69, 81-84.

MIKOSZA ASJ, LA T, BROOKE CJ, et al. (1999). Polymerase chain reaction amplification from fixed tissue indicates the frequent involvement of *Brachyspira aalborgi* in human intestinal spirochetosis. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2093–2098.

- MILNER, J. A. & SELLWOOD, R. 1994. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infection and Immunity*, 62, 4095-4099.
- MIYAZAWA, E., IWABUCHI, A., YOSHIDA, T. (1996). Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorus, calcium and magnesium in germfree and conventionalized rats. *Nutr Res*, 16(4), 603-613.
- MIRAJKAR, N.S. & GEBHART, C.J. (2014) 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, e107176.
- MIRAJKAR, N.S., DAVIES, P.R., GEBHART, C.J., (2016). Antimicrobial susceptibility patterns of *Brachyspira* species isolated from swine herds in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 54(12), 2942-2949.
- MIRAJKAR, N.S., JOHNSON, T.J., GEBHART, C.J., (2016b). Complete genome sequence of *Brachyspira hyodysenteriae* Type Strain B-78 (ATCC 27164). *Genome Announc.* 4, e00840 16.31
- MIRAJKAR, N.S., JOHNSON, T.J., GEBHART, C.J. (2017b). Erratum: Complete genome sequence of *Brachyspira hyodysenteriae* type strain B78 (ATCC 27164)[*Genome Announc.* 4, 4,(2016)(e00840-16. *Genome Announc.*, 5(3).
- MIRAJKAR, N.S., JOHNSON, T.J., GEBHART, C.J.,(2017a). Correction for Mirajkar et al., Complete genome sequence of *Brachyspira hyodysenteriae* Type Strain B78 (ATCC 27164). *Genome Announc.* 5, e01453-16.
- MOESER, A.M. & BLIKSLAGER, A.T. (2007) Mechanisms of porcine diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.231, n.1, p.56-67.
- MØLBAK, L., JOHNSEN, K., BOYE, M., et al., (2008). The microbiota of pigs influenced by diet texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Veterinary microbiology*, 128(1-2), 96-107.
- MØLBAK, L., THOMSEN, L.E., JENSEN, T.K., et al., (2007) 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.
- MOLLER, K., JENSEN, T.K., JORSAL, S.E., et al. (1998) Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet. Microbiol.*, v. 62, p. 59-72, 1998.
- MOLNÁR L. (1996). Sensitivity of strains of *Serpulina hyodysenteriae* isolated in Hungary to chemotherapeutic drugs. *Vet. Rec.* 138: 158–160.
- MOORE, E. R., MIHAYLOVA, S. A., VANDAMME, P. et al., (2010). Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Res Microbiol*, 161(6), 430-438.
- MOREAU, M. C. & GABORIAU-ROUTHIAU, V. (1996). The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Res Immunol* . 147(1), 49-59.
- MORENO, A.M., BACCARO, M.R., COUTINHO, L.L. et al. (1999) Frequência de detecção de *Lawsonia intracellularis* através da PCR de suínos no período de dezembro de 1996 a fevereiro de 1999. IX Cong. Brasil. *Vet. Especial. Suínos*, p.205-206, 1999.
- MUNIAPPA, N., MATHIESEN, M.R., DUHAMEL, G.E. (1997) Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9, p.165-171, 1997.
- MURGIA R, & CINCO M. (2004) Induction of cystic forms by different stress conditions in *Borrelia burgdorferi*. *APMIS* 112:57–62.
- MUSHTAQ, M., ZUBAIR, S., RÅSBÄCK, T., et al., (2015) *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: genomic and phenotypic characteristics. *BMC Microbiol.*, 15(1):208.
- NAMKUNG, H., LI J. GONG, M., et al., (2004). Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.*, 84(4), 697-704.

- NARESH, R., HAMPSON, D.J. (2011). Exposure to norepinephrine enhances *Brachyspira pilosicoli* growth, attraction to mucin and attachment to Caco-2 cells. *Microbiology*. 2011;157:543–7.
- NEO, E., LA, T., PHILLIPS, N.D., et al. (2013) 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).
- NIBBELINK, S.K., WANNEMUEHLER, M.J., (1992). An enhanced murine model for studies of *Serpulina* (Treponema) *hyodysenteriae* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60, 3433–3436.
- 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.
- NOVOTNÁ, M. & ŠKARDOVÁ, O. *Brachyspira hyodysenteriae*: detection, identification and antibiotic susceptibility. *Vet. Med. – Czech*, v. 47, n. 4, p. 104–109, 2002.
- NUESSEN, M.E., JOENS, L.A., GLOCK, R.D., (1983) Involvement of lipopolysaccharide in the pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. *J. Immunol.*, 131:997-999.
- OCHIACHI, S.; ADACHI, Y.; MORI, K. (1997) 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.
- OH, Y. S., LEE, J. B., MCRIST, S. (2010). Microarray analysis of differential expression of cell cycle and cell differentiation genes in cells infected with *Lawsonia intracellularis*. *The Veterinary Journal*, 184(3), 340-345.
- OLIVEIRA B.R., GUNDIM L.F., LIMA A.M.C., MEDEIROS A.A. (2016). Investigação de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos com diarreia no Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(3):287-291.
- OLSON, L.D. (1974). Clinical and pathological observations on the experimental passage of swine dysentery. *Can. J. Comp. Med.* 38, 7–13.91–1402.
- OSORIO, J., CARVAJAL, A., NAHARRO, G., (2013). 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, 861-869.
- OSORIO, J., CARVAJAL, A., NAHARRO, G., et al., (2012) 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.
- OSWALD, E., NOUGAYRE`DE, J.P., TAIEB, F., et al. (2005) Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr. Opin. Microbiol.*;8(1):83–91.
- OXBERRY, S.L., TROTT, D.J., HAMPSON, D.J. (1998). *Serpulina pilosicoli*, water birds and water: potential sources of infection for humans and other animals. *Epidemiol Infect* 121, 219–225.
- PAJARILLO, A.B., CHAE, E.J.P., BALOLONG P. et al., (2014a). Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 60(4), 140-146.
- PAJARILLO, E.A.B., CHAE, J.P., BALOLONG, M.P., et al. (2014b). Pyrosequencing-based analysis of fecal microbial communities in three purebred pig lines. *J. Microbiol.*, 52(8), 646-651.
- PALMER, C., BIK, E.M., DIGIULIO, D.B. et al., (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5(7), e177.
- PARADIS, M.; GOTTSCHALK, M.; RAJIC, A. et al. Seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in different swine populations in 3 provinces in Canada. *Can. Vet. J.*, v.48, p.57-62, 2007.
- PARK, N.Y., CHUNG, C.Y., MCLAREN, A.J., et al., (1995). Polymerase chain reaction for identification of porcine spirochaetes recovered from cases of intestinal spirochaetosis. *FEMS Microbiol Lett* 125, 225–229.
- PASTER, B.J. (1991) 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.
- PASTER, B.J., & DEWHIRST, F.E. (2000). Phylogenetic foundation of spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2(4), 341-344.



- PASTER, B.J., DEWHIRST, F.E., WEISBURG, W.G. et al., (1991). Phylogenetic analysis of the spirochetes *J. Bacteriol.* 173(19), 6101-6109.
- PATI A., SIKORSKI J., GRONOW S. et al., (2010) Complete Genome sequence of *Brachyspira murdochii* type strain (56-150T). *Stand Genomic Sci* , Vol. 2, No. 3, p. 260–269.
- PEDERSEN, K.S., STAHL, M., GUEDES, R.M., et al., (2012) Association between faecal load of *Lawsonia intracellularis* and pathological findings of proliferative enteropathy in pigs with diarrhoea. *BMC Vet Res* 8: 198.
- PEJSAK, Z., ŻMUDZKI, J., WASAK, M., et al. (2007) Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* infections in Polish swine population. *Med Weter* 63: 994-996.
- PEREZ, J. B. D. S., RUBIN, J. E., FERNANDO, C., et al. (2016). Characterization of "Brachyspira hamptonii" Clade I and II Isolated from Commercial Swine in Western Canada. *FACETS*.
- PESCOVITZ, M.D., SAKOPOULOUS, A.G., GADDY, J.A., et al. 1994. Porcine peripheral blood CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dual expressing T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 53–62.
- PETTERSSON, B., FELLSTRÖM, C., ANDERSSON, A., et al. (1996). The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* Species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. *J.Bacteriol.* 178: 4189–4199.
- PHILLIPS, N.D., LA, T., ADAMS, P.J. et al. (2009) Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. *Vet. Microbiol.*, v. 134, p. 294-299, 2009.
- PIEPER, R., JANCZYK, P., URUBSCHUROV, V. et al., (2009). Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/8866 before and at the time 130(3), 227-232.
- PLUSKE JR, DURMIC Z, PETHICK DW, et al., (1998). Confirmation of the role of rapidly fermentable carbohydrates in the expression of swine dysentery in pigs after experimental infection. *Journal of Nutrition* 128: 1737–1744
- POWELL, R.W., DYESS, D.L., COLLINS, J.N., et al. (1999). Regional blood flow response to hypothermia in premature, newborn, and neonatal piglets. *J. Pediatric Surg.* 34:193–198.
- PRINGLE, M., FELLSTROM, C., JOHANSSON, K. E.(2007) Decreased susceptibility to doxycycline associated with a 16S rRNA gene mutation in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol.* 123, 245–248.
- PRINGLE, M., LANDEN A., ERICSSON H. et al., (2012) Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. *Act. Vet. Scan.*, 54, 54.
- PRINGLE, M., POEHLGAARD, J., VESTER, B., et al. (2004). Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Mol. Microbiol.* 54, 1295-1306.
- PROHÁSZKA, L. & LUKACS, K. (1984) Influence of the diet on the antibacterial effect of volatile fatty acids and on the development of swine dysentery. *Zentr. für Veterinär. B.*, v. 31, p. 779-785.
- PRUITT, K., DER, C.J. (2001) Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett.*;171(1):1–10.
- PUSTERLA, N., HIGGINS, J.C., SMITH, P., et al., (2008). Epidemiological survey on farms with documented occurrence of equine proliferative enteropathy due to *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Rec.*163, 156–158
- PUSTERLA, N., HILTON, H., WATTANAPHANSAK, S., et al., (2009). Evaluation of the humoral immune response and fecal shedding in weanling foals following oral and intra-rectal administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. J.* 182, 458–462.
- PUSTERLA, N., MAPES, S. GEBHART, C. (2012) Further investigation of exposure to *Lawsonia intracellularis* in wild and feral animals captured on horse properties with equine proliferative enteropathy. *Vet. J.*, 194, 253- 255.
- QUINTANA-HAYASHI, M.P., MAHU, M., DE PAUW, N. et al. (2015) The levels of *Brachyspira hyodysenteriae* binding to porcine colonic mucins differ between individuals, and

binding is increased to mucins from infected pigs with *de novo* MUC5AC synthesis. *Infect Immun.* ;83:1610–9.

RADOSTITIS, O.M., GAY, G.C., BLOOD, D.C., et al. (2002). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, 9. Ed. Rio de Janeiro RJ. p. 1737.

RAMOTAR, K., CONLY, J.M., CHUBB, H. et al., (1984). Production of menaquinones by intestinal anaerobes. *J. Infect. Dis.*, 150(2), 213-218.

RASBACK, T., FELLSTROM, C., BERGSJO, B., et al., (2005) Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test. *Vet. Microbiol.* 109, 229-243.4.

RASBACK, T., JANSSON, D.S., JOHANSSON, K., et al., (2007) A novel entero-pathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ. Microbiol.*, 4, 983–991.

REES, A.S., LYSONS, R.J., STOKES, C.R. et al. (1989a). Antibody production by the pig colon during infection with *Treponema hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* 47, 263–269.

REES, A.S., LYSONS, R.J., STOKES, C.R. et al., (1989b). The effect of parenteral immunisation on antibody production in the pig colon. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23, 171–178.

REINER, G., WINKELMANN, M., WILLEMS, H., (2011). Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *Eur. J. Wildl. Res.* 57, 443–448.

RESENDE, T.P., PEREIRA, C.E.R., DE PAULA GABARDO, M., et al. (2015). Serological profile, seroprevalence and risk factors related to *Lawsonia intracellularis* infection in swine herds from Minas Gerais State, Brazil. *BMC Vet Res*, 11(1), 306.

RIBER, U.; HEEGAARD, P.M.H., CORDES, H. et al.(2015) Vaccination of pigs with attenuated *Lawsonia intracellularis* induced acute phase protein responses and primed cellmediated immunity without reduction in bacterial shedding after challenge. *Vaccine*, v.33, p.156- 162.

ROBERFROID, M.B., BORNET, F., BOULEY, C.E. et al., (1995). Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr. Rev.* 53(5), 127-130.

ROBERFROID, M.B., VAN LOO, J.A., GIBSON, G.R., (1998) The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and its Hydrolysis Products. *J Nutr* 128, 11-9.

ROBERTS, L., ROLAND, A. LAWSON, G.H.K. (1980). Porcine intestinal adenomatosis: epithelial dysplasia and infiltration. *Gut* 21: 1035–1040

ROBERTSON, I., MHOMA, J., HAMPSON, D., (1992). Risk factors associated with the occurrence of swine 33 dysentery in Western Australia: results of a postal survey. *Aust. Vet. J.* 69, 92–93.

ROCA, M., NOFRARÍAS, M., MAJÓ, N. et al., (2014). Changes in bacterial population of gastrointestinal tract of weaned pigs fed with different additives. *Biomed. Res. Int.*

ROHDE, J., HABIGHORST, K., SEEHUSEN, F. "*Brachyspira hampsonii*" clade I isolated from Belgian pigs imported to Germany. *Vet Microbiol.*, 168, p.432-435, 2014.

ROHDE, J., KESSLER, M., BAUMS, C.G., et al., (2004) Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet. Microbiol.* 102, 25 –32.

ROHDE, J., ROTHKAMP, A., GERLACH, G.F., (2002) Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel nox PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2598–2600.

ROSEY, E.L., KENNEDY, M.J., YANCEY JR., R.J., (1996) Dual flaA1 flaB1 mutant of *Serpulina hyodysenteriae* expressing periplasmic flagella is severely attenuated in a murine model of swine dysentery. *Infect. Immun.* 64, 4154–4162.

ROWAN, F., DOCHERTY, N.G., MURPHY, M., (2010) *Desulfovibrio* bacterial species are increased in ulcerative colitis. *Dis. Colon. Rectum.* 53:1530–6.

ROWAN, T.G. & LAWRENCE, T.L.J. (1982) Amino-acid digestibility in pigs with signs of porcine intestinal adenomatosis. *Vet. Rec.* 110:306–307.

- ROWLAND A.C. & LAWSON G.H.K. (1975). Porcine intestinal adenomatosis: a possible relationship with necrotic enteritis, regional ileitis and proliferative haemorrhagic enteropathy. *Vet. Rec.* 97(10):178-180.
- ROWLAND, A.C., HUTCHINGS, D.A. (1978) Necrotic enteritis and regional ileitis in pigs at slaughter. *Vet Rec.*103(15):338–339.
- RUBIN, J.E., COSTA, M.O., HILL, J.E., et al., (2013). Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with “*Brachyspira hampsonii*” strain 30446. *PLoS ONE*. 8: e57146.
- RUGNA, G., BONILAURI, P., CARRA, E., (2015) Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003–2012. *Vet. J.* 203(1): 115–119.
- RYAN, S., HILL, C., GAHAN, C.G. (2008) Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. *Adv Appl Microbiol.* 65:67–91.
- RYDHMER, L., HANSSON, M., LUNDSTRÖM, K. et al., (2013). Welfare of entire male pigs is improved by socialising piglets and keeping intact groups until slaughter. *Animal*, 7(09), 1532-1541.
- SAPICO F, REEVES D, WEXLER H, et al. (1994). Preliminary study using species-specific oligonucleotide probe for rRNA of *Bilophila wadsworthia*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2510–2513.
- SAVAGE, D.C. (1980). Colonization by and survival of pathogenic bacteria on intestinal mucosal surfaces. In Adsorption of Microorganisms to Surfaces, pp. 175–206. Edited by B. Bitton & K. C. Marshall. New York: Wiley
- SAVAGE, D.C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 31(1), 107-133.
- SCHLEIFER, K. H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.*, 32(8), 533-542.
- SCHUSTER, S.C. (2007). Next-generation sequencing transforms today’s biology. *Nature*, 200(8), 16-18.
- SELLWOOD, R. & BLAND, A.P., (1997). Ultrastructure of intestinal spirochetes. In: HAMPSON, D.J., STANTON, T.B. (Eds.) *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. CAB International, pp.109-149
- SHANAHAN, F. (2002). The host–microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* , 16(6), 915-931.
- SHIMADA, K., BRICKNELL, K.S., FINEGOLD, S.M. (1969). Deconjugation of bile acids by intestinal bacteria: review of literature and additional studies. *J. Infect. Dis.*, 273-281.
- SIMON, G.L. & GORBACH, S.L. (1984) Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*, 86, 174–193.
- SMITH, J.L. (2003) The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J. Food Prot.*;66(7):1292–1303.
- SMITH, S.H. & MCORIST, S. (1997). Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Res. Vet. Sci.* 62(1), 6-10.
- SMITH, S.H., WILSON, A.D., VAN ETTINGER, I., et al. (2014). Down-regulation of mechanisms involved in cell transport and maintenance of mucosal integrity in pigs infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Res.*, 45(1), 55.
- STANTON, T.B. The genus *Brachyspira* . (2006) In: *The Prokaryotes*. Edited by: FALKOW S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.H., STACKEBRANT E. Springer, New York, 7, 330-56.
- SCHMITZ-ESSER S, HAFERKAMP I, KNAB S,(2008) *Lawsonia intracellularis* contains a gene encoding a functional rickettsia-like ATP/ADP translocase for host exploitation. *J. Bacteriol.* 2008, 190(17):5746–5752.
- SCHWARZ, S., & CHASLUS-DANCLA, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res*, 32(3-4), 201-225.
- SHIBAHARA T, HIKITA M, WADA Y, et al., (2000). Intestinal spirochetosis in wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) infected with *Brachyspira* species. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 947–951
- SIBA, P. M., PETHICK, D. W., HAMPSON, D. J. (1996). Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing

swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. *Epidemiol. Infect.* 116, 207–216.

SMITH, D. G. & LAWSON, G.H. (2000) *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* 2001, 82(4):331–345

SOBESTIANSKY J, BARCELLOS D, MORES N, (1998). Clinic and pathology of Swines. 2. Ed. Goiânia-GO. p. 464

SMITH, S.H., MCORIST, S., GREEN, L.E., (1998). Questionnaire survey of proliferative enteropathy on British pig farms. *Vet. Rec.* 142, 690–693.

SPEISER, S.A., ZEEH, F., GOY, N., et al., (2011). Swine dysentery eradication in a grower-finisher farm in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierh.* 153, 14–18.

STANTON, T.B., ROSEY, E.L., KENNEDY, M.J., (1999). 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, 5028–5034.

SONG, Y. & HAMPSON, D.J., 2009. Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in pigs and chickens. *Vet. Microbiol.* 137, 129–136.

SONG Y, LA T, PHILLIPS ND et al. (2015) Development of a serological ELISA using a recombinant protein to identify pig herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet. J.* 206:365–370.

SONG, Y., LA, T., PHILLIPS, N.D., et al. (2009) A reverse vaccinology approach to swine dysentery vaccine development. *Vet. Microbiol.* 137:111–119.

SPERLING, D., SMOLA, J., CIZEK, A. Characterisation of multiresistant *Brachyspira 35 hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Vet. Rec.*, 168,215, 2011.

STANTON, T.B. (1997) 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

STANTON, T.B. (1992) 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.

STANTON, T.B., FOURNIE-AMAZOUZ, E., POSTIC, D., et al. (1997) Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1007-1012.

STANTON, T.B. & LEBO, D.F. (1988), *Treponema hyodysenteriae* growth under various culture conditions, *Vet Microbiol.*, 18 (2), pp. 177-190.

STANTON, T.B.; JENSEN, N.S.; CASEY, T.A.; TORDOFF, L.A.; DEWHIRST, F.E.; STANTON T.,B., POSTIC. D., JENSEN S. (1998). *Serpulina alvinipulli* sp. nov., a new *Serpulina* species that is enteropathogenic for chickens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 48, No. 3, p. 669–676,

STANTON, T.B., TROTT, D.J., LEE, J.I., et al. (1996). Differentiation of intestinal spirochaetes by multilocus enzyme electrophoresis analysis and 16S rRNA sequence comparisons. *FEMS microbiology letters*, 136(2), 181-186.

STEGE, H., JENSEN, T.K., MOLLER, K., et al., (2000). Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev. Vet. Med.* 46, 279–292

STEWART, C. S. (1997). Microorganisms in hindgut fermentors. *Gastrointestinal microbiology*, 2, 142-186.

SUEYOSHI, M., & ADACHI, Y. (1990) Diarrhea induced by *Treponema hyodysenteriae*: a young chick cecal model for swine dysentery. *Infect Immun* 58: 3348–3362

SUH, D.K.; SONG, J.C. (2005) Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. *Journal Veterinary Science*, v.6, n.4, p.289-293.

SWAYNE, D.E., EATON, K.A., STOUTENBURG, J. et al., (1995). Identification of a new intestinal spirochete with pathogenicity for chickens. *Infect. Immun.* 63, 430–436.

SWAYNE, D.E. & MCLAREN, A.J. (1997). Avian intestinal spirochaetes and avian intestinal spirochaetosis. In *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*, pp. 267–300. Edited by D. J. HAMPSON T. B. STANTON. Wallingford, UK: CAB International.

- TAKEUCHI, A. & ZELLER, J.A. (1972) Ultrastructural identification of spirochetes and flagellated microbes at the brush border of the large intestinal epithelium of the Rhesus monkey. *Infec. Immunity* 6: 1008-1018.
- TAGUCHI, H., TAKAHASHI, M., YAMAGUCHI, H., et al., (2002). Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7, strain 6. *J Med Microbiol.* 51(4), 336-343.
- TAYLOR D.J. (2012) Miscellaneous bacterial infections. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; et al., eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; p.817-846, 2012.
- TAYLOR, D.J. & ALEXANDER, T.J.L., (1971) The Production of Dysentery in Swine by Feeding Cultures Containing a Spirochaete. *Br. Vet. J.* 127, lviii–lxi.
- TAYLOR, D.J., BLAKEMORE, W.F. (1971) Spirochaetal invasion of the colonic epithelium in swine dysentery. *Res Vet Sci*;12:177–9.
- TAYLOR, D.J. & TROTT, D.J. (1997). Porcine intestinal spirochaetosis and spirochaetal colitis. In *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*, pp. 211–242. Edited by HAMPSON, D.J. STANTON, T.B. Wallingford, UK: CAB International.
- TER HUURNE, A., GAASTRA, W., (1995) Swine dysentery: more unknown than known. *Vet. Microbiol.* 46, 347–60.
- TERPSTRA, J.I., AKKERMANS J.P.W.M., OUWERKERK, H. 1968. Investigations into the etiology of vibronic dysentery (Doyle) in pigs. *Netherlands J. Vet. Sci.* 1:5.
- THOMSEN, L.E., KNUDSEN, K.E.B., JENSEN, T.K., et al., (2007) The effect of fermentable carbohydrates on experimental swine dysentery and whip worm infections in pigs. *Vet. Mic.* 119, 152–163.
- THOMSON, J.R. & FRIENDSHIP, R.M. (2012) Digestive System In: Zimmermann J.J., KARRIKER LOCKE A., RAMIRES A., SCHWARTZ KENT J., STEVENSON GREGORY W. (ed.), *Disease of Swine*: 10th Edition. Ames, Iowa: Blackwell Publishing,
- THOMSON, J.R., SMITH, W.J. MURRAY, B.P. (1998). Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Vet. Rec.* 142, 235–239.
- THOMSON J.R., SMITH W.J., MURRAY B.P., et al., 2001. Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. *Anim. Health Res. Rev.* 2(1), 31-36
- TOMANOVA, K., et al. (2003) *Lawsonia intracellularis* in wild mammals in the Slovak Carpathians. *J. Wildl. Dis.* 39:407–411.
- TORRALLARDONA, D., BADIOLA, I., BROZ, J. (2007). Effects of benzoic acid on performance and ecology of gastrointestinal microbiota in weanling piglets. *Livest Sci*, 108(1), 210-213.
- TROTT, D.J., & HAMPSON, D.J. (1998) Evaluation of day-old specific pathogen-free chicks as an experimental model for pathogenicity testing of intestinal spirochaete species. *J. Comp. Pathol.* 118: 365–381
- TROTT D.J., MIKOSZA A.S.J, COMBS B.G., et al., (1998). Population genetic analysis of *Serpulina pilosicoli* and its molecular epidemiology in villages in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 48, 3, p. 659-668.
- TROTT, D.J., STANTON, T.B., JENSEN, N.S., et al. (1996), *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46 (1), pp. 206-215.
- TUOMISTO, H. (2010). A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography*, 33(1), 2-22.
- TUREK, J.J. & MEYER, R.C. (1979). An intestinal spirochete infestation in the opossum. *Curr. Microbiol.* 3: 27–31.
- UMESAKI, Y., SETOYAMA, H., MATSUMOTO, S., et al. (1993). Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunol* 79(1), 32.

UPADRASTA, A., O'SULLIVAN, L., O'SULLIVAN, O. et al., (2013). The effect of dietary supplementation with spent cider yeast on the swine distal gut microbiome. *PloS one*, 8(10), e75714.

UCHIYA, K., BARBIERI, M.A., FUNATO, K., et al. ( A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J.* 1999;18(14): 3924–3933.

VAHJEN, W., PIEPER, R., ZENTEK, J. (2010). Barcoded pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons reveals changes in ileal porcine bacterial communities due to high dietary zinc intake. *Applied and environmental microbiology*, 76(19), 6689-6691.

VAN DIJK, E. L., AUGER, H., JASZCZYSZYN, Y. et al., (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, 30(9), 418-426.

VAN DUIJKEREN E, GREKO C, PRINGLE M, et al. (2014) Pleuromutilins: use in foodproducing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014; 69(8):2022–31.

VANNUCCI, F.A., BORGES, E.L., DE OLIVEIRA, J.S.V. (2010). Intestinal absorption and histomorphometry of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Microbiol.*, 145(3-4), 286-291.

VANNUCCI, F.A., GEBHART, C.J. (2014) Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet. Path.* 51, 465e477.

VANNUCCI, F.A., FOSTER, D.N., GEBHART, C.J., (2012). Comparative transcriptional analysis of homologous pathogenic and non-pathogenic *Lawsonia intracellularis* isolates in infected porcine cells. *PLoS One* 7, e46708.

VANNUCCI, F.A., WATTANAPHANSAK, S., GEBHART, C.J., (2012). An alternative method for cultivation of *Lawsonia intracellularis*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1070–1072

VANNUCCI, F.A.; PUSTERLA, N.; MAPES, S.M. et al. (2012) Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet. R.*, v.43, p.1-9.

VANNUCCI, F.A., KELLEY, M.R. GEBHART, C.J. (2013a) Comparative genome sequencing identifies a prophage-associated genomic island linked to host adaptation of *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet. R.*, v.44, p.1-9.

VANNUCCI, F.A.; BECKLER, D.; PUSTERLA, N.; et al. (2013b). Attenuation of virulence of *Lawsonia intracellularis* after “in vitro” passages and its effects on the experimental reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet Microbiol*, v.162, n.1, p.265–269.

VANNUCCI, F.A., FOSTER, D.N. GEBHART, C.J. (2013c) Laser microdissection coupled with RNA-seq analysis of porcine enterocytes infected with an obligate intracellular pathogen (*Lawsonia intracellularis*). *BMC Genomics.*, v.14, p.421–436.

VANROBAEYS, M., DE HERDT, P., DUCATELLE, R., et al., (1998). Typhlitis by intestinal *Serpulina*-like bacteria in domestic guinea pigs (*Cavia porcellus*). *J. Clin. Microbiol.* 36: 690–694.

VERLINDEN, M., BOYEN, F., PASMANS, F., et al. (2011). Antimicrobial susceptibility pattern of *Brachyspira intermedia* isolates from European layers. *Microb. Drug Resist.* 17, 485-488.

VENTER, C.S., VORSTER, H.H., CUMMINGS, J.H. (1990). Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. *Am J Gastroenterol.*85(5).

VIOTT, A.M., LAGE A.P., CRUZ JUNIOR, E.C.C. et al. (2013) The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower e finish herds. *Braz. J. of Microb.*, v.44, p.145-151.

VON MERING, C., HUGENHOLTZ, P., RAES, J. et al., (2007). Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science*, 315(5815), 1126-1130.

YANG, Q., HUANG, X., ZHAO, S., et al. (2017) Structure and function of the fecal microbiota in diarrheic neonatal piglets. *Front Microbiol* (2017) 8:502.

YANG, H. & PARKHOUSE, R. M. (1996). Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89, 76–83.

YEH, J.Y., HWANG, J.M., KIM, J.G. (2017). DETECTION OF *Lawsonia intracellularis* DNA IN ILEAL TISSUES OF DEAD WILD BIRDS IN THE REPUBLIC OF KOREA. *Slovenian Veterinary Research*, 54(3).

YOLTON, D.P. & SAVAGE, D.C. (1976). Influence of certain indigenous gastrointestinal microorganisms on duodenal alkaline phosphatase in mice. *Appl Environ Microbiol* , 31(6), 880-888.

- YOUNES, H., COUDRAY, C., BELLANGER, J. et al., (2001). Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr.* 86(04), 479-485.
- WAAIJ, V.D. (1989). The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol.*, 43(1), 69-87.
- WALTER D, GEBHART C, KROLL J, et al. Serologic profiling and vaccination timing for *Lawsonia intracellularis*. *J Swine Health Prod*1, v.2(6), p.310-31, 2004.
- WAMSLEY, H.L., WELLEHAN, J.F., HARVEY, J.W., et al. (2005) Cytologic diagnosis of *Lawsonia intracellularis* proliferative ileitis in a Japanese snow macaque (*Macaca fuscata*). *Vet. Clin. Pathol.*; 34(1): 57– 60.
- WANCHANTHUEK, P., BELLGARD, M.I., LA, T., et al. (2010). The complete genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* and comparison with other *Brachyspira* genomes. *PLoS ONE* 5:e11455. 11455.
- WANG, Q., GARRITY, G.M., TIEDJE, J.M. et al., (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73(16), 5261-5267.
- WANG, X., HEAZLEWOOD, S.P., KRAUSE, D.O., et al. (2003). Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J.Appl. Microbiol*, 95(3), 508-520.
- WARNEKE, H.L., KINYON, J.M., BOWER, L.P., et al., (2014). Matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of *Brachyspira* species isolated from swine, including the newly described "*Brachyspira hamptonii*". *J .Vet. Diagn. Invest.* 26(5): 635-639.
- WATERS, W.R., PESCH, B.A., HONTECILLAS, R., et al. (1999a). Cellular immune responses of pigs induced by vaccination with either a whole cell sonicate or pepsin-digested *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* bacterin. *Vaccine* 18, 711–719. 362 J. Holden et al. / *Vet. Microbiol.* 128 (2008) 354–363.
- WATERS, W.R., SACCO, R.E., DORN, A.D., et al., (1999b). Systemic and mucosal immune responses of pigs to parenteral immunization with a pepsin-digested *Serpulina hyodysenteriae* bacterin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 69, 75–87.
- WATSON, E., ALBERDI, M. P., INGLIS, N. F., et al., (2014). Proteomic analysis of *Lawsonia intracellularis* reveals expression of outer membrane proteins during infection. *Veterinary microbiology*, 174(3-4), 448-455.
- WEISSENBOCK, H., MADERNER, A., HERZOG, A.M., et al. (2005) Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of nox using paraffin-embedded tissue 104 samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Vet mic.* 111, 67-75.
- WELLE, T., HOEKSTRA, A. T., DAEMEN, I. A., et al., (2017). Metabolic response of porcine colon explants to “*in vitro*” infection by *Brachyspira hyodysenteriae*: a leap into disease pathophysiology. *Metabolomics*, 13(7), 83.
- WELSH, M.J. et al. (1982) Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science*, v.218, p.1219.
- WENDT, M.; SCHULZE-JOHANN, R.; VERSPOHL, J. (2004) Epidemiological investigations on *Lawsonia intracellularis* infections in German pig herds. *Proceedings 18th IPVS Cong.*, v.1, p.52.
- WILLEMS, H., & REINER, G. (2010). A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 123(5-6), 205-209.
- WHIPP, S.C., ROBINSON, I.M., HARRIS, D.L., et al. (1979) Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 26: 1042–1047.
- WITCHELL, T.D., COUTTS, S.A., BULACH, D.M., et al. (2006). Differential expression of the Bhmp39 major outer membrane proteins of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 74, 3271–3276.

- WHITTAKER, R.H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecol. Monogr.* 30: 279-338.
- WHITING R.A., DOYLE, L.P., SPRAY, R.S. (1921) Swine Dysentery. *Bulletin*: 3-15.
- WINDSOR, R.S., SIMMONS, J.R. (1981) Investigation into the spread of swine dysentery in 25 herds in East Anglia and assessment of its economic significance in five herds. *Vet Rec.*;109:482-4.
- WILBERTS, B.L., ARRUDA, P.H., KINYON, J.M., et al., (2014). Comparison of lesion severity, distribution, and colonic mucin expression in pigs with acute swine dysentery following oral inoculation with "*Brachyspira hamptonii*" or *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet.Path.*, 51, 1096-1108.
- WILCOCK, B.P. & OLANDER, H.J. (1979). Studies on the pathogenesis of swine dysentery. I. Characterization of the lesions in colons and colonic segments inoculated with pure cultures or colonic content containing *Treponema hyodysenteriae*. *Vet .Pathol.* 16, 450-465.
- WINKELMAN, N.L., DEE, S., (1996). Ileitis: an update. *Compendium of Continuing Education of Practicing Veterinarians* 18, S19-S25
- WOESE, C.R. & FOX, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- WOOD, E.N. & LYSONS, R.J. (1988) Financial benefit from the eradication of swine dysentery. *Vet Rec* ;122:277-9
- ZLOTOWSKI, P., DRIEMEIER, D., BARCELLOS, D.E.S.N. de. (2008) Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. *Act. Sci. Vet.*, v.36, p.s81-s86, 2008.
- ZUCKERMANN, F.A. & HUSMANN, R.J. (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immun.* 87, 500-512.
- ZUERNER, R.L., STANTON, T.B., MINION, F.C. et al., (2004) Genetic variation in *Brachyspira*: chromosomal rearrangements and sequence drift distinguish *B. pilosicoli* from *B. hyodysenteriae*. *Anaerobe* 10:229-237.



## 10. CAPÍTULO 1 - ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ANIMAIS À CAMPO COM QUADROS DE DISENTERIA SUÍNA

### 10.1 RESUMO

A disenteria suína causada pela *B. hyodysenteriae* é uma importante causa de diarreia em suínos. Em alguns trabalhos utilizando animais gnotobióticos, não foi possível reproduzir a doença, demonstrando a importância da presença de microrganismos específicos, que permitem a colonização da *B. hyodysenteriae* no ambiente colônico. O objetivo deste trabalho foi comparar o microbioma intestinal de animais positivos e negativos para a disenteria suína em animais à campo. As fezes de 37 animais negativos e 32 animais positivos para *B. hyodysenteriae* foram sequenciadas utilizando o método "Fusion" pelo kit Ion Torrent 16S Metagenomics, amplificando a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. As sequências foram filtradas e classificadas taxonomicamente. O QIIME foi usado para geração de resultados de diversidade de  $\alpha$  e  $\beta$ . Não houve diferença significativa na diversidade total entre os grupos. O gênero foi o único grau taxonômico com diferenças significativas com maior abundância relativa de *Anaerovorax*, *Mogibacterium* e *p-75-a5* em animais positivos e *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Fibrobacter*, *Rummeliibacillus* e *Streptococcus* em animais negativos. Diferenças significativas foram encontradas para os gêneros *Anaerovorax* e *Mogibacterium*, relatados anteriormente como prevalentes em animais com disenteria suína, em humanos com síndrome do intestino irritável e câncer colorretal. O gênero *p-75-a5* não é bem elucidado, porém prevalece em suínos tratados com óxido de zinco e antimicrobianos. *Bifidobacterium* e certas espécies de *Streptococcus* são conhecidos pelas propriedades probióticas e considerados fatores protetores contra microrganismos potencialmente patogênicos. Os outros gêneros abundantes (*Coprococcus*, *Dialister*, *Fibrobacter* e *Rummeliibacillus*) são pouco relatados na literatura. Esse é um perfil comum encontrado em casos de disenteria suína, no entanto, novos estudos são necessários para melhor compreender os perfis de microbiota associados à suscetibilidade dessa doença.

**Palavras-chave:** *B. hyodysenteriae*, diarreia, colite, microbioma, Ion torrent.

### 10.2 INTRODUÇÃO

A disenteria suína (DS) é caracterizada por colite catarral fibrinohemorrágica e tem como principal representante desse grupo *B. hyodysenteriae* (Taylor & Alexander, 1971) uma bactéria Gram-negativa, móvel, com morfologia espiralada, anaeróbia estrita, com grau de tolerância ao oxigênio de até 1% é o agente etiológico da DS (Hampson, 2012). A doença é caracterizada por diarreia muco-hemorrágica, ocasionalmente com fibrina, associada à anorexia e ocorrência de mortalidade em poucos dias após o início dos sinais clínicos em animais não tratados (Guedes, 2005).

Em trabalhos de inoculação experimental utilizando animais gnotobióticos foi observada a ausência de sinais clínicos, levantando a hipótese de que para o desenvolvimento da DS é necessária uma microbiota específica que auxilie na colonização e estabelecimento da infecção em suínos (Meyer, et al., 1974; Meyer, et al., 1975; Harris, et al., 1978; Whipp, et al., 1979).

Em outros casos utilizando animais de linhagem comercial, em estudos de inoculação experimental, foi observada a ausência de sinais clínicos em alguns animais mesmo utilizando uma concentração alta de inóculo (Sato, 2017). Nesse caso a microbiota provavelmente funciona como um fator protetor impedindo o estabelecimento da infecção.

Além disso, a dieta fornecida tem influência significativa no que diz respeito ao aparecimento das lesões, uma vez que interfere na população microbiana (Leser et al. (2000; Backhed et al., 2005; Ley et al., 2008). Dessa forma, é possível observar um caráter multifatorial e dependente da população microbiana presente na infecção pela *B. hyodysenteriae*.

Através do conhecimento da microbiota e as funções exercidas por esses grupos, ferramentas de diagnóstico ajudam a entender de forma mais abrangente os mecanismos e a patogênese das doenças. Para obter acesso à essas informações são utilizadas técnicas independentes e dependentes de cultivo. Apesar de sua importância na microbiologia, o método

dependente de cultivo não permite o cultivo de 100% das espécies presentes (Torsvik et al., 1990; Whitman et al., 1998; Torsvik et al., 2002). Já os métodos independentes de cultivo, conseguem detectar a presença desses microorganismos por técnicas de biologia molecular, tendo acesso à toda microbiota de uma amostra (Schloss & Handelsman, 2004).

Com o desenvolvimento da biologia molecular e de técnicas de sequenciamento de nova geração, tornou-se mais acessível o desenvolvimento de pesquisas explorando os perfis das comunidades microbianas. No caso da DS, poucos são os trabalhos que utilizam métodos de metagenômica, e todos os trabalhos realizados são executados em ambiente experimental. De acordo com o perfil microbiano das fezes é possível detectar um padrão de microbiota de animais saudáveis e doentes, criando uma identidade própria para enfermidade. No caso da DS, além da identidade dos animais doentes, é possível buscar um perfil microbiano para os animais resistentes a essa enfermidade.

O objetivo desse trabalho foi comparar o perfil microbiano fecal presente em animais à campo, de diferentes regiões produtoras de suínos no Brasil acometidos por disenteria, em relação a animais à campo saudáveis e negativos para *B. hyodysenteriae* e, a partir das sequências gênicas obtidas, avaliar as relações filogenéticas e de diversidade entre animais doentes e saudáveis.

## **10.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **10.3.1 AMOSTRAS**

Foram utilizadas amostras de fezes retais de animais provenientes de granjas comerciais, 37 sadios e 32 animais com DS, confirmados pela técnica de PCR de acordo com (La et al., 2003) e isolamento bacteriano nos casos positivos. As amostras são provenientes dos estados do Distrito Federal, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul entre os anos de 2012 à 2016 como demonstrado no (Anexo 2). As amostras são referentes à submissões para diagnóstico e monitoria sanitária enviadas para Universidade Federal de Minas Gerais. Todas as granjas utilizavam antimicrobianos na dieta em múltiplas fases do sistema de produção e em casos especiais são utilizados antimicrobianos de forma terapêutica. Apesar das amostras não possuírem um perfil comum elas são referentes à realidade do campo encontrada no Brasil. Após coletadas, as amostras foram armazenadas à -80C até seu processamento.

### **10.3.2 SEQUENCIAMENTO 16S**

O DNA total foi extraído a partir de 200 mg de amostras fecais utilizando um kit comercial (DNA QIAmp de stool Mini Kit, Qiagen Inc., Toronto, Ontário), seguindo as recomendações do fabricante. Após extraído, o DNA foi quantificado utilizando Fluorômetro Qubit®2.0 e Qubit® ds DNA Hs Assay Kit (Life Technologies).

Para o sequenciamento genômico, foi utilizado o método “Fusion” desenvolvido para análise do microbioma utilizando o sequenciamento de nova geração pelo Ion Torrent 16S Metagenomics kit que amplifica a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA (Bokulich, et al., 2012; 2013).

Os iniciadores foram customizados com 1 iniciador reverso e 96 iniciadores diretos com barcodes, para a região hipervariável V4 do 16S, como descrito no anexo (1). A região V4 hipervariável do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando os iniciadores de fusão (Bokulich, et al., 2012; 2013). Os iniciadores de fusão contêm a sequência com tags para os “barcodes”, a sequência do primer propriamente dito e um adaptador para ligação (anexo1).

Para reação de PCR inicial foi utilizado 1x Platinum® PCR SuperMix High Fidelity; 5 µM de cada iniciador de fusão; por volta de 20-50 ng de DNA genômico e água deionizada estéril. Os ciclos utilizados foram 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 ° C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 30 segundos, anelamento à 58 ° C por 30 segundos e extensão a 68 ° C durante 1 min/kb.

Os produtos de PCR foram detectados utilizando QiAxccl Advanced System (Qiagen) e purificados com Agencourt® AMPure XP Reagent (Beckman Coulter) e posteriormente

quantificado usando Fluorômetro Qubit®2.0 e Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) e reajustadas para concentração final de 26 pM. Os produtos da PCR apresentam entre 300 e 400 pares de base.

A PCR de emulsão foi realizada, a quebra de emulsão e o enriquecimento foram realizados utilizando o kit OTON OT-Q™ Ion PGM™ (# A29900), de acordo com as instruções do fabricante como descrito brevemente. Uma concentração de uma cópia molde / Partícula Esfera de Íon (ISP) compõe a emulsão de PCR utilizando OT2 (Life Technologies). Em seguida, os ISPs foram recuperados e as contas Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Life Technologies) foram usadas para enriquecer para ISPs positivos para modelos. A amostra foi preparada para sequenciamento usando o Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (# A30044). Cada amostra composta foi carregada em um chip Ion 318 e sequenciada no sistema PGM (Personal Genome Machine) para 850 fluxos.

Para determinar a qualidade do método metagenômico, foram utilizadas duas comunidades microbianas 16S sintéticas (Mock Communities) de espécies com genomas conhecidos. A primeira comunidade, o HMD-782D contém DNA genômico de 20 estirpes bacterianas com 100.000 cópias por organismo por µL. O segundo é HMD783D, que contém DNA genômico de 20 cepas bacterianas variando entre 1.000 a 1.000.000 de cópias por organismo por µL. Ambos os reagentes foram obtidos através de BEI Resources, NIAID, NIH como parte do Projeto Microbioma Humano: DNA Genômico da Microbial Mock Community B (Even, Low Concentration), v5.1L, para 16S RNA Gene Sequencing, HM-782D e Genomic DNA de Microbial Mock Community B (Staggered, Low Concentration), v5.2L, para 16S rRNA Gene Sequencing, HM-783D.

### 10.3.3 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

#### 10.3.4 PIPELINE DE CLASSIFICAÇÃO METAGENÔMICA

Com as sequências brutas em um Arquivo Fastq e todos os “barcodes”, a amostras foram trabalhadas conforme preconizado no pipeline de classificação de OTU derivado do pipeline de análise de dados do Projeto de microbioma brasileiro (Pylro et al., 2014).

Na primeira etapa, os dados brutos foram filtrados utilizando um script próprio (disponível em: [https://github.com/aquacen/fast\\_sample](https://github.com/aquacen/fast_sample)) com os parâmetros: "-n 100" (para todas as reads), "-s 160" (inclua apenas reads >= 160 pb), "-b 310" (para trinar as reads >= 310 pb), "-l 0" (sem clipe esquerdo) e "-q 20" (para trinar as reads 3' com qualidade no Phred de <20). A próxima etapa consistiu na utilização do software Uparse (Edgar, 2013) para rotular as reads e Usearch (versão de uso 10.0.240) (Edgar, 2017) para filtrar por qualidade (-fastq\_filter -fastq\_maxee 0.8), reads replicadas (-fastx\_uniques -sizeout), por tamanho (-sortbysize -minsize 2), por grupos de OTU (-cluster\_otus), mapa de dados brutos sobre OTUS (-usearch\_global -strand plus -id 0.97). Para gerar a lista de OTUS e converter os arquivos em uma tabela de OTUs foi utilizado o Uparse e a primeira versão do software QIIME (Caporaso et al., 2010) foi para executar: atribuir taxonomia (--similarity 0.7), alinhar as seqüências OTU, alinhamento do filtro e construção da árvore filogenética. Finalmente, a versão de software Biom 2.1.5 (McDonald et al., 2012) foi usada para: converter o Biom table do json, adicionar metadados de taxonomia no QIIME (--observation-header OTUID, taxonomy, confidence --sc-separated taxonomy --float-fields confidence) e organizar tabela de OTU. O programa Usearch na versão 10.0.240 inclui filtros de quimera no passo de formação dos clusters de OTU (-cluster\_otus). Os dois “barcodes” com comunidades “Mock” foram avaliados usando os mesmos passos.

#### 10.3.5 ANÁLISES DE DIVERSIDADE ALPHA E BETA

O QIIME foi utilizado para: filtrar amostras provenientes da tabela de OTU (-n 1000); foi criada uma rarefação única (-d 1000) para avaliar diversidade beta; criar um peso (--metrics unweighted\_unifrac) e peso (- metrics weighted\_unifrac) diversidade beta; e faça múltiplas raridades (-m 10 -x 50000 -s 2000) para usar como diversidade alfa. O pacote ggplot2 do software R foi usado para gerar lotes de  $\alpha$  e  $\beta$  diversidade com os resultados do QIIME, e o mapa de calor

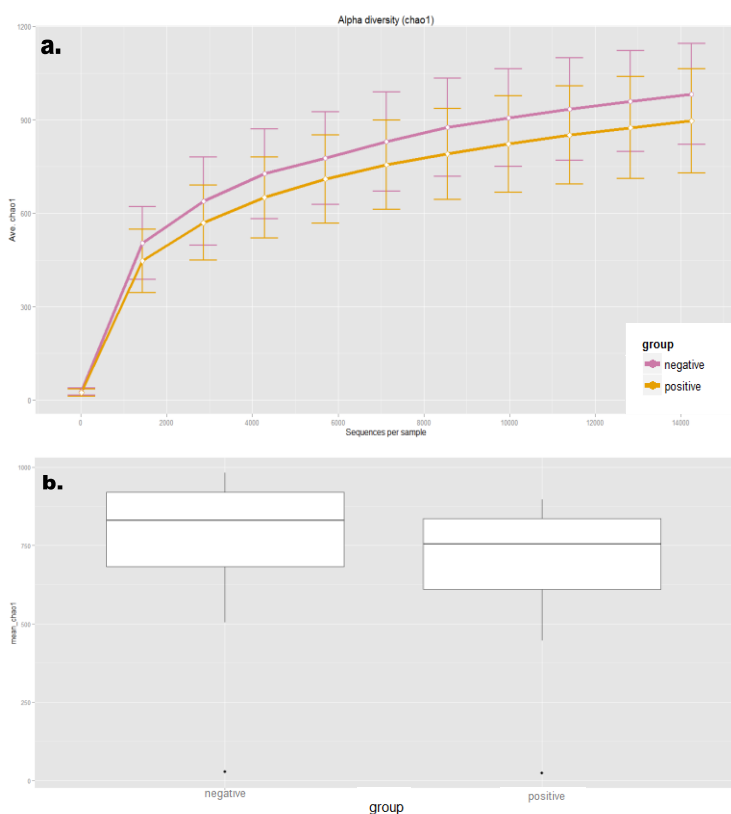
e as comparações estatísticas da abundância familiar. O método de comparação utilizado foi Pairwise Wilcox Test com correção Bonferroni. Somente famílias com representante  $\geq 1\%$  em quase um barcode foram incluídas na análise (Core Team, 2013).

## 10.4 RESULTADOS

Utilizando o sequenciamento genômico pelo Ion Torrent foi obtida uma cobertura de 91% do Chip 318 ( $>9$  mi de reads) das quais foram removidos 51% das reads devido à policlonalidade (~4.5 mi após filtro). Foram utilizadas ao final da filtragem 1.609.870 reads participaram da identificação com média de 23.331 reads por amostra. Em relação a MOCK communities foi iniciado com 3.751.030 reads sendo que 2.141.160 reads foram removidas com baixa qualidade (Phred  $< 20$ ) restando 1.609.870 reads que participaram da identificação.

Não foi observada diferença significativa de riqueza entre os grupos negativo e positivo para disenteria suína, no entanto é possível observar uma maior diversidade no grupo negativo em relação aos animais com disenteria suína como podemos observar na figura 1.

Resultados referentes à abundância tiveram diferença estatística quando comparados para gênero. Gráficos referentes a abundância são demonstrados nas figuras 2. Foi observado um aumento na abundância relativa de *Anaerovorax*, *Mogibacterium* e p-75-a5 nos animais positivos. Para animais sem disenteria suína, foram significativamente abundantes os gêneros *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Fibrobacter*, *Rummeliibacillus* e *Streptococcus*, como demonstrado na figura 2.



**Figura 1. a)** Curvas de rarefação comparando a diversidade alfa (chao1) de amostras de microbiota de suíno com disenteria (linha rosa) e sem disenteria (linhas laranja). Não foram observadas diferenças significativas na riqueza entre os grupos (valor  $p = 0,5385$ ).

**b)** Curvas de rarefação comparando a diversidade alfa representada em blocos de amostras negativas à esquerda e positivas à direita sendo observada uma menor diversidade no grupo positivo.

Não foi observada diferença estatística entre os grupos para diversidade beta entre amostras de fezes de suínos com e sem disenteria suína, não obtendo uma dispersão evidente entre os grupos. Os resultados referentes estão demonstrados na figura 3.

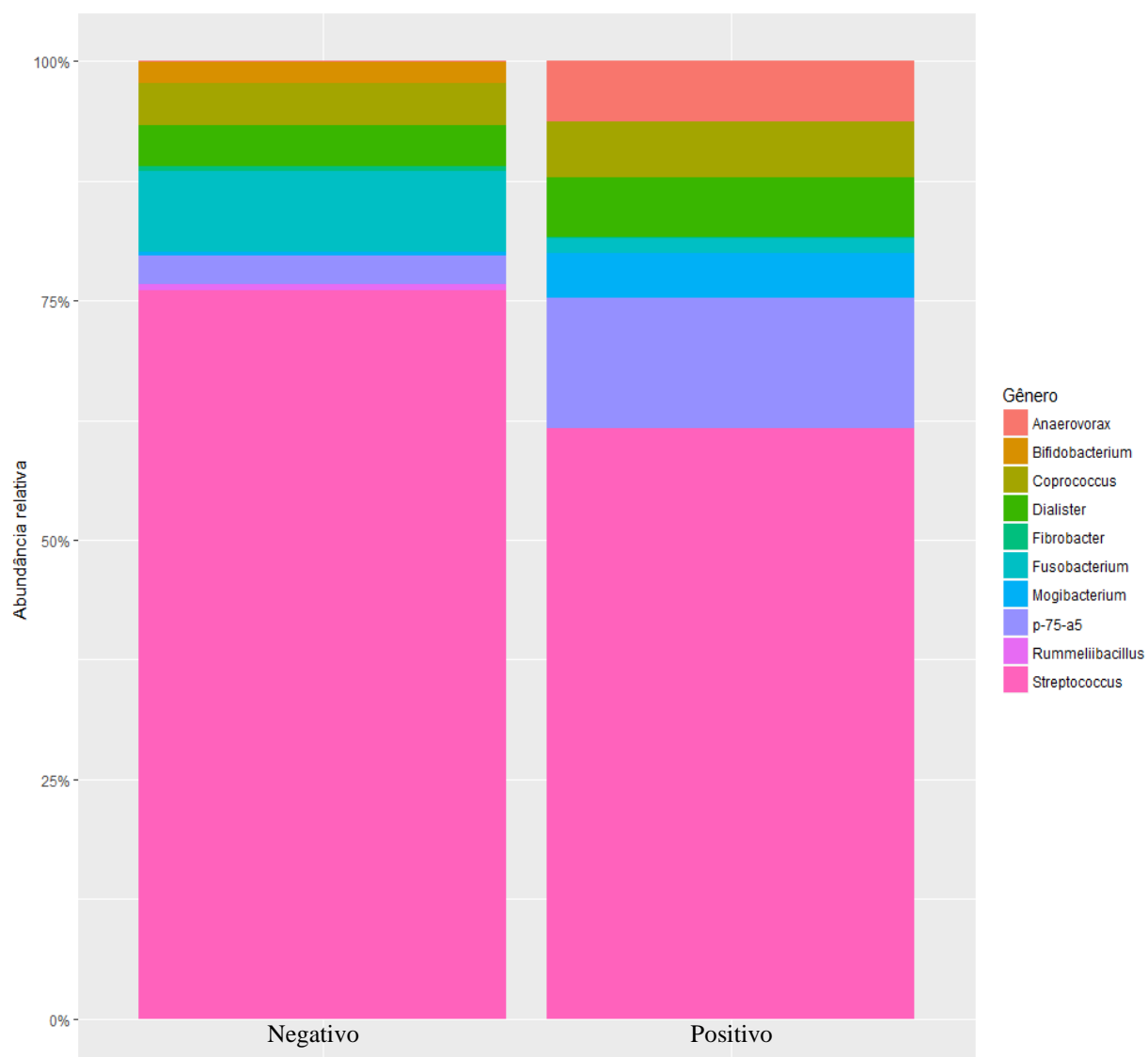


Figura 2. Gráficos de barras empilhadas que representam abundância proporcional de gênero principal em animais positivos à esquerda e negativos a direita. Foi observado um aumento na abundância relativa de Anaerovorax ( $p=0,0003$ ), Mogibacterium ( $p= 0,015836616$ ) e p-75-a5 ( $p=0,035162298$ ) nos animais positivos. Para animais que sem disenteria suína foram significativamente abundantes os gêneros Bifidobacterium ( $p=0,001050158$ ), Coprococcus ( $p=0,011068016$ ), Dialister ( $p=0,033948426$ ), Fibrobacter ( $p=0,008252059$ ), Rummeliibacillus ( $p=0,003074603$ ) e Streptococcus ( $p=0,000199714$ ).

## 10.5 DISCUSSÃO

Neste estudo, auxiliado pelo sequenciamento de nova geração, foram avaliados os perfis de microbiota intestinal em fezes de animais à campo positivos e negativos para disenteria.

A disenteria suína é uma importante enfermidade que acomete suínos no mundo todo (Hampson, 2012). A maioria dos trabalhos anteriores são focados na caracterização do agente e avaliação anatomopatológica. Por ser uma doença de caráter multifatorial o conhecimento da microbiota é importante para melhor entendimento da patogênese da doença. Estudos anteriores mostraram que é necessária uma microbiota que auxilie na colonização da *B. hyodysenteriae* (Whipp et al., 1979).

Os filos Firmicutes e Bacteroidetes são considerados os mais prevalentes na microbiota fecal em geral, independente do quadro de saúde ou doença, como observado em outros trabalhos (Ley et al., 2008; Isaacson & Kim, 2012; Borewicz et al., 2015; Burrough et al., 2017).

Neste trabalho, o gênero, foi o único grau taxonômico em que foi possível observar diferenças significativas entre os grupos. Com um aumento da abundância relativa de *Anaerovorax*, *Mogibacterium* e *p-75-a5* nos animais positivos.

*Anaerovorax* são bactérias estritamente anaeróbias com metabolismo fermentativo (Schink, 2015). Esse microorganismo tem sido encontrado em sedimentos de água do mar, conteúdo ruminal e trato gastro intestinal de suínos (Snell castro et al., 2005). A única espécie descrita até agora é o *Anaerovorax odorimutans* (Schink, 2015). Foi observado em humanos com síndrome do intestino irritável fortes correlações positivas com o aumento de *Anaerovorax* na microbiota (Rigsbee et al., 2012). Por outro lado, esse microorganismo em um trabalho foi indicado como candidato na proteção contra a colonização por *Clostridioides difficile*, sendo observada uma maior proporção em animais resistentes ao *C. difficile* (Perez Cobas et al., 2014). Dessa forma, são necessários mais estudos para melhor compreensão do papel do *Anaerovorax* na disenteria suína.

O aumento de *Mogibacterium* já foi anteriormente observado em um trabalho em animais positivos para disenteria (Burrough et al., 2017). *Mogibacterium* é observado aumentado em casos de câncer coloretal em humanos (Chen et al., 2012; Zhu et al., 2013). *Mogibacterium* são microrganismos anaeróbios e são comuns no trato gastro intestinal de bovinos (Mao et al., 2015), em cáries bucais e em casos de doença periodontal (Holdeman et al., 1980; Board, 2015).

O gênero denominado *p-75-a5* não é bem elucidado. Tem sido observado em suínos a sua presença na fase pré-desmame (Wang et al., 2016), em fezes cecais de aves silvestres (Ushida et al., 2015). Um trabalho recente revelou o aumento da abundância relativa de *p-75-a5* em grupos tratados com oxido de zinco e antimicrobianos (Yu et al., 2017), no qual foi demonstrada a presença do micro-organismo em situação de estresse populacional.

Para animais negativos, foram significativamente abundantes os gêneros *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Fibrobacter*, *Rummeliibacillus* e *Streptococcus*. As Bifidobactérias e certas espécies de *Streptococcus* possuem função probiótica conhecida, foram identificadas como um fator de resistência natural contra microrganismos potencialmente patogênicos em seres humanos e estão associadas a susceptibilidade reduzida a patógenos entéricos e doenças intestinais (Homma 1988; Ouwehand et al., 2003; Correa et al., 2005). O tratamento com uma fórmula probiótica comercial contendo *Bifidobacterium lactis* e *Streptococcus thermophilus* reduziu a frequência de diarreia associada ao uso de antimicrobiano em lactentes (Correa et al., 2005). Dessa forma esse microorganismo pode funcionar como um fator protetivo para os suínos juntamente com as espécies de *Bifidobacterium*.

Em relação à associação com doenças entéricas nos suínos, animais desafiados por *Lawsonia intracellularis* tem sido observada uma diminuição dos *Streptococos* (Borewicz et al., 2015).

As Bifidobactérias são utilizadas como compostos probióticos e são amplamente estudadas. Esse gênero desempenha uma importante barreira contra a colonização patogênica do intestino, além de produzirem substâncias antimicrobianas ativas contra microrganismos virulentos (Gibson & Wang, 1994; Lievin et al., 2000; Gopal et al., 2001). No caso da disenteria suína, a utilização de uma dieta rica em frutano preveniu o aparecimento de sinais clínicos associada a um aumento de *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* e *Megasphaera elsdenii* (Mølbak et al., 2007).

Os demais gêneros abundantes em animais saudáveis (*Coprococcus*, *Dialister*, *Fibrobacter* e *Rummeliibacillus*) são pobremente relatados. *Rummeliibacillus* é uma bactéria próxima ao gênero *Bacillus*, gram-positiva, móvel e estritamente aeróbica (Vaishampayan et al., 2009). *Coprococcus* são Gram positivas, anaeróbicas e isoladas de fezes humanas saudáveis (Moore & Holdeman, 1974). *Dialister* são obrigatoriamente anaeróbicas ou microaerófilas. São encontradas na cavidade oral dos seres humanos saudáveis e em infecções bucais, hemoculturas, abscessos no cérebro, nasofaringe e boca (Wade, 2015). *Fibrobacter* é um microrganismos anaeróbico, móvel e todos os isolados até agora foram obtidos a partir do trato gastrointestinal (Spain, 2015).

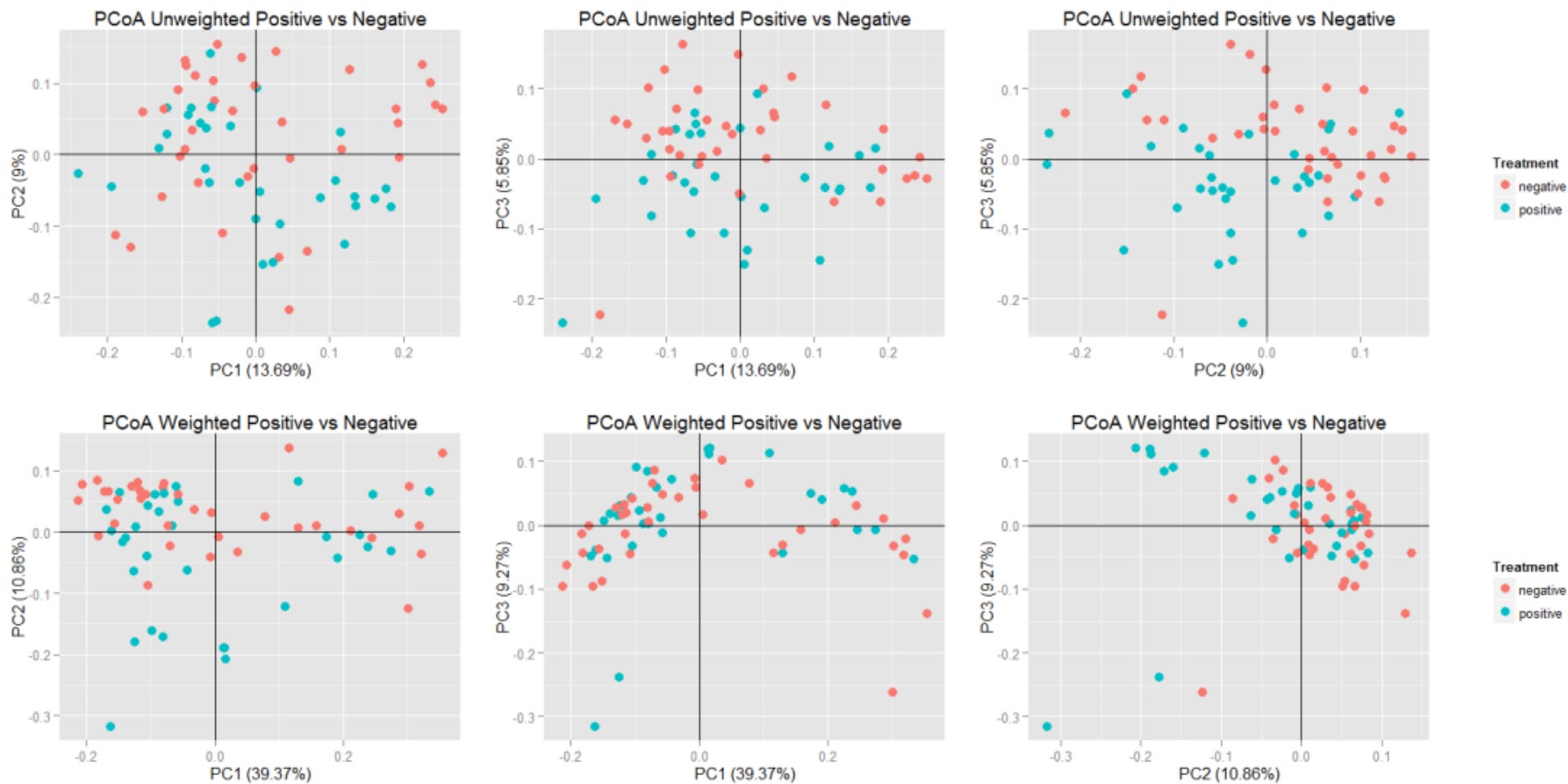


Figura 3. Análise de coordenadas principais. As cores correspondem os grupos feita por Unifrac das comunidades microbianas associadas nas fezes. Uma matriz de distância de diversidade beta foi calculada para gerar o gráfico de diversidade de amostras de microbiota de suíno nos grupos positivo e negativo.

Todos os microrganismos significativamente aumentados nos animais negativos provavelmente desempenham um papel importante para o equilíbrio das populações microbianas, dificultando a colonização de espécies patogênicas e oportunistas. A microbiota comensal confere resistência contra infecção oportunista, em parte, através da concorrência de nicho. Ao competir por locais de colonização e absorção de nutrientes, são capazes de limitar expansão de patógenos nas superfícies epiteliais do hospedeiro (Reid et al., 2001).

Animais positivos para DS tiveram uma diminuição de *Brachyspira* les, contradizendo os demais resultados encontrados na literatura (Costa et al., 2014; Burrough et al., 2017). Uma explicação dada a este achado provém da metodologia utilizada, direcionada para uma região hipervariável do gene 16S rRNA. Apesar de possuir regiões hipervariáveis que permitem a diferenciação entre os grupos microbianos, há limitações que inibem o acesso a determinados grupos.

Existe um método recente para acesso a população de Espiroquetas utilizando como alvo o gene NOX, que tem ajudado a entender a interação entre as múltiplas espécies de *Brachyspira* patogênicas e não patogênicas e sua relação com a patogênese na disenteria suína, funcionando como um complemento para utilização do gene 16S rRNA utilizado neste trabalho (Jonhson et al., 2018)

Em trabalhos futuros seria importante a comparação dos resultados obtidos a campo com os resultados em ambiente controlado, para melhor entendimento do comportamento do perfil microbiano nos casos de disenteria suína.

## 10.6 CONCLUSÃO

Foi observada uma diferença significativa na composição da microbiota a nível de gênero nos suínos positivos em relação aos animais saudáveis avaliados a campo com maior percentual de *Anaerovorax*, *Mogibacterium* e p-75-a5 nos animais positivos. Nos animais saudáveis foi observado um percentual elevado dos gêneros *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Fibrobacter*, *Rummeliibacillus* e *Streptococcus*, levando a concluir que a disenteria suína causa interferência na microbiota, que leva ao desenvolvimento da doença e demonstra um perfil, em nível de gênero, de espécies comumente encontradas. Estudos comparando suínos, de forma experimental ou a campo, são um caminho para melhor entendimento dos perfis de microbiota associados à susceptibilidade dos animais.

## 10.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACKHED, F., LEY, R. E., SONNENBURG, J. L. et al. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920.
- BOARD, T. E. (2015). Nakazawa, Sato, Poco, Hashimura, Ideka, Kalfas, Sundqvist and Hoshino 2000, 686.
- BOKULICH, N. A., BAMFORTH, C. W., MILLS, D. A. (2012). Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS ONE*, 7(4).
- BOKULICH, N. A., SUBRAMANIAN, S., FAITH, J. J., et al., (2013). NIH Public Access, 10(1), 57–59.
- BOREWICZ, K. A., KIM, H. B., SINGER, R. S. et al., (2015). Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PloS one*, 10(10), e0139106.
- BURROUGH, E. R., ARRUDA, B. L., PLUMMER, P. J. (2017). Comparison of the Luminal and Mucosa-Associated Microbiota in the Colon of Pigs with and without Swine Dysentery. *Front. Vet. Sci.*, 4, 139.
- CAPORASO, J. G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J. et al., (2010). correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group*, 7(5), 335–336.



- CHEN, J., BITTINGER, K., CHARLSON, E. S., et al., (2012). Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*, 28(16), 2106–2113.
- CHABAN, B., LINKS, M. G., HILL, J. E. (2012). A Molecular Enrichment Strategy Based on cpn60 for Detection of Epsilon-Proteobacteria in the Dog Fecal Microbiome. *Microb Ecol*, 63(2), 348–357.
- CHANG, J. Y., ANTONOPOULOS, D. A., KALRA, A., et al., (2008). Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile*—associated diarrhea. *J Infect Dis*. 197(3), 435-438.
- CODLING, C., O'MAHONY, L., SHANAHAN, F et al., (2010). A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 55, 392–397.
- CORRÊA, N.B.O., PÉRET FILHO, L.A., PENNA, F.J., et al., 2005. A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J. Clin. Gastroenterol.* 39, 385–389.
- COSTA, M.O.; CHABAN, B.; HARDING, J.C.; HILL, J.E. Characterization of the fecal microbiota of pigs before and after inoculation with “*Brachyspira hamptonii*”. *PLoS One*,9(8): e106399, 2014.
- EDGAR, R. C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Meth.*, 10(10), 996–998.
- EDGAR, R. C. (2017). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *bioRxiv*, 192211.
- FRANK, D. N., AMAND, A. L. S., FELDMAN, R. A., et al., (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13780-13785.
- GOPAL, P.K., PRASAD, J., SMART, J. and Gill, H.S. (2001) In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 67, 207–216
- GIBSON, G. R., (1999) Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr.* 129, 1438S–1441S
- GUEDES, R.M.C (2005). Diarreia em suínos de recria e terminação principais enfermidades. *Suíno Cia.* 11:11-18.
- HARRIS, D.L., ALEXANDER, T.J.L., WHIPP, S.C., et al. (1978) Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 468–471.
- HAMPSON, D.J. (2012) *Brachyspira* 1 colitis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; et al., eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; p.680-696.
- HOLDEMAN, L.V., E.P. CATO, J.A. BURMEISTER et al.,. (1980). Descriptions of *Eubacterium timidum* sp. nov., *Eubacterium brachy* sp. nov. and *Eubacterium nodatum* sp. nov., isolated from human periodontitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 163–169.
- HOMMA, N. (1988) Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobacteria Microfl.* 7, 35–43.
- ISAACSON, R. & KIM, H. B. (2012). The intestinal microbiome of the pig. *Anim Health Res Rev.*, 13(01), 100-109.
- JOHNSON, L.A., FERNANDO, C., HARDING, J.C.S. et al. (2018). Characterization of *Brachyspira* communities from clinical cases of swine mucohaemorrhagic diarrhea through deep sequencing of the NADH oxidase (nox) gene. *Vet. Microbiol.* 214, 81–88.
- LA, T., PHILLIPS, N.D., HAMPSON, D.J. (2003) Development of a Duplex PCR Assay for Detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in Pig Feces. *J. Clin. Microbiol.*,41, 7, 3372–3375.
- LESER, T. D., LINDECORONA, R. H., JENSEN, T. K., et al.,( 2000) Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl Environ Microbiol.*, 66(8), 3290-3296.
- LESER, T. D., MØLLER, K., JENSEN, T. K., et al. (1997). Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly -haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol Cell Probes* , 11, 363-372.

- LEY, R. E., HAMADY, M., LOZUPONE, C. et al. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), 1647-1651.
- LIEVIN, V., PEIFFER, I., HUDAULT, S. et al., (2000) Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47, 646–652.
- LIU, S., ZHAO, L., ZHAI, Z et al., (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection induced the unbalance of gut microbiota in piglets. *Curr Microbiol.*, 71(6), 643-649.
- MAO, S., ZHANG, M., LIU, J. et al., (2015). Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: Membership and potential function. *Sci. Rep* 5(November), 1–14.
- MCDONALD, D., CLEMENTE, J. C., KUCZYNSKI, J., et al., (2012). The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: How I learned to stop worrying and love the ome-ome. *GigaScience*, 464(1), 1–6.
- MEYER R.C., SIMON J., BYERLY C.S. (1975) The etiology of swine dysentery. III. The role of selected gram-negative obligate anaerobes. *Vet. Pathol.* 12: 46–54.
- MEYER, R.C., SIMON, J., BYERLY, C.S. (1974) 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: 527–534.
- MCKENNA, P., HOFFMANN, C., MINKAH, N., et al., (2008). The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathog.*, 4(2), e20.
- PÉREZ-COBAS, A. E., ARTACHO, A., OTT, S. J., et al., (2014). Structural and functional changes in the gut microbiota associated to *Clostridium difficile* infection. *Front Microbiol.* , 5, 335.
- MØLBÅK, L., THOMSEN, L.E., JENSEN, T.K., et al. (2007). 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, 1853–1867.
- MOORE, W. E. AND HOLDEMAN, L. V. 1974. Human faecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* 27: 961–979
- OUWEHAND, A. C., BIANCHI SALVADORI, B., FONDE´N, R. et al. (2003). Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 380, 4–19
- PYLRO, V. S., ROESCH, L. F. W., MORAIS, D. et al., (2014). Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods*, 107, 30-37.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011), R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. Available online at <http://www.R-project.org/>.
- REID, G., BRUCE, A. W., FRASER, N., et al., (2001). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *Pathog Dis* , 30(1), 49-52.
- RIGSBEE, L., AGANS, R., SHANKAR, V., et al., (2012). Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* , 107(11), 1740–1751.
- SATO, J.P.H., (2017). Diversidade genética e virulência de amostras de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos assintomáticos e com doença clínica. Universidade Federal de Minas Gerais, 70.
- SCHINK, B. (2015). Matthies, Evers, Ludwig and Schink 2000, 1593, 4–6.
- SCHLOSS, P.D., & HANDELSMAN, J. (2004) Status of the microbial census. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 68(4): 686-691.
- SPAIN, A. M., FORSBERG, C. W., KRUMHOLZ, L. R. (2015). *Fibrobacter. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.*,
- TORSVIK, V., SALTE, K, SØRHEIM, R. et al. (1990) Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, v. 56, p. 776-781.
- TORSVIK, V., ØVREÅS, L., THINGSTAD, T.F. (2002) Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*. 296; 5570, 1064-1066.

- USHIDA, K., SEGAWA, T., TSUCHIDA, S. et al. (2015). Cecal bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans. *Journal of J Vet Med Sci.* 15-0313.
- VAISHAMPAYAN, P., MIYASHITA, M., OHNISHI, A., et al.,. (2009). Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura et al. 2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 59(5), 1094-1099.
- WADE, W. G. (2015). *Dialister*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*
- WANG, J., HAN, M., ZHANG, G., et al, (2016). The Signal Pathway of Antibiotic Alternatives on Intestinal Microbiota and Immune Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 17, 785–796.
- WHIPP, S.C., ROBINSON, I.M., HARRIS, D.L., et al. (1979) Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 26: 1042–1047.
- WHITMAN, W. B., COLEMAN, D.C., WIEBE, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6578–6583,.
- YOUNG, V. B., & SCHMIDT, T. M. (2004). Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. *J Clin Microbiol* 42(3), 1203-1206.
- YOUMANS BP, AJAMI NJ, JIANG ZD, et al. Characterization of the human gut microbiome during travelers' diarrhea. *Gut Microbes* (2015) 6:110–9.
- YU, T., ZHU, C., CHEN, S., et al. (2017). Dietary high zinc oxide modulates the microbiome of ileum and colon in weaned piglets. *Front. Microbiol.* 8, 1–12.
- ZHU, L., BAKER, S. S., GILL, C., et al.,. (2013). Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*, 57(2), 601-609.

## 11. Capítulo 2 – EFEITO DA COINFEÇÃO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS E *Brachyspira hyodysenteriae* SOBRE O QUADRO ANATOMOPATOLÓGICO E DIVERSIDADE MICROBIANA

### 11.1 RESUMO

Neste estudo foi avaliada a infecção experimental em suínos em coinfeção com *Brachyspira hyodysenteriae* associada a *Lawsonia intracellularis* com objetivo de avaliar quadro clínico, alterações anatomopatológicas, eliminação nas fezes e o microbioma intestinal comparando com a infecção individual. Foram utilizados 45 leitões de cinco semanas de idade separados randomicamente em quatro grupos: coinfeção *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* (CO), *B. hyodysenteriae* (BRA), *L. intracellularis* (LAW) e controle negativo (NEG) avaliados durante 21 dias. No 0 dpi CO e LAW foram inoculados com  $2,76 \times 10^6$  *L. intracellularis* / ml. Sete dias após a inoculação CO e BRA receberam  $5,31 \times 10^6$  *B. hyodysenteriae* / ml durante três dias. O escore de diarreia foi avaliado diariamente e foi realizada qPCR para *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*. Aos 21dpi os animais foram necropsiados e realizada a avaliação das lesões macroscópicas, isolamento bacteriano para *Brachyspira* sp, imuno-histoquímica para *L. intracellularis* e histopatologia. Utilizando o método "Fusion" pelo kit Ion Torrent 16S Metagenomics, foi realizado para os dias -5 e 21 o sequenciamento da região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. O QIIME foi usado para a geração de resultados de diversidade  $\alpha$  e  $\beta$ . Como resultados, os sinais clínicos e diarreia começaram em 12dpi afetando 11/12 animais e 14dpi 5/11 animais para CO e BRA respectivamente. Apenas 4 suínos do grupo LAW foi possível observar diarreia intermitente. As lesões foram mais graves, com diferença significativa para o grupo CO em todos os parâmetros avaliados no intestino grosso. Inflamação, necrose, hemorragia, hiperplasia de células caliciformes e total de lesões foram observadas significantes entre o CO quando comparado com o LAW. O grupo BRA diferiu apenas do CO quando comparados abscessos de criptas e hiperplasia de enterócitos. Marcação discreta a moderada foi observada em CO e LAW na imunohistoquímica. Houve isolamento de *B. hyodysenteriae* em CO = 11/12 e BRA = 5/11. Os animais CO e LAW começaram a eliminar *L. intracellularis* após 3dpi chegando ao final com todos os animais positivos. Para *B. hyodysenteriae* qPCR CO = 10/12 e BRA = 7/11 começando 3 dias após a inoculação com *B. hyodysenteriae*. Em relação ao microbioma fecal foi possível observar maior abundância relativa com diferença estatística em comparação com os demais grupos para os gêneros *Prevotella*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Butyrivimonas*, *Desulfovibrio*, *Fusobacterium* e *p75-a5* no grupo CO, maior abundância de *Clostridium* no grupo BRA. No grupo LAW, *Megasphaera* e *Dialister* foram estatisticamente significantes mais prevalentes *Odoribacter* para o grupo NEG. Mais trabalhos são essenciais para entender melhor os perfis de microbiota associados à susceptibilidade à doença. Este é o primeiro relato que caracteriza esse quadro de coinfeção experimental. Sinais clínicos, macroscópicos e microscópicos foram significativamente mais graves no grupo CO. No grupo LAW, observamos o quadro subclínico. Possivelmente, a infecção por *L. intracellularis* causou danos iniciais que auxiliam na colonização por *B. hyodysenteriae*. É importante mencionar o mecanismo imunossupressor já demonstrado em suínos com enteropatia proliferativa, com infiltração limitada de células inflamatórias durante o desenvolvimento de lesões com regulação negativa da resposta imune adaptativa. Esses fatores juntos foram importantes para explicar esses achados.

Palavras-chave: *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, inoculação experimental, microbioma.

## 11.2 INTRODUÇÃO

As doenças entéricas são comumente correlacionadas a um só microrganismo, no entanto a composição da microbiota tem um papel essencial na colonização do microrganismo principal e no estabelecimento da infecção (Varel, 1987; Radecki e Yokoyama 1991) uma vez que pH, temperatura e condições nutricionais são alterados dependendo da composição da microbiota presente (Varel, 1987; Jensen & Jorgensen, 1994).

Dentre as mais importantes enfermidades que cursam em diarreia nas fases finais do desenvolvimento dos suínos, podemos destacar a disenteria suína e a enterite proliferativa (Thomson, 2006; Zlotowski et al., 2008).

A disenteria suína (DS) é caracterizada por uma colite muco-hemorrágica grave tendo como agente primário *Brachyspira hyodysenteriae* (Taylor & Alexander, 1971). As lesões são restritas ao intestino grosso (Hughes et al., 1975), resultando em tifocolite mucohemorráica severa, com desidratação e morte em animais não tratados (Kinyon & Harris., 1979).

A enteropatia proliferativa suína (EPS) tem a *Lawsonia intracellularis* como agente causador, acometendo animais nas fases de recria e terminação (Smith & McOrist, 1997; Lawson & Gebhart, 2000), podendo apresentar três formas clínicas: aguda, crônica e subclínica (Lawson & Gebhart, 2000; Kroll et al., 2005). A forma crônica acomete animais jovens entre 6 e 20 semanas sendo observado anorexia, diarreia (Lawson & Gebhart, 2000). A forma aguda é caracterizada por enterite hemorrágica com morte súbita (Lawson & Gebhart, 2000) observada em animais mais velhos e fêmeas de reposição (Rowland & Lawson 1975; Kroll et al., 2005) A forma subclínica não é possível observar claramente quadro de diarreia (Collins & Barchia, 2014) com eliminação intermitente de *L. intracellularis* associado a um desenvolvimento retardado (Jacobson, et al., 2003).

As patogêneses das duas enfermidades são consideradas complexas e pouco elucidadas (Hampson, 2012; Vannucci & Gebhart, 2014). Sabe-se que a dieta e a microbiota possuem uma forte influência na ocorrência dos sinais clínicos (McOrist & Lawson, 1989; Durmic et al., 1998). Vários estudos demonstram os efeitos de diferentes dietas na colonização e a presença de microrganismos importantes para o estabelecimento de sinais clínicos (Meyer et al., 1975; Wipp et al., 1979; Molbak et al.; 2008). Dessa forma, ao manipular as condições ambientais do meio, há possibilidade de controlar determinadas populações.

Em alguns estudos foi observado que animais gnotobióticos inoculados experimentalmente com *B. hyodysenteriae* ou *L. intracellularis* não desenvolvem quadro clínico típico de disenteria suína e enteropatia proliferativa, respectivamente, demonstrando menor susceptibilidade à infecção desses dois agentes (Meyer et al., 1974a; Brandenburg et al, 1977; Kinyon et al., 1977; Whipp et al., 1979; McOrist et al., 1993, 1994).

Quanto a coinfeção de *L. intracellularis* e *B. hyodysenteriae*, são poucos os relatos a respeito da infecção mista desses dois agentes (Stege et al., 2001; Suh & Song, 2005; Phillips al., 2009; Reiner et al., 2011), no entanto tem sido observado um aumento de quadros de coinfeção na rotina diagnóstica. Esta interação pode estar relacionada à microbiota presente e ao microambiente gerado pela microbiota possibilitando assim, o desencadeamento das duas enfermidades associadas.

Dessa forma, faz-se necessária uma investigação apurada da microbiota presente em animais acometidos por essas duas enfermidades, isoladamente ou em associação. Gerando informações para compreensão dos fatores que permitem a colonização dos mesmos, além da determinação dos fatores predisponentes que permitem o aparecimento de sinais clínicos, abrindo assim caminho para futuros estudos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar os quadros de infecção, possível sinergismos e o perfil da microbiota fecal proveniente de animais inoculados por *Brachyspira hyodysenteriae* e *Lawsonia intracellularis* isoladamente associado à avaliação clínico e anatomopatológica.

## 11.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 11.3.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Esse estudo teve sua parte experimental aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA #157/2016). Foram utilizados quarenta e cinco leitões com quatro semanas de idade, provenientes de granja comercial, sem histórico de *Brachyspira* spp., *Lawsonia intracellularis* ou *Salmonella* sp. Os animais foram separados randomicamente em quatro grupos: controle negativo (NEG) 11 animais, coinfeção de *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* (CO) 12 animais, *B. hyodysenteriae* (BRA) 11 animais e *L. intracellularis* (LAW) 11 animais. Os animais foram alojados por 14 dias para ambientação e separação dos grupos em quatro baias com alimentação e água *ad libitum*. Durante todo período do experimento a ração era livre da adição de antimicrobianos ou compostos que podem interferir no resultado do experimento.

As atividades para cada grupo foram executadas por equipes diferentes com biossegurança máxima possível para evitar contaminação cruzada. Durante todo o estudo não foram utilizados tratamento terapêutico ou metafílico.

### 11.3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO

#### 11.3.2.1 *Lawsonia intracellularis*

Um isolado suíno de *L. intracellularis* (BRPHE01\_E5) obtido de um animal com enterite proliferativa hemorrágica foi cultivado em passagens múltiplas em cultura de células usando células McCoy, tipo fibroblastos murinos (ATCC CRL 1696), em meio de cultura (Dulbecco's modified Eagle's – JRH Lenxa, KS), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas por cinco dias em concentração de gases de 8% de O<sub>2</sub>, 8,8% de CO<sub>2</sub> e 83,2% N<sub>2</sub> à 37°C, como descrito por Guedes & Gebhart (2003). Foram utilizadas passagens entre 12 e 23 “*in vitro*”. Para preparação do inóculo, as bactérias foram suspensas em solução de sacarose fosfato glutamato (SPG) com 10% de Soro fetal Bovino (SFB). No dia zero do experimento os animais do grupo LAW e CO foram inoculados, por via intragástrica utilizando sonda intragástrica, com 50 mL de cultura pura de *L. intracellularis* contendo em média 2,76x10<sup>6</sup> bactéria/mL. Para o grupo controle, os animais receberam solução de sacarose fosfato glutamato (SPG) pela mesma via.

#### 11.3.2.2 *Brachyspira hyodysenteriae*

A cepa de *B. hyodysenteriae* utilizada como inóculo foi isolada de um suíno com disenteria suína grave em 2013 no estado de Minas Gerais cultivado em Agar 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), sob atmosfera aneróbica (N<sub>2</sub> 80%, CO<sub>2</sub> 10% e H<sub>2</sub> 10%), à 37°C por três dias. Após o crescimento em meio sólido, as placas de ágar foram lavadas com PBS estéril. O lavado da placa foi incubado em caldo de crescimento tripticase de soja (TSB), enriquecido com 0,5% glucose, 0,2% NaHCO<sub>3</sub>, 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 21 horas, à 37°C em estufa shaker, seguido da inoculação dos animais.

Os leitões do grupo BRA e CO foram inoculados por três dias consecutivos nos dias 7, 8 e 9, via intra-gástrica, com 50 ml do inóculo com concentração média de 5,31x 10<sup>6</sup> bactérias/ml como descrito por Jacobson et al. (2004) e Rubin et al. (2013). Os grupos NEG e LAW receberam 50 ml de caldo TBS estéril.

### 11.3.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Após a inoculação, os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento de sinais clínicos, principalmente a consistência fecal, baseado no seguinte escore: 0 = normal, 1 =

consistência semi-sólida, 2 = líquida e 3 = severamente líquido aquoso, com adição de 0,5 para a presença de muco perceptível e/ou sangue (Rubin et al., 2013). As amostras de fezes foram coletadas nos dias -5, 3, 6, 10, 12, 15, 18, 21 e testadas por qPCR para *B. hyosysenteriae* e *Lawsonia intracellularis* e realizado isolamento bacteriano para *B. hyodysenteriae*, como descrito anteriormente.

### 11.3.5 PCR QUANTITATIVO

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.

Na PCR quantitativa para *B. hyodysenteriae* foram utilizados 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') como alvo o gene *Nox* de acordo com limite de detecção  $10^3$ – $10^9$  cópias por gramas de fezes com Rubin et al. (2013). Para a curva padrão foi utilizada uma grama de fezes negativa, adicionando a uma quantidade conhecida de *B. hyodysenteriae*. A reação foi realizada em volume final de 25  $\mu$ 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  $\mu$ L de DNA. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e amplificadas no termociclador ViiATM 7 Real-Time PCR System (appliedbiosystems®), 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 QuantStudio™ RealTime PCR v1.2. (Sato, 2017).

Na PCR quantitativa para *L. intracellularis* foram utilizados os primers bcL.intra114f (5'CACTTGCAAACAATAAACTTGGTCTTC-3') e bcL.intra-263r (5'CATTTCATATTTGTA-CTTGTCCCTGCA-3') associada a sonda intra201p (TCCTTGATCAATTTGTTGTGGATT-GTATTCAAGG) que tem como alvo o gene amonia aspartato lyase (*aspA*) com limite de detecção entre  $10^4$ - $10^{11}$ . Uma grama de fezes negativas, foi acrescentada a um número conhecido para determinar a curva padrão. A reação foi realizada em volume final de 20  $\mu$ L, composta por primer 20x e sondas para o respectivo sistema TaqMan com uma concentração final de 400 nM para cada primer, 80 nM para a sonda TaqMan e PCR Mastermix (TaqMan Universal PCR Mastermix; Applied Biosystems) de acordo com as indicações do fabricante. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e amplificadas no termociclador ViiATM 7 Real-Time PCR System (appliedbiosystems®), 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 QuantStudio™ RealTime PCR v1.2. (Sampieri et al., 2013).

### 11.3.6 PATOLOGIA

A eutanásia e necropsia dos suínos foram realizadas ao final da fase experimental, 21 dias após inoculação do primeiro grupo com *L. intracellularis*. Animais clinicamente debilitados, segundo os critérios do CEUA, foram eutanasiados e necropsiados ao longo do experimento. Na necropsia, lesões macroscópicas no intestino foram avaliadas e fragmentos de intestino delgado, intestino grosso e linfonodos mesentéricos foram coletados e fixados em formol 10% para exame histopatológico. As amostras, incluindo fezes do reto, raspados da mucosa do íleo, ceco e cólon foram coletadas para detecção dos demais agentes nas fezes.

### 11.3.7 ISOLAMENTO BACTERIANO

Para isolamento de *Brachyspira* sp. as amostras de fezes e intestino grosso foram semeadas através de esfregaço de swab em placas com meio seletivo em ágar TSA Tryptic Soy Agar (Tryptic Soy Agar, DIFCO, cat n°211043) suplementado com 5% sangue ovino, 6,25 mg/ $\mu$ l rinfampicina (Rifampicin, Sigma-Aldrich, cat n° R3501), 800 mg/ $\mu$ l de espectinomicina (Spectinomycin, Sigma-Aldrich, , cat n° S9007) 25 mg/ $\mu$ l de vancomicina (Vancomycin, Sigma-Aldrich, cat n° V2002), 25 mg/ $\mu$ l de colistina (Colistin, Sigma-Aldrich, cat n° C1511) (Leser et

al., 1997), e incubadas, por no mínimo três dias, a 42°C, em jarras com atmosfera anaeróbia. Essa anaerobiose foi gerada com auxílio de bomba de vácuo e preenchimento com a mistura dos gases N<sub>2</sub>(80%), CO<sub>2</sub>(10%) e H<sub>2</sub>(10%). O ambiente anaeróbio foi confirmado por fita indicadora de anaerobiose (Oxoid Anaerobic Indicator, Thermo Fisher, cat n° BR0055). Para obtenção de colônias puras foram realizadas várias passagens com a técnica de esgotamento em placas com meio seletivo, e avaliação das mesmas sob microscopia de contraste de fase, para observar a presença de espiroquetas e possíveis contaminantes. Os isolados foram acondicionados em freezes a -80°C.

Para diagnóstico diferencial ao final do experimento, raspado de mucosa de intestino delgado foram semeadas em ágar sangue e MacConkey para avaliação de crescimento de *Escherichia coli* enterotoxigênica e raspado de mucosa de intestino grosso foi semeado em caldo Rappaport e ágar Hectoein para *Salmonella* sp.

### **11.3.8 HISTOPATOLOGIA**

Fragmentos de todos os segmentos do intestino foram processados e corados com hematoxilina e eosina (Luna, 1968) e avaliados para a presença de lesões relacionadas ou não com *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* que podem ter levado a ocorrência de diarreia. Nas secções do ceco e cólon, as lesões foram avaliadas de acordo com a intensidade e distribuição de lesões como necrose superficial, hemorragia, hiperplasia de enterócitos, hiperplasia de células caliciformes (IG), abscessos de criptas e infiltrado de neutrófilos na lâmina própria. Todos os parâmetros foram classificados individualmente e classificados da seguinte forma: 0 = ausente, 1=discreto, 2 = moderado, e 3 acentuado. O escore final foi determinado pelo somatório dos parâmetros avaliados. Todas as secções histológicas foram avaliadas por dois patologistas, sem conhecimento dos grupos experimentais, e a média destas duas contagens foi utilizada em todas as análises.

### **11.3.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Fragmentos de dois centímetros de jejuno, íleo, ceco e cólon espiral foram coletados e fixados em formol tamponado 10%. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de imunohistoquímica usando Streptavidina marcada e anticorpo policlonal específico para *L. intracellularis* (Guedes e Gebhart, 2003a). A marcação pela IHQ foi graduada em escala de zero a três, sendo zero nenhuma marcação para *L. intracellularis*, grau 1 foco isolado de marcação antigênica, grau 2 múltiplos focos de marcação antigênica (cerca de 25% das criptas), grau 3 quando grande parte da mucosa apresenta marcação positiva (26 a 75% das criptas) e grau 4 quase a totalidade da mucosa intestinal apresentando marcação (acima de 80% das criptas).

## **11.4 MICROBIOMA INTESTINAL**

### **11.4.1 AMOSTRAS**

Foram utilizadas fezes retais coletadas de todos os animais nos dias -5 e 21 para avaliação do microbioma fecal. Até a data do processamento as amostras foram armazenadas à -80°C.

### **11.4.2 SEQUENCIAMENTO 16S**

O DNA total foi extraído a partir de 200 mg de amostras fecais utilizando um kit comercial (DNA QIAmp de fezes Mini Kit, Qiagen Inc., Toronto, Ontário), seguindo as recomendações do kit. Após extraído, o DNA foi quantificado utilizando Fluorômetro Qubit®2.0 e Qubit® ds DNA Hs Assay Kit (Life Technologies).

Para sequenciamento genômico o método “Fusion” desenvolvido para análise do microbioma utilizando o sequenciamento de nova geração pelo Ion Torrent 16S Metagenomics kit que amplifica a região hipervariável V4 do gene 16S rRNA foi utilizado.



Os iniciadores foram customizados com 1 primer reverso e 96 primers diretos com barcodes como descrito no anexo (1). A região V4 hipervariável do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando os iniciadores de fusão (Bokulich, et al., 2012; Bokulich, et al., 2013). Os iniciadores de fusão continham a sequência com tags para os “barcodes” a sequência do primer propriamente dito e um adaptador para ligação (anexo 1).

Para reação de PCR inicial foi utilizado 1x Platinum® PCR SuperMix High Fidelity; 5 µM de cada iniciador de fusão; com DNA genômico entre 20-50 ng e água deionizada estéril. Os ciclos utilizados foram 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 ° C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 30 segundos, anelamento à 58 ° C por 30 segundos e extensão a 68 ° C durante 1 min / kb.

Os produtos de PCR foram confirmados utilizando QiAxcel Advanced System (Qiagen) e purificados com Agencourt® AMPure XP Reagent (Beckman Coulter) e posteriormente quantificado usando Fluorômetro Qubit®2.0 e Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) e reajustadas para concentração final de 26 pM.

A PCR de emulsão foi realizada fazendo a quebra de emulsão e o enriquecimento utilizando o kit OTON OT-Q™ Ion PGM™ (# A29900) de acordo com as instruções do fabricante como descrito brevemente. Uma concentração de uma cópia molde / Partícula Esfera de Íon (ISP) compõe a emulsão de PCR utilizando OT2 (Life Technologies). Em seguida, os ISPs foram recuperados e as contas Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Life Technologies) foram usadas para enriquecer para ISPs positivos para modelos. A amostra foi preparada para seqüenciamento usando o Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (# A30044). Cada amostra composta foi carregada em um chip Ion 318 e seqüenciada no sistema PGM (Personal Genome Machine) para 850 fluxos.

Para determinar a qualidade, foram utilizadas duas comunidades microbianas 16S sintéticas (Mock Communities) de espécies com genomas conhecidos. A primeira comunidade, o HMD-782D contém 20 estirpes bacterianas com 100.000 cópias por organismo por µL. O segundo é HMD783D, que contém 20 cepas bacterianas variando entre 1.000 a 1.000.000 de cópias por organismo por µL. Ambos os reagentes foram obtidos através de BEI Resources, NIAID, NIH como parte do Projeto Microbioma Humano: DNA Genômico da Microbial Mock Community B (Even, Low Concentration), v5.1L, para 16S RNA Gene Sequencing, HM-782D e Genomic DNA de Microbial Mock Community B (Staggered, Low Concentration), v5.2L, para 16S rRNA Gene Sequencing, HM-783D.

### 11.4.3 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

#### 11.4.3.1 PIPELINE DE CLASSIFICAÇÃO METAGENÔMICA

Com as sequências brutas as amostras foram trabalhadas conforme o pipeline de classificação de OTU proveniente no pipeline de análise de dados do Projeto de microbioma brasileiro (Pylro et al., 2014).

Na primeira etapa, os dados brutos foram filtrados utilizando um script próprio (disponível em: [https://github.com/aquacen/fast\\_sample](https://github.com/aquacen/fast_sample)) com os parâmetros: "-n 100" (para todas as reads), "-s 160" (inclua apenas reads >= 160 pb), "-b 310" (para trinar as reads >= 310 pb), "-l 0" (no left clip) e "-q 20" (para trinar as reads 3' com qualidade no Phred de <20). A próxima etapa consistiu na utilização do software Uparse (Edgar, 2013) foi usado para rotular as reads e Usearch (versão de uso 10.0.240) (Edgar, 2017) para filtrar por qualidade (-fastq\_filter -fastq\_maxee 0.8), retirar reads replicadas (-fastx\_uniques -sizeout), organizar por tamanho (-sortbysize -minsize 2), organizar por grupos de OTU (-cluster\_otus), montar mapa de dados brutos sobre OTUS (-usearch\_global -strand plus -id 0.97). Para gerar a lista de OTUS e converter os arquivos em uma tabela de OTUs foi utilizado o Uparse e a primeira versão do software QIIME (Caporaso et al., 2010) foi usada para executar e atribuir taxonomia (--similarity 0.7), alinhar as sequências OTU e construir a árvore filogenética. Finalmente, a versão de software Biom 2.1.5 (McDonald et al., 2012) foi usada para: converter o Biom table json, adicionar metadados de taxonomia no QIIME (--observation-header OTUID, taxonomy, confidence --sc-

separated taxonomy --float-fields confidence) e organizar tabela de OTU. O programa Usearch na versão 10.0.240 inclui filtros de quimera no passo de formação dos clusters de OTU (-cluster\_otus). Os dois “barcodes” com comunidades “Mock” foram avaliados usando os mesmos passos.

#### 11.4.3.2 ANÁLISES DE DIVERSIDADE ALPHA E BETA

O QIIME foi utilizado para: filtrar as amostras provenientes da tabela de OTU (-n 1000); foi feita uma rarefação única (-d 1000) para avaliar diversidade beta; criar um peso (--metrics unweighted\_unifrac) e peso (- metrics weighted\_unifrac) diversidade beta; e feito rarefação múltipla (-m 10 -x 50000 -s 2000) para usar como diversidade alfa. O pacote ggplot2 do software R foi usado para gerar lotes de  $\alpha$  e  $\beta$  diversidade com os resultados do QIIME, e o mapa de calor e as comparações estatísticas da abundância familiar. O método de comparação utilizado foi Pairwise Wilcox Test com correção Bonferroni. Somente famílias com representante  $\geq 1\%$  em quase um barcode foram incluídas na análise (Core Team, 2013).

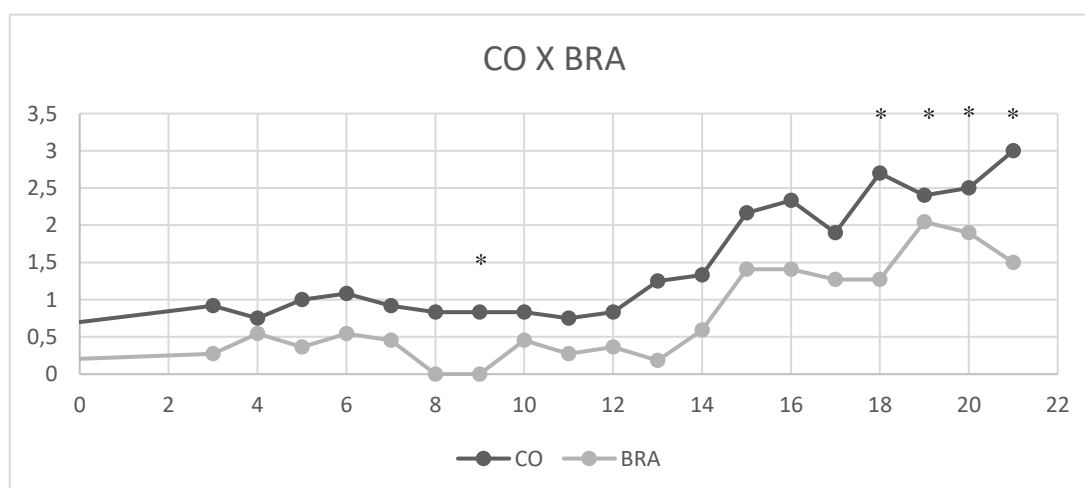
#### 11.4.3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feito o teste de Mann-Whitney para comparar o escore de diarreia, resultados de PCR em tempo real, lesões histopatológicas, e imuno-histoquímica. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os resultados de isolamento bacteriano. Foram considerados significativos resultados com  $P \leq 0,05$ .

### 11.5 RESULTADOS

#### 11.5.1 SINAIS CLÍNICOS

Anterior ao início do experimento, todos os animais foram negativos para *L. intracellularis* e *B. hyodysenteriae* em amostras de fezes na PCR em tempo real. Os animais do grupo CO apresentaram diarreia aquosa com escore  $\geq 3$  pela primeira vez no dia 12 pós infecção, sendo que dois animais apresentaram diarreia por dois dias entre 4 e 6 dpi, no entanto, a diarreia cessou no segundo dia, um dos animais com diarreia no dia 6dpi foi positivo na PCR para *L. intracellularis*. Ao final do experimento, nove animais desse grupo haviam apresentado diarreia. No Grupo BRA, os animais apresentaram diarreia a partir do dia 14, acometendo no total cinco animais. O grupo LAW quatro animais apresentaram diarreia, no entanto apenas dois animais tiveram quadro clínico mais constante, os demais apresentaram diarreia por dois dias. No grupo NEG dois animais apresentaram escore 3 de diarreia, no entanto 1 animal apresentou esse quadro por 1 dia e outro por dois dias. Comparando o escore fecal, foram observadas diferenças estatísticas em relação ao controle negativo principalmente no grupo CO em mais dias de análise como demonstrado na Figura 1e Anexo 3.1.



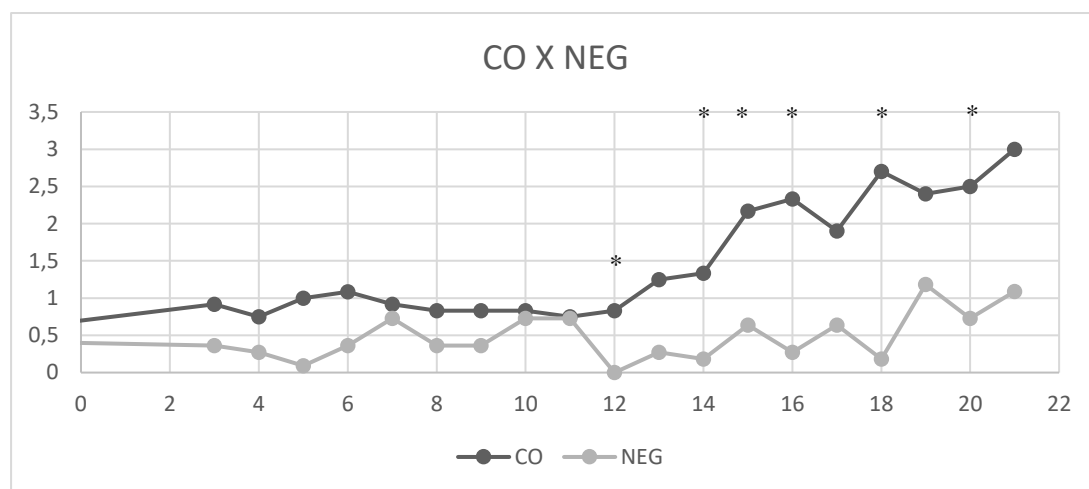
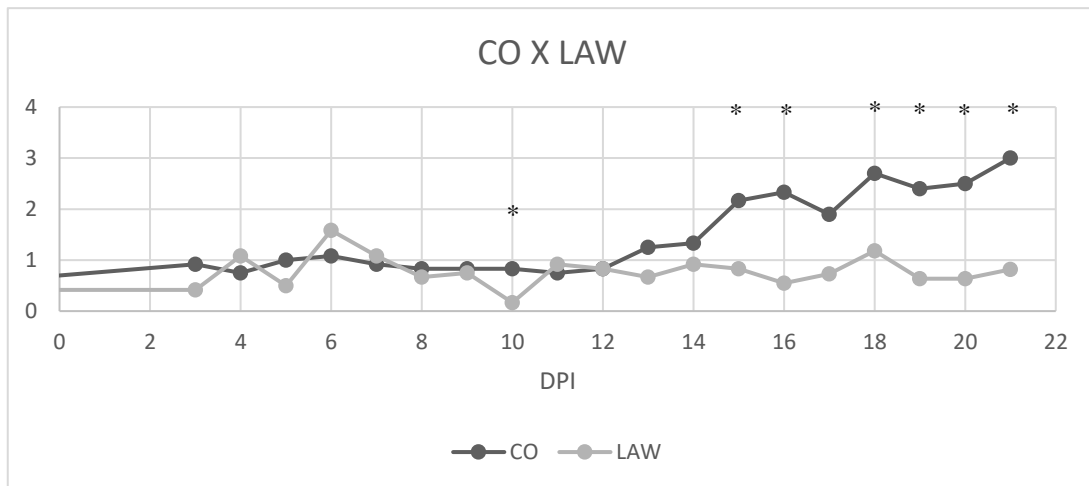


Figura 1. Média de escore fecal entre os dias 0 a 21 dpi nos grupos coinfeção (CO), *B. hyodysenteriae* (BRA) *L. intracellularis* (LAW) Negativo (NEG) (\*) p valor  $\leq 0,05$ .

Devido às condições clínicas, dois animais do grupo CO (32684 e 32586) e 1 animal do grupo BRA (18) vieram à óbito. Esses animais apresentavam sinais clínicos graves de disenteria suína. Na necropsia foi observada colite catarral fibrino necrótica grave associada a edema de mesocólon e hiperemia na serosa do intestino grosso, nesse caso os animais morreram em decorrência da complicação do quadro de disenteria grave. Um animal do grupo LAW (4527) foi eutanasiado antes do término do período de avaliação, o animal apresentava escore baixo e apático, no entanto não foram observadas lesões macroscópicas. Na histopatologia foi observada hiperplasia de enterócitos e marcação positiva na imuno-histoquímica para *L. intracellularis*.

## 11.5.2 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

### 11.5.2.1 LESÕES MACROSCÓPICAS

As lesões macroscópicas no trato intestinal foram observadas de forma expressiva no intestino grosso nos animais dos grupos inoculados por *Brachyspira hyodysenteriae* (CO) e (BRA). No grupo CO foram observadas lesões no intestino grosso que variaram de colite muco-hemorrágica difusa moderada à colite catarral fibrinonecrohemorrágica difusa grave. No grupo BRA foram observadas lesões em 4 animais que variavam de colite muco-hemorrágica moderada multifocal à colite fibrino hemorrágica difusa acentuada. No grupo LAW apenas 2 animais

apresentavam hiperemia moderada na serosa do íleo. No grupo NEG um animal apresentou hiperemia moderada na serosa do cólon. Na Figura 2 s lesões mais importantes foram apresentadas.

### 11.5.2.2 LESÕES MICROSCÓPICAS

As diferenças estatísticas encontradas na microscopia de cada grupo estão descritas na tabela 1. e demonstradas na figura 3. No intestino delgado foram observadas lesões discretas com diferença significativa dos animais do grupo LAW em relação aos animais controle negativos para abscessos de cripta e na soma total de escores.

No intestino grosso as lesões foram mais graves com diferença significativa do grupo CO em todos os parâmetros testados em relação ao grupo NEG. Foram observadas diferença significativa do grupo CO em relação ao LAW para inflamação, necrose, hemorragia, hiperplasia de células caliciformes e soma total de lesões. O grupo BRA diferiu apenas do grupo CO em relação a abscessos de cripta e hiperplasia de enteócitos. Quando comparado com controle negativo o grupo LAW não diferiu significativamente em nenhum dos parâmetros. Na análise das seções de intestino delgado e linfonodos mesentéricos em todos os grupos não foram observadas alterações significativas. Os animais que apresentaram lesões importantes estão representados na Figura 5.

Tabela 1. Escore histopatológico com o p valores encontrados nas comparações por grupo, os números em cinza representam os grupos com diferença estatística  $p \leq 0,05$

	Intestino Grosso						
	Inflamação	Necrose	Hemorragia	Hiperplasia de células caliciformes	Abcessos de Cripta	Hipeplasia de Enterócitos	Total
CO X BRA	0.55	0.75	0.3	0.8	0.009	0.02	0.055
CO X LAW	0.000	0.000	0.004	0.000	0.7	0.8	0.000
CO X NEG	0.000	0.000	0.001	0.000	0.032	0.021	0.000
BRA X LAW	0.027	0.003	0.031	0.049	0.3	0.2	0.03
BRA X NEG	0.017	0.007	0.003	0.068	0.064	0.2	0.001
LAW X NEG	0.5	0.7	0.3	0.8	0.009	0.02	0.1
	Intestino Delgado						
Grupos	Inflamação	Necrose	Hemorragia	Hiperplasia de células caliciformes	Abcessos de Cripta	Hipeplasia de Enterócitos	Total
CO X BRA	0.037	0.1	0.8	0.3	0.3	0.4	0.1
CO X LAW	0.8	0.8	0.3	0.1	0.3	0.5	0.8
CO X NEG	0.2	0.1	0.4	0.031	0.15	0.52	0.056
BRA X LAW	0.033	0.1	0.2	0.5	0.06	0.1	0.057
BRA X NEG	0.2	1	0.5	0.1	0.6	0.7	0.4
LAW X NEG	0.2	0.1	0.07	0.3	0.031	0.054	0.009

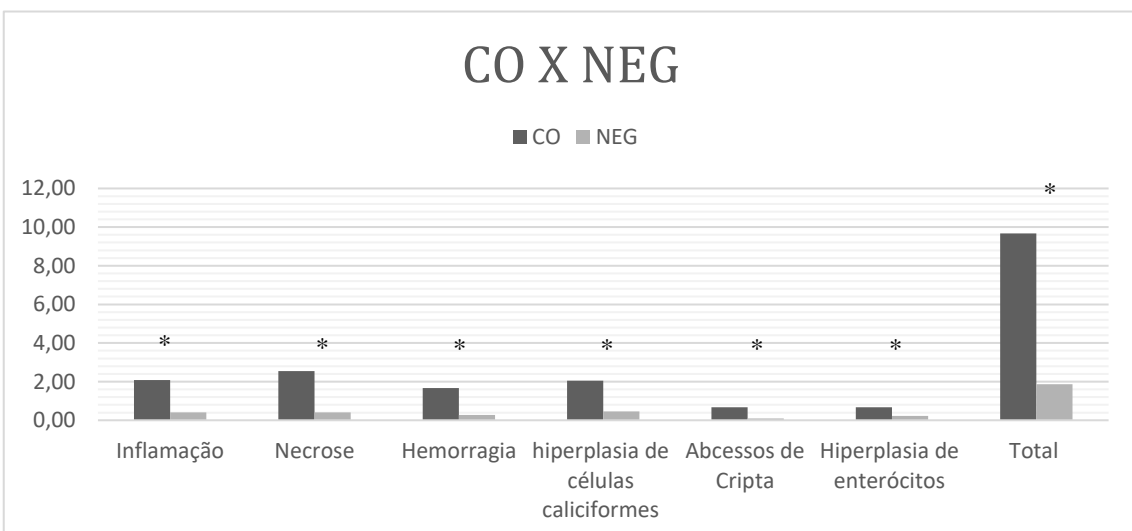
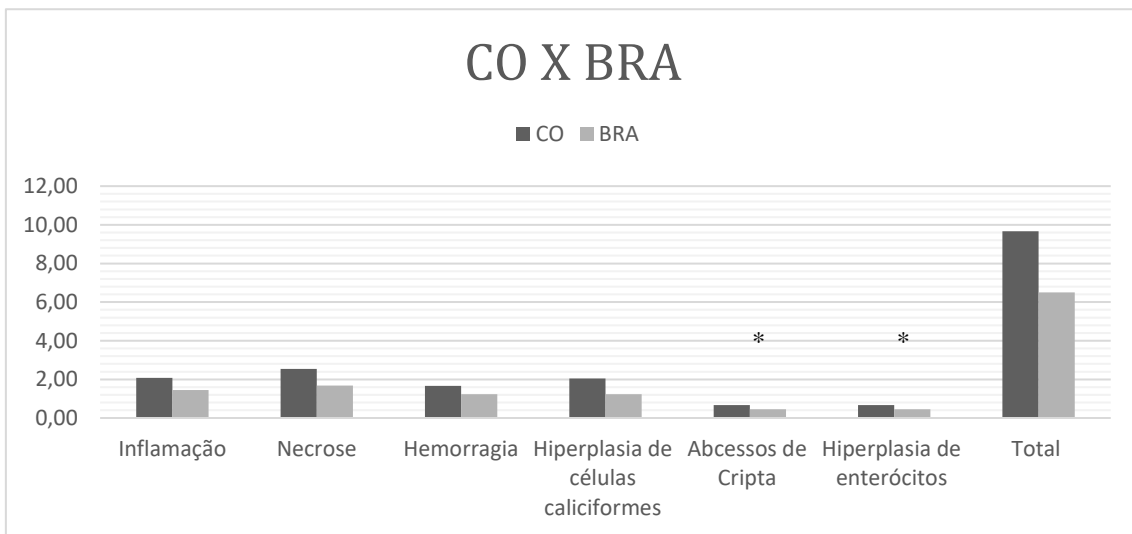
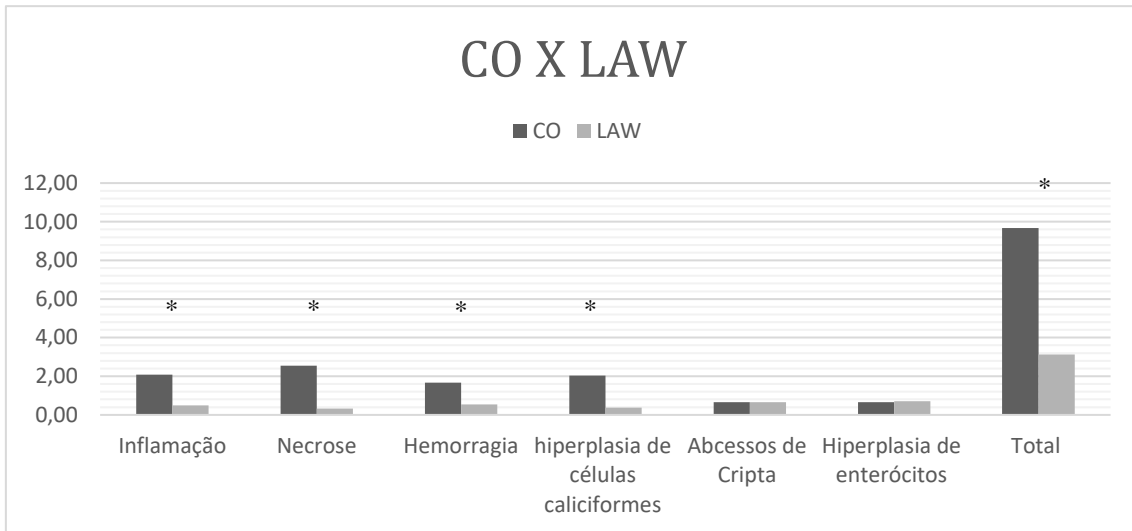


Figura 2. Média de escore histopatológico nos grupos coinfeção (CO), *B. hyodysenteriae* (BRA) *L. intracellularis* (LAW) e Negativo (NEG).

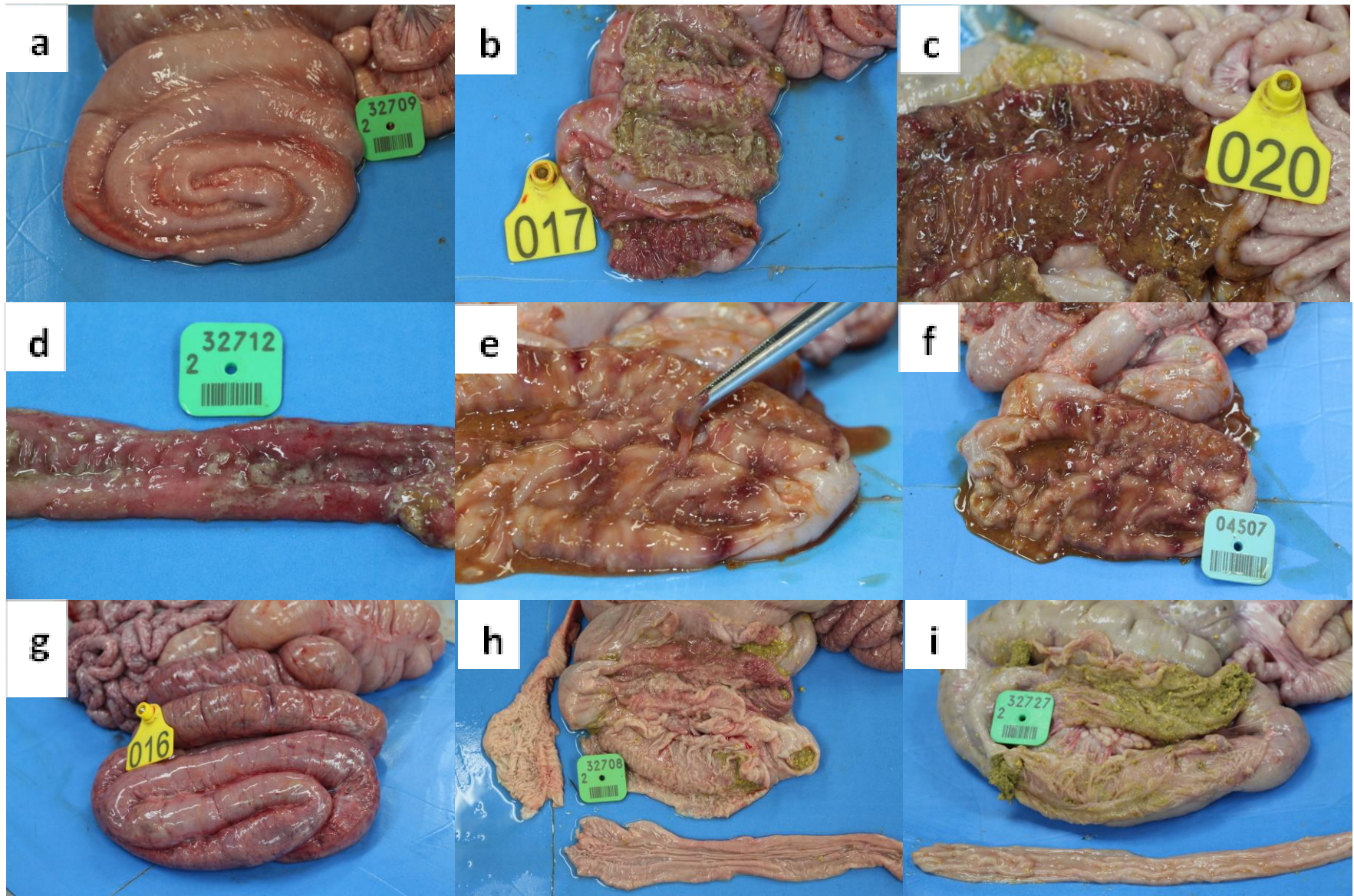


Figura 3. Lesões macroscópicas observadas na necrópsia. (a) Animal grupo CO apresentando edema de mesocólon acentuado; (b,c) Animais do grupo CO apresentando colite catarral fibrinonecrose hemorrágica difusa grave ; (d) Animal grupo BRA demonstrando área necrose multifocal associada à fibrina e hemorragia multifocal moderada; (e, f) Animal grupo BRA com colite catarral hemorrágica difusa grave, em destaque (pinça) excesso de muco associado a conteúdo hemorrágico. (g) Animal grupo LAW apresentando hiperemia moderada de na serosa do cólon; (h) animal grupo LAW sem lesão; (i) Animal grupo NEG sem lesão.

### 11.5.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

No teste de imuno-histoquímica para *L. intracellularis* foi observada marcação discreta a moderada nos grupo CO e LAW. No grupo CO cinco animais tiveram marcação positiva e no grupo LAW 4 animais.

A tabela 2 detalha as médias de escore para cada grupo demonstrando diferença significativa entre os mesmos. Na Figura 4, foram representados os animais dos grupos CO e LAW com marcações positivas.

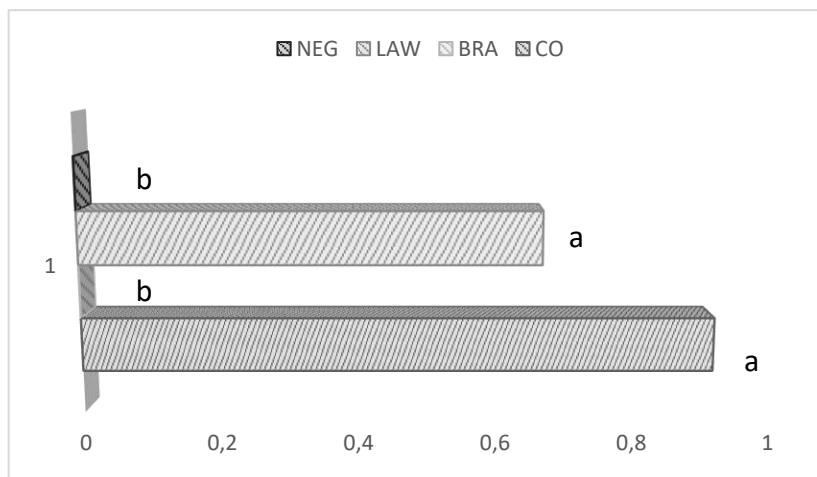


Figura 4. Média dos escores de imuno-histoquímica para *L. intracellularis* por grupo, as letras “a,b” indicam diferença estatística  $p \leq 0,05$

### 11.5.4 ISOLAMENTO BACTERIANO

Não foram observados o crescimento de *Salmonella* sp e *E. coli* enterotoxigênica nos meios utilizados para diagnóstico diferencial em amostras de fezes coletadas antes do início das inoculações. No grupo CO foi possível o isolamento de *B. hyodysenteriae* 11/12 animais em diferentes segmentos do intestino e fezes. No grupo BRA foi isolada *B. hyodysenteriae* em 5/11 animais. Os demais grupos não foi isolada *B. hyodysenteriae* (tabela 3).

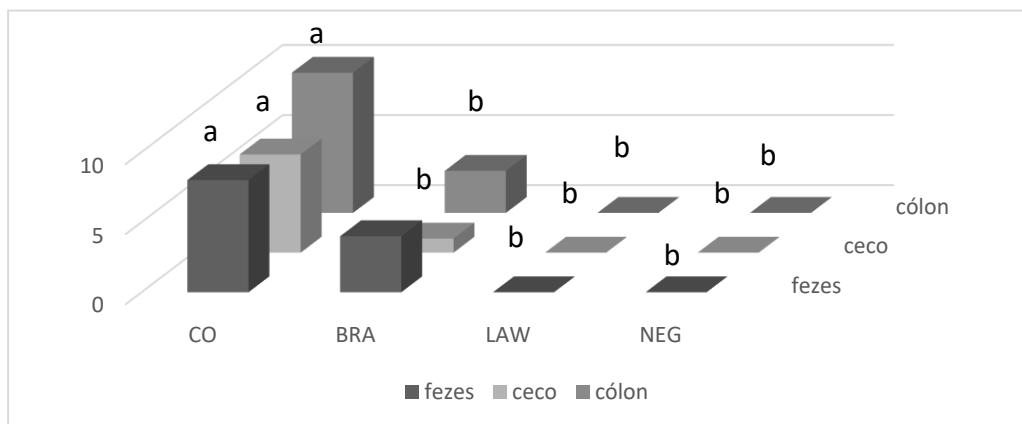


Figura 5. Média de isolamento de *B. hyodysenteriae* por grupo separados por segmento as letras “a,b” indicam diferença estatística  $p \leq 0,05$ .

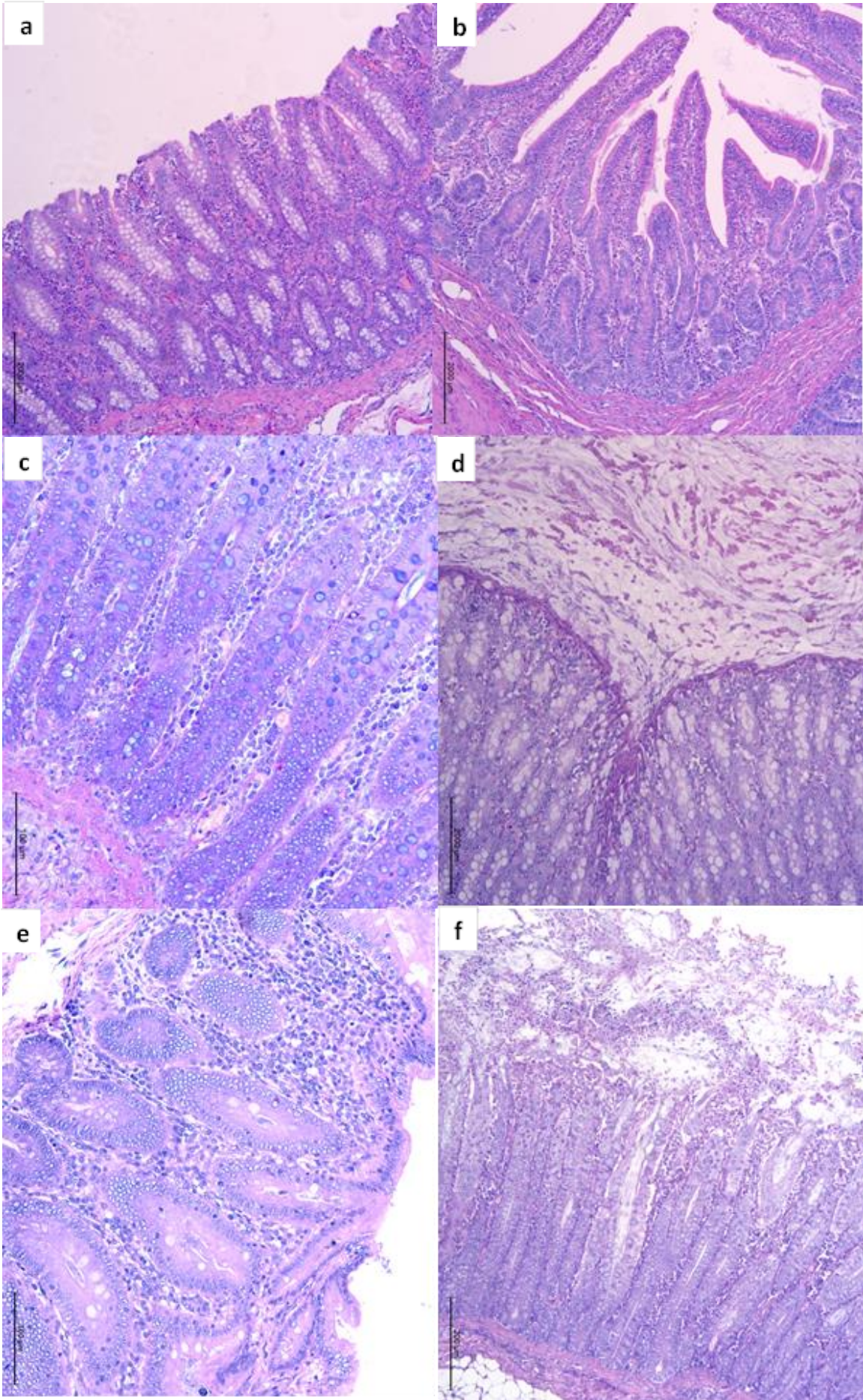




Figura 6. Lesões microscópicas no intestino de suínos inoculados com *Brachyspira hyodysenteriae*. (a,b) HeE – (intestino grosso<sup>a</sup>, intestino delgado<sup>b</sup>) (NEG), ausência de lesões; (c) HeE – (intestino grosso) (LAW) hiperplasia de enterócitos moderada (200X) (d) HeE – (BRA) hiperplasia acentuada de células caliciformes associada a necrose superficial, infiltrado neutrofílico acentuado (colite catarral fibrinonecrótica difusa grave) (100X) (e, f) HeE – (CO) (e) intestino grosso hiperplasia de enterócitos acentuada com diminuição de células caliciformes (200X) (f) (intestino grosso) hiperplasia acentuada de células caliciformes associada a necrose acentuada difusa associado infiltrado neutrofílico acentuado (colite catarral fibrinonecrótica difusa grave) (100X).

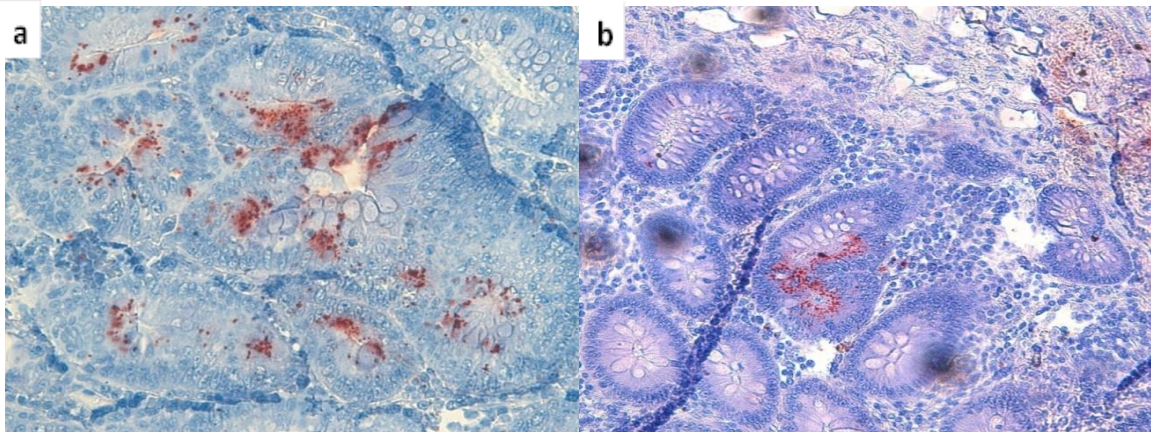


Figura 7. Imuno-histoquímica de suínos experimentalmente infectados com *L. intracellularis*, 21dpi. (a) Grupo (CO) Imunomarcção em enterócitos de criptas (400X); (b) (LAW) Imunomarcção em enterócitos de criptas e macrófagos na lamina própria do íleo utilizando AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) (200X).

### 11.5.5 qPCR

A primeira positividade de eliminação pela qPCR de *L. intracellularis* nas fezes dos animais dos grupos CO e LAW ocorreu no dia 3. No último dia de avaliação todos os animais de ambos os grupos foram positivos. Os animais dos demais grupos foram negativos durante todo o período de experimento.

Em relação à qPCR de *B. hyodysenteriae* no grupo CO, 10/12 animais foram positivos a partir do dia 10, 3 dias após a inoculação com *B. hyodysenteriae*. No grupo BRA, 7/11 animais foram positivos começando a eliminar o agente a partir do dia 10, também 3 dias após inoculação com *B. hyodysenteriae*. As médias e avaliação estatística com os respectivos resultados significativos estão na figura 8 e anexo 3.2.

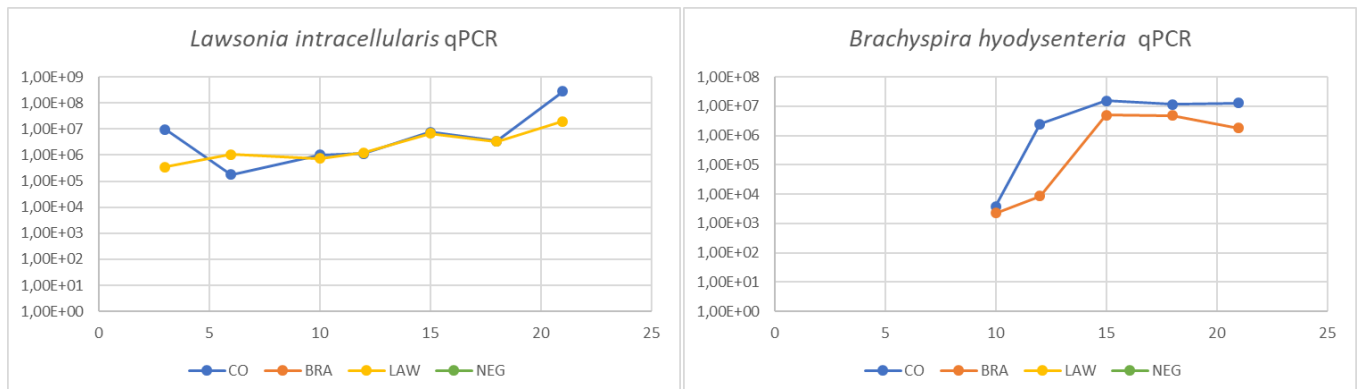


Figura 8. Resultados de qPCR comparando a média de eliminação do agente nas fezes nos grupos coinfeccção (CO) em azul, *B. hyodysenteriae* (BRA) em vermelho, *L. intracellularis* (LAW) em amarelo e Negativo (NEG) em verde.

### 11.5.6 MICROBIOMA

Utilizando o sequenciamento genômico pelo Ion torrente foi obtida uma cobertura de 79% do Chip 318 (~8.5 mi de reads) das quais foram removidos 40% das reads devido à policlonalidade (~5 mi após filtro). Foram utilizadas ao final da filtragem 2.982.952 reads participaram da identificação com média de 33.143 reads por amostra. Em relação a MOCK communities foi iniciado com 4.631.158 reads sendo que 1.648.206 reads foram removidas com baixa qualidade (Phred < 20) restando 2.982.952 reads que participaram da identificação, em uma média de 33.143 reads por amostra .

Não foi observada diferença significativa de riqueza entre os grupos testados, no entanto é possível observar uma maior diversidade no grupo negativo em relação aos demais grupos e menor diversidade no grupo CO em relação aos demais 21dpi.

Resultados referentes à abundância com diferença estatística quando comparados em cada grupo para diversos níveis taxonômicos como demonstrado na tabela 2.

Foi observada maior abundância relativa dos gêneros *Prevotella*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Butyricimonas*, *Desulfovibrio*, *Fusobacterium* e *p75-a5* no grupo coinfeção quando comparados com os demais grupos. No grupo BRA foi observada maior frequência do gênero *Clostridium* em relação aos demais. No grupo LAW, *Megasphaera* e *Dialister* foram estatisticamente significantes e *Odoribacter* para o grupo NEG. São demonstradas a abundância relativa em comparação com os grupos testados nas figuras (9-12).

Não foi observada diferença estatística entre os grupos para diversidade beta no entanto foi observada dispersão evidente entre os grupos CO X NEG aos 21dpi. Os resultados referentes estão demonstrados na figura 13.

Tabela 2. Tabela resultados do microbioma fecal avaliados e grupos taxonômicos com diferença estatísticas significativas separados por grupo  $p \leq 0,05$ .

		P value	Grupo com maior frequência
<b>T21(Law_vs_Bra)</b>	Família		
	Porphyromonadaceae	0.012886830493507	BRA
	Streptococcaceae	0.012886830493507	LAW
	Gênero		
	<i>Parabacteroides</i>	0.012886830493507	BRA
	<i>Streptococcus</i>	0.012886830493507	LAW
<b>T21(Co_vs_Bra)</b>	Filo		
	Firmicutes	0.012879064669346	BRA
	Fusobacteria	0.0355240368313795	CO
	Classe		
	Clostridia	0.0474483843880802	BRA
	Fusobacteriia	0.0355240368313795	CO
	Ordem		
	Clostridiales	0.0409535667814036	BRA
	Fusobacteriales	0.0355240368313795	CO
	Lactobacillales	0.0351950848989481	CO
	Família		
	[Paraprevotellaceae]	0.010705311873033	CO
	Clostridiaceae	0.00248543353268081	BRA
	Fusobacteriaceae	0.0355240368313795	CO

	Lactobacillaceae	0.0149386031285565	CO
	Gênero		
	<i>[Prevotella]</i>	0.012879064669346	CO
	<i>Clostridium</i>	0.010705311873033	BRA
	<i>Fusobacterium</i>	0.0355240368313795	CO
	<i>Lactobacillus</i>	0.0149386031285565	CO
	<i>p-75-a5</i>	0.0474483843880802	CO
<b>T21(Co_vs_Law)</b>	Filo		
	Firmicutes	0.0256547699171202	LAW
	Fusobacteria	0.00631375918655783	CO
	Proteobacteria	0.0351950848989481	CO
	Classe		
	Bacilli	0.00153997525783769	LAW
	Deltaproteobacteria	0.012879064669346	CO
	Epsilonproteobacteria	0.00591269060812482	CO
	Fusobacteriia	0.00631375918655783	CO
	Ordem		
	Campylobacterales	0.00591269060812482	CO
	Desulfovibrionales	0.010705311873033	CO
	Enterobacteriales	0.00830344690531291	CO
	Fusobacteriales	0.00631375918655783	CO
	Lactobacillales	0.000923824907537386	LAW
	Pasteurellales	0.0156848401759963	CO
	Família		
	[Odoribacteraceae]	0.00143598783526406	CO
	[Paraprevotellaceae]	0.000923824907537386	CO
	Bacteroidaceae	0.00187902637312587	CO
	Campylobacteraceae	0.00342874651022508	CO
	Desulfovibrionaceae	0.010705311873033	CO
	Enterobacteriaceae	0.00830344690531291	CO
	Fusobacteriaceae	0.00631375918655783	CO
	Lactobacillaceae	0.0127092847550734	LAW
	<i>p-2534-18B5</i>	0.0276173541564825	LAW
	Pasteurellaceae	0.0156848401759963	CO
	Porphyromonadaceae	0.00591269060812482	CO
	Streptococcaceae	0.0425377920562403	LAW
	Veillonellaceae	0.00594276612246729	LAW
	Gênero		
	<i>[Eubacterium]</i>	0.00279865510717577	LAW
	<i>[Prevotella]</i>	0.00196463024569095	CO
	<i>Anaerovibrio</i>	0.0256783417053815	CO
	<i>Bacteroides</i>	0.00187902637312587	CO
	<i>Butyricimonas</i>	0.00197139594296633	CO
	<i>Campylobacter</i>	0.00342874651022508	CO
	<i>Catenibacterium</i>	0.027559127653885	CO

	<i>Desulfovibrio</i>	0.0256547699171202	CO
	<i>Dialister</i>	0.010705311873033	LAW
	<i>Fusobacterium</i>	0.00631375918655783	CO
	<i>Lactobacillus</i>	0.00175250848921009	LAW
	<i>Megasphaera</i>	0.00248543353268081	LAW
	<i>Odoribacter</i>	0.00142985438326551	LAW
	<i>Oscillospira</i>	0.0351950848989481	CO
	<i>p-75-a5</i>	0.00153997525783769	CO
	<i>Parabacteroides</i>	0.00704657239034717	CO
	<i>Shuttleworthia</i>	0.0238202172795873	LAW
	<i>Streptococcus</i>	0.0149386031285565	LAW
<b>T21(co_vs_neg21)</b>	Filo		
	Fusobacteria	0.00631375918655783	CO
	Classe		
	Bacilli	0.0301176534687101	CO
	Deltaproteobacteria	0.0474483843880802	CO
	Fusobacteriia	0.00631375918655783	CO
	Opitutae	0.0133160403375067	NEG
	Ordem		
	Desulfovibrionales	0.00884804722804454	CO
	Enterobacteriales	0.00354574677030781	CO
	Fusobacteriales	0.00631375918655783	CO
	Lactobacillales	0.0256547699171202	NEG
	Pasteurellales	0.0156848401759963	CO
	Família		
	[Odoribacteraceae]	0.00362001666753251	CO
	[Paraprevotellaceae]	0.0072736188296829	CO
	Bacteroidaceae	0.00860879727082779	CO
	Christensenellaceae	0.0072736188296829	NEG
	Desulfovibrionaceae	0.00884804722804454	CO
	Enterobacteriaceae	0.00354574677030781	CO
	Fusobacteriaceae	0.00631375918655783	CO
	Lactobacillaceae	0.0175054975400099	NEG
	Pasteurellaceae	0.0156848401759963	CO
	Gênero		
	[ <i>Eubacterium</i> ]	0.037417959614756	NEG
	[ <i>Prevotella</i> ]	7,77E-09	CO
	<i>Anaerovibrio</i>	0.0028415273840731	CO
	<i>Bacteroides</i>	0.00860879727082779	CO
	<i>Butyricimonas</i>	0.01045624760529	CO
	<i>Clostridium</i>	0.0474483843880802	CO
	<i>Desulfovibrio</i>	0.00594276612246729	CO
	<i>Fusobacterium</i>	0.00631375918655783	CO
<i>Lactobacillus</i>	0.0127092847550734	NEG	
<i>Megasphaera</i>	0.0301176534687101	NEG	

	<i>Odoribacter</i>	0.000422760407398187	NEG
	<i>p-75-a5</i>	0.00153997525783769	CO
	<i>Shuttleworthia</i>	0.0127092847550734	NEG
<b>T21(law21_vs_neg21)</b>	Classe		
	[Lentisphaeria]	0.0453003901882632	NEG
	Bacilli	0.037417959614756	LAW
	Ordem		
	Campylobacterales	0.012837523673437	NEG
	GMD14H09	0.00463155837210344	LAW
	Lactobacillales	0.0473071819821046	NEG
	WCHB1-41	0.0298476426791938	NEG
	Família		
	Campylobacteraceae	0.00523650755848898	NEG
	p-2534-18B5	0.0359098003120898	NEG
	Porphyromonadaceae	0.0473071819821046	NEG
	RFP12	0.0354526082163918	NEG
	Streptococcaceae	0.0213986841852967	LAW
	Veillonellaceae	0.0192307692307692	LAW
	Gênero		
	<i>Campylobacter</i>	0.0268002289808724	LAW
	<i>Catenibacterium</i>	0.037417959614756	NEG
	<i>Dialister</i>	0.00218478519730371	LAW
	<i>Megasphaera</i>	0.0156056085521693	LAW
	<i>Streptococcus</i>	0.012593249898966	LAW
	<i>Unassigned</i>	0.0225001812025638	NEG
<b>T21(bra21_vs_neg21)</b>	Gênero		
	<i>Odoribacter</i>	0.00962198825643798	NEG

## 11.6 DISCUSSÃO

Estudos avaliando o microbioma de animais inoculados por *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* foram previamente descritos em alguns trabalhos (Molback et al., 2008; Borewicz et al., 2015; Burrough et al., 2017). Além disso, foi relatada a presença de casos de coinfeção de cepas dessas espécies (Suh & Song, 2005; Phillips al., 2009; Reiner et al., 2011), no entanto ainda não foram avaliados casos de coinfeção em animais experimentalmente inoculados associado à avaliação anatomopatológica e microbioma fecal.

No presente trabalho, foi possível observar sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas mais graves no grupo CO, seguido do grupo BRA com escore de diarreia elevado e eliminação de *B. hyodysenteriae* nas fezes a partir do décimo dia do experimento com isolamento bacteriano, acometendo grande parte dos animais do grupo CO. No grupo BRA menos animais foram acometidos por um quadro de disenteria suína, porém os animais acometidos possuíam quadro típico da doença. Sinais clínicos e lesões semelhantes foram relatados na literatura anteriormente em alguns trabalhos (Taylor & Alexander 1971; Glock et al., 1974; Rubin et al., 2013).

No grupo LAW não foi observado expressivo grau de diarreia, no entanto foram visualizadas lesões microscópicas moderadas típicas de enteropatia proliferativa, além de marcação positiva para *L. intracellularis* na imuno-histoquímica e PCR positivos tanto no grupo LAW quanto CO. Dessa forma, os animais apresentaram em sua maioria o quadro subclínico da





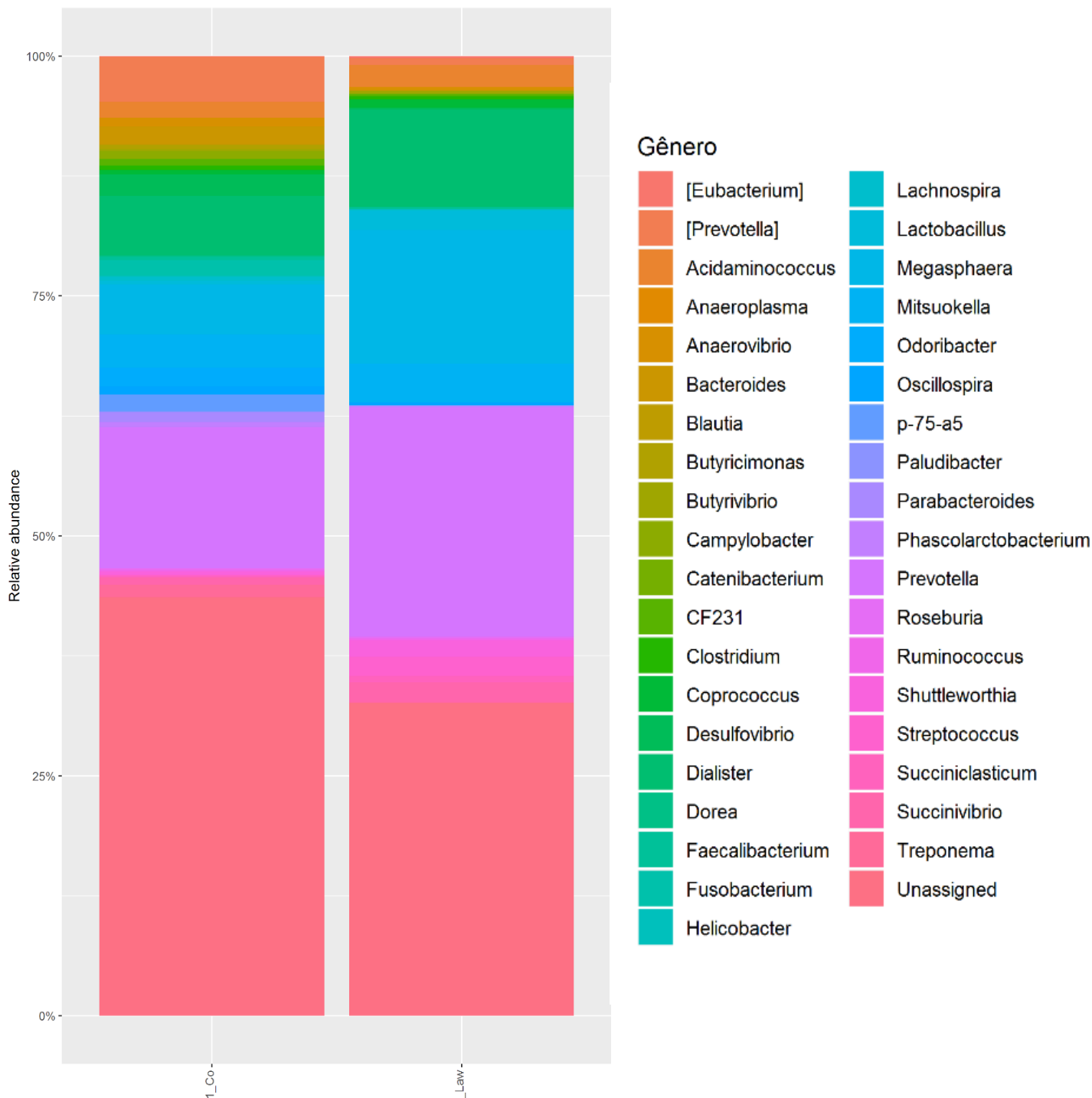


Figura 11. Gráficos de barras empilhadas que representam abundância proporcional de gênero principal em animais CO à esquerda e LAW a direita. Foi observada maior abundância relativa de *Prevotella* ( $p=0.00196463024569095$ ), *Anaerovibrio* ( $p=0.0256783417053815$ ), *Bacteroides* ( $p=0.00187902637312587$ ), *Butyricimonas* ( $p=0.00197139594296633$ ), *Campylobacter* ( $p=0.00342874651022508$ ), *Catenibacterium* ( $p=0.027559127653885$ ), *Desulfovibrio* ( $p=0.0256547699171202$ ), *Fusobacterium* ( $p=0.00631375918655783$ ), *Oscillospira* ( $p=0.0351950848989481$ ), *p-75-a5* ( $p=0.00153997525783769$ ), *Parabacteroides* ( $p=0.00704657239034717$ ) no grupo CO e *Eubacterium* ( $p=0.00279865510717577$ ), *Dialister* ( $p=0.010705311873033$ ), *Lactobacillus* ( $p=0.00175250848921009$ ), *Megasphaera* ( $p=0.00248543353268081$ ), *Odoribacter* ( $p=0.00142985438326551$ ), *Shuttleworthia* ( $p=0.0238202172795873$ ), *Streptococcus* ( $p=0.0149386031285565$ ) no grupo LAW.



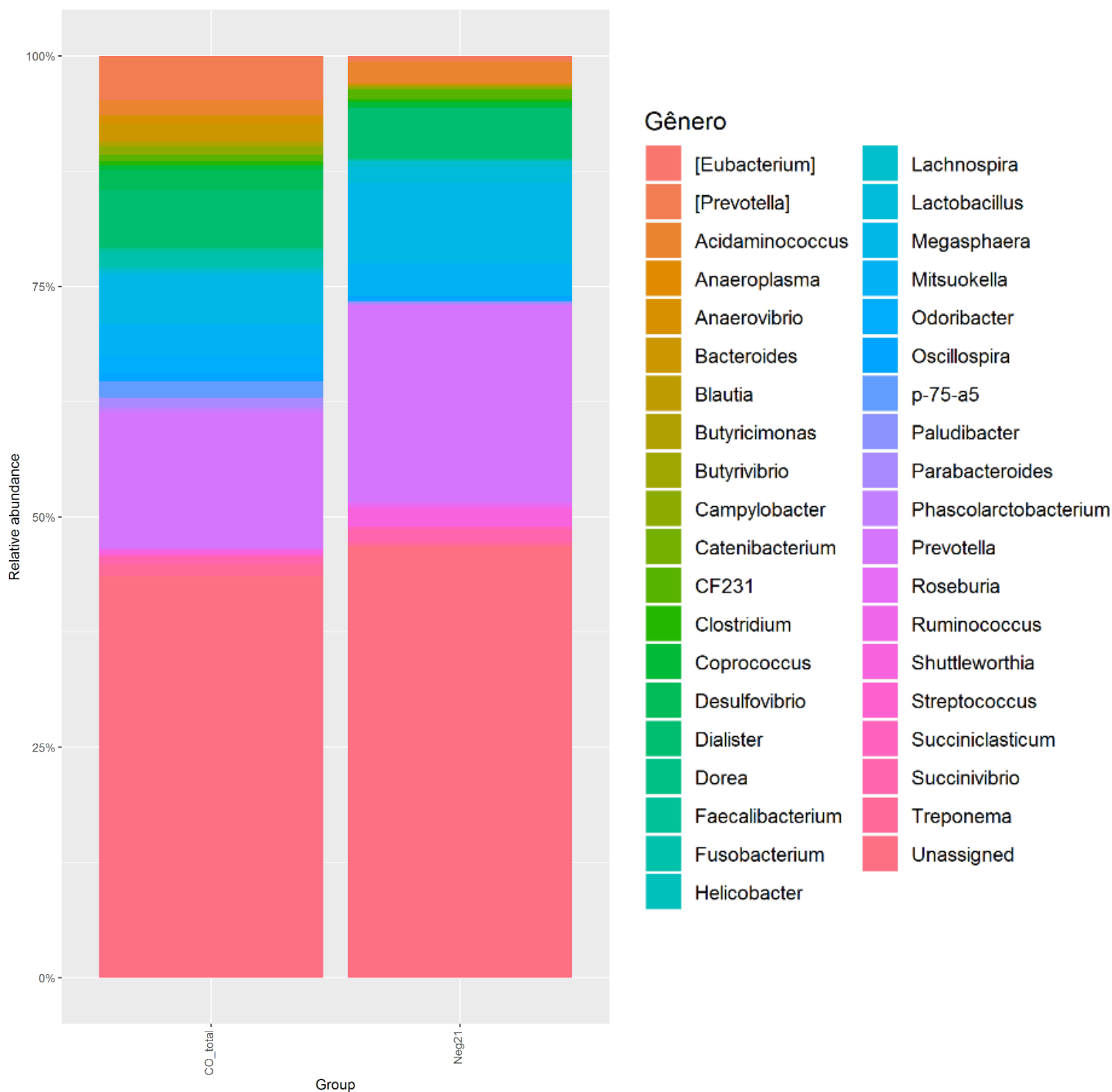


Figura 12. Gráficos de barras empilhadas que representam abundância proporcional de gênero principal em animais CO à esquerda e NEF à direita. Foi observado maior a abundância relativa de *Eubacterium* ( $p=0.037417959614756$ ), *Lactobacillus* ( $p= 0.0127092847550734$ ), *Megasphaera* ( $p= 0.0301176534687101$ ), *Odoribacter* ( $p= 0.000422760407398187$ ), *Shuttleworthia* ( $p= 0.0127092847550734$ ) no grupo NEG e *Prevotella* ( $p=7,77198751354089E-09$ ), *Anaerovibrio* ( $p= 0.0028415273840731$ ), *Bacteroides* ( $p= 0.00860879727082779$ ), *Butyricimonas* ( $p= 0.01045624760529$ ), *Clostridium* ( $p= 0.0474483843880802$ ), *Desulfovibrio* ( $p= 0.00594276612246729$ ), *Fusobacterium* ( $0.00631375918655783$ ), *p-75-a5* ( $0.00153997525783769$ ) no grupo CO.

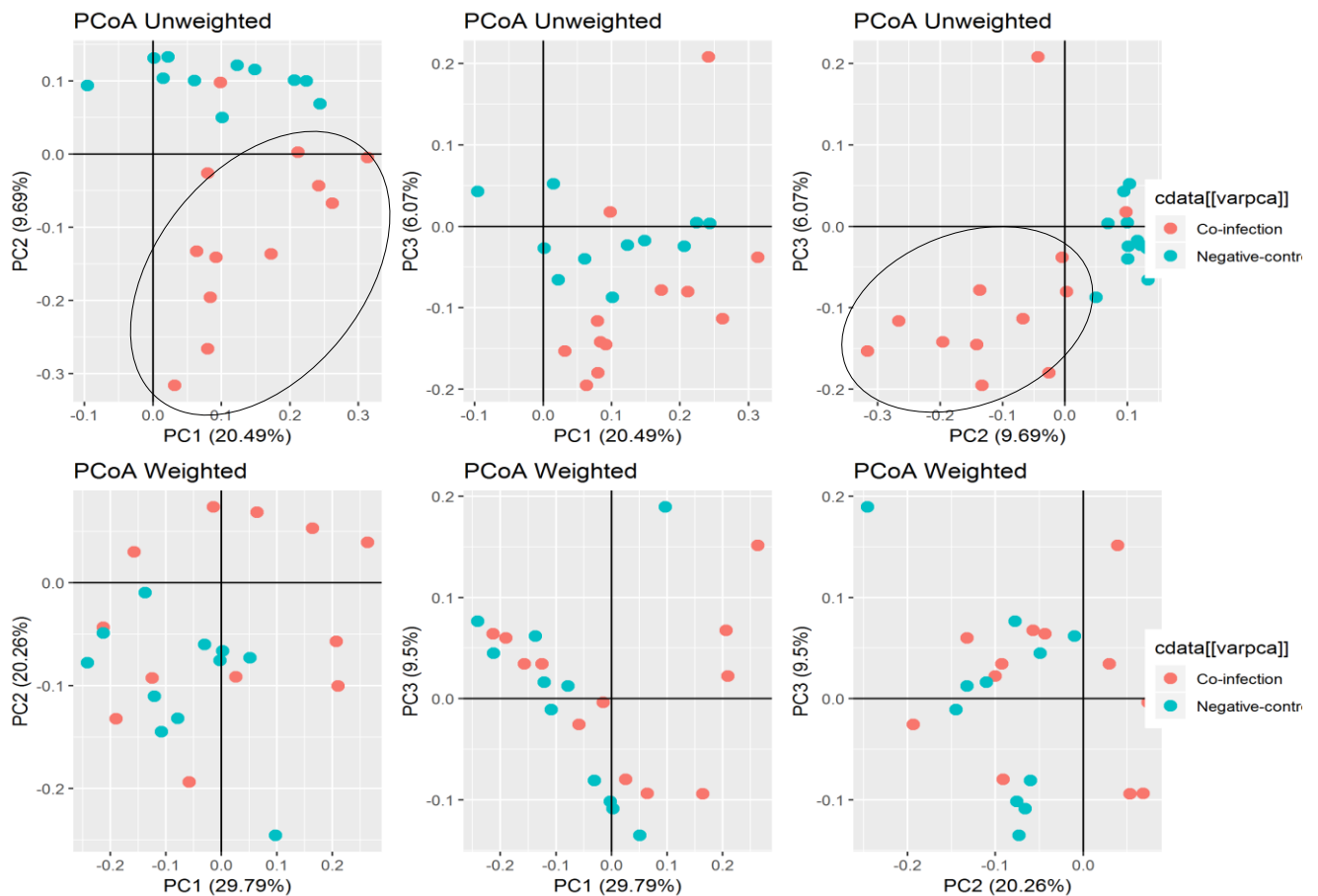


Figura 13. Análise de coordenadas principais. As cores correspondem os grupos feita por Unifrac das comunidades microbianas associadas nas fezes. Uma matriz de distância de diversidade beta foi calculada para gerar o gráfico de diversidade de amostras de microbiota de suíno aos 21 dias pós infecção comparando os grupos coinfeção e negativo. É possível observar nos círculos demarcados a formação de um cluster próximo no grupo coinfeção.

enterite proliferativa. Uma explicação possível seria a concentração de *L. intracellularis* ( $10^6$ ) inoculada, considerada baixa se comparada em estudos onde há manifestação clínica típica da doença (Guedes & Gebhart, 2003; Guedes et al, 2009). Além disso, à natureza do inóculo proveniente de cultura pura de *L. intracellularis* e não raspado de mucosa. Esse tipo de inóculo foi utilizado por ser um trabalho avaliando o microbioma fecal, dessa forma não sendo permitida a presença de microorganismos que não sejam *L. intracellularis* que eventualmente estão no raspado de mucosa.

Em trabalhos utilizando cultura pura em relação ao raspado de mucosa foi possível observar sinais clínicos e lesões mais graves quando inoculados com homogeneizado de mucosa (McOrist et al., 1996, Smith & McOrist, 1997; Guedes et al., 2002 a,b). A vantagem da cultura pura é o controle do inóculo, uma vez que não há interferência nos resultados com a implantação da microbiota do raspado de mucosa (Guedes & Gebhart, 2003).

Com os resultados obtidos na análise anatomopatológica, resultados de qPCR, isolamento e imuno-histoquímica é possível afirmar que as inoculações experimentais foram bem sucedidas com diferenças significativas em todos as análises, particularmente evidentes nos animais do grupo CO, seguido do grupo BRA.

É possível afirmar que a presença da *L. intracellularis* no grupo CO potencializou significativamente a manifestação da disenteria suína baseado na manifestação clínico patológica.

Possivelmente, a infecção por *L. intracellularis* tenha alterações iniciais que permitiram maior colonização e estabelecimento da *B. hyodysenteriae* no intestino grosso, ou possa ter debilitado o hospedeiro propiciando maior propagação da infecção por *B. hyodysenteriae*.

A *L. intracellularis* ao propagar no interior enterócitos rompem essas células sendo liberadas no lúmen intestinal (Lawson et al., 1993). Além disso, um mecanismo importante na patogênese da enteropatia proliferativa é a interferência na proliferação celular aumentando a proporção de enterócitos imaturos (McOristet al., 2006; Oh et al., 2009). A lesão provocada pelo rompimento da célula associado à necrose e a presença de enterócitos imaturos são um ambiente propício para estabelecimento da infecção por *Brachyspira*.

Outro potencial fator seria um mecanismo imunossupressor presente na enteropatia proliferativa com limitada infiltração de células inflamatórias durante o desenvolvimento de lesões proliferativas (Lawson & Gebhart, 2000; Macintyre et al. (2003; Boutrup et al., 2010). Em um trabalho realizado por MacIntyre et al. (2003) caracterizou a resposta imune associada à infecção por *Lawsonia intracellularis* e foi observada uma associação direta entre a presença da *L. intracellularis* e o número reduzido de linfócitos T e B com regulação negativa da resposta imune adaptativa.

Esses fatores em conjunto com a alta capacidade de colonização da *B. hyodysenteriae* no ambiente do intestino grosso permitiram uma elevada taxa de colonização e expressão da doença.

Quadros de coinfeção são mais graves, uma vez que possuem dois ou mais agentes patogênicos que podem colonizar de forma sinérgica o mesmo sítio levando a lesões mais expressivas como é comumente observado em doenças polimicrobianas. (Opriessnig et al., 2011). Em suínos é observada a presença de coinfeção em casos de pneumonia enzoótica, rinite atrófica e circovirose (Wellenberg et al., 2004). Em um trabalho com *Mycoplasma hyopneumoniae* foi observada a presença de lesões mais graves quando associado ao vírus PCV2 (Opriessnig et al., 2004). Foi observada associação de circovírus com *Salmonella* spp e vírus influenza sendo observada maior susceptibilidade quando em associação (Pallares et al., 2002; Schwarz et al., 2010).

Em relação ao microbioma intestinal, foi observada uma diminuição da riqueza microbiana ao final do experimento no grupo CO, seguido dos grupos BRA e LAW, fator comumente observado em casos de disbiose, uma vez que o perfil microbiano se torna mais monótono. Nos animais do grupo NEG foi possível observar uma diminuição da diversidade menos expressiva em relação aos demais. Uma explicação possível é a diminuição da diversidade da microbiota com a idade e substituição de certos grupos de microrganismos por outros, decorrentes à alterações fisiológicas na vida do leitão (Kim et al., 2011).

Há evidências crescentes de que a disbiose da microbiota intestinal está associada à patogênese de distúrbios intestinais e extra-intestinais em humanos, e nesses casos os mecanismos que conduzem ao desenvolvimento da doença envolvem a relação da microbiota e seus produtos metabólicos associados ao sistema imune do hospedeiro (Carding et al., 2015). Diferenças significativas na microbiota em casos de doença de Chron são associadas à disbiose (Sokol et al., 2008; Joossens et al., 2011).

A compreensão das relações microbianas é essencial para o entendimento da patogênese de enfermidades com patogenia complexa como a disenteria suína e enteropatia proliferativa. No presente trabalho, todos os grupos tiveram diferenças significativas na abundância relativa de múltiplas bactérias quando comparado entre os demais grupos avaliados. Foi possível observar maior abundância relativa com diferença estatística em comparação com os demais grupos para os gêneros *Prevotella*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Butyricimonas*, *Desulfovibrio*, *Fusobacterium* e *p75-a5* no grupo CO, maior abundância de *Clostridium* no grupo BRA. No grupo LAW, *Megasphaera* e *Dialister* foram estatisticamente significantes e *Odoribacter* para o grupo NEG.

*Prevotella* é um gênero abundante no trato gastro intestinal de suínos (Kim et al., 2011, 2012; Looft et al., 2012). Em alguns trabalhos, foi significativamente abundante em raspados de mucosa de animais com disenteria suína e animais positivos para *Salmonella enterica* (Burrough et al., 2017; Borewicz et al., 2015). Recentemente, foi associada em humanos e camundongos como fator facilitador em casos de síndrome do intestino irritável (Liu et al., 2018).

Um fator interessante em relação a esse gênero foi observada uma redução em *Prevotella* spp. na microbiota do cólon ao utilizar chicória na dieta (Liu et al., 2012). Em trabalhos testando

nutraucêuticos à base de chicória, é possível observar diminuição dos casos de disenteria suína (Molbak et al 2007) funcionando como um fator predisponente importante para o surgimento da enfermidade.

O gênero *Anaerovibrio* não é claramente elucidado, no entanto é comumente encontrado em ovelhas e bovinos. Microorganismos desse gênero possuem alta capacidade de hidrolisar lipídios (Hobson & Mann, 1961), característica provavelmente importante para colonização por *Brachyspira hyodysenteriae*, uma vez que bactérias do gênero necessitam de compostos como colesterol no seu metabolismo (Stanton, 1987; 1997).

Em relação ao gênero *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Clostridium* encontrados no presente trabalho, foi anteriormente demonstrado em animais gnotobióticos quando inoculados associado ao *Fusobacterium necrophorum*, três estirpes de *Bacteroides vulgatus*, espécies de *Clostridium* e *Listeria* individualmente e em diferentes combinações conseguem desenvolver disenteria suína, no entanto, na ausência desses microrganismos não foi possível o desenvolvimento de doença clínica, confirmando assim achados anteriores (Whipp et al., 1979).

Um aumento significativo de *Fusobacterium* também foi relatado em suínos com diarreia pelo vírus da diarreia epidêmica suína (PED) (Koh et al., 2015) e em animais com diarreia inespecífica (Yang et al., 2017). No trabalho de Burrough et al (2017) foi encontrada nos conteúdos luminiais de suínos com disenteria suína (Burrough et al., 2017).

O gênero *Clostridium* possui várias espécies que tanto podem ter potencial benéfico quanto negativo no hospedeiro (Dowd et al., 2008). Foi observada a presença desse gênero em suínos com enterocolite necrosante (Azcarate-Peril et al., 2011).

O aumento de *Desulfovibrio* também foi observado por Burrough et al (2017) em animais positivos para disenteria suína. *Desulfovibriospp.* também são consistentemente aumentados em humanos com colite ulcerativa (Rowan et al., 2010). São consideradas bactérias redutoras de sulfato com capacidade de degradar mucinas, diminuindo a barreira da mucosa (Earley et al., 2015), facilitando a ligação da *B. hyodysenteriae* (Quintana-Hayashi et al., 2015).

Os gêneros *p-75-a5*, *Butyricimonas*, *Odoribacter* e *Megasphaera* ainda são pouco relatados na literatura. O gênero *p-75-a5* é observado em suínos na fase pré-desmame (Wang et al., 2016), em fezes de aves silvestres (Ushida et al., 2015). Um trabalho recente revelou o aumento da abundância relativa de *p-75-a5* em grupos tratados com óxido de zinco e antimicrobianos (Yu et al., 2017).

O gênero *Butyricimonas* tem apenas dois únicos casos relatados anteriormente ligados à infecção humana com *B. virosa* em pacientes com síndrome do intestino irritável (Enemchukwu, et al., 2016). Mais abundante no grupo NEG, o gênero *Odoribacter* apresentou maior abundância em humanos saudáveis em relação à indivíduos com inflamação na mucosa intestinal (Jiang et al., 2015) além de ser considerado um gênero importante para homeostase intestinal (Miquel et al., 2013).

Nos animais do grupo LAW foi observada maior abundância *Megasphaera* e *Dialister*. *Megasphaera* é considerado inibidor da colonização da *B. hyodysenteriae* (Mølbak et al., 2007). *Dialister* são obrigatoriamente anaeróbicas ou microaerófilas. São encontradas na cavidade oral dos seres humanos saudáveis e em infecções bucais, hemoculturas, abscessos no cérebro, nasofaringe e boca (Wade, 2015).

Com dos resultados obtidos nesse estudo, associados à literatura atual será possível auxiliar em estudos futuros no melhor entendimento da relação patógeno, microbiota e hospedeiros e os possíveis mecanismos que permitem ou impedem o aparecimento de sinais clínicos. Em trabalhos futuros, ao avaliar o papel potencial dessas bactérias, será possível a utilização de abordagens prébióticas para o controle dessas enfermidades.

## 11.7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi observado que animais inoculados com *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* apresentaram sinais clínicos e lesões mais severas em relação aos demais grupos testados. Foi demonstrado que *L. intracellularis* funciona como um fator imunossupressor que associado à esfoliação tecidual permitem que a *B. hyodysenteriae* se instale no ambiente colônico levando a lesões severas. Quanto à alteração da microbiota fecal, todos os grupos tiveram diferenças significativas na abundância relativa de múltiplas bactérias. Foi possível observar maior abundância relativa com diferença estatística em comparação com os demais grupos para os gêneros *Prevotella*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Butyricimonas*, *Desulfovibrio*, *Fusobacterium* e *p75-a5* no grupo CO, maior abundância de *Clostridium* no grupo BRA. No grupo LAW, *Megasphaera* e *Dialister* foram estatisticamente significantes e *Odoribacter* para o grupo NEG

## 11.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZCARATE-PERIL MA, FOSTER DM, CADENAS MB, et al., (2011). Acute necrotizing enterocolitis of preterm piglets is characterized by dysbiosis of ileal mucosa-associated bacteria. *Gut Microbes* 2: 234–243.
- BOKULICH, N. A., BAMFORTH, C. W., MILLS, D. A. (2012). Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS one*, 7(4).
- BOKULICH, N. A., SUBRAMANIAN, S., FAITH, J. J., et al., (2013). NIH Public Access, 10(1), 57–59.
- BOREWICZ, K. A., KIM, H. B., SINGER, R. S. et al., (2015). Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PloS one*, 10(10), e0139106.
- BOUTRUP, T. S., BOESEN, H. T., BOYE, M. et al., (2010). Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol*. 143(2), 101-109.
- BRANDENBURG AC, MINIATS OP, GEISSINGER HD, et al. (1977) Swine dysentery: inoculation of gnotobiotic pigs with *Treponema hyodysenteriae* and *Vibrio coli* and *Peptostreptococcus*. *Can J Comp Med.*;41(3):294–301
- BURROUGH, E. R., ARRUDA, B. L., PLUMMER, P. J. (2017). Comparison of the Luminal and Mucosa-Associated Microbiota in the Colon of Pigs with and without Swine Dysentery. *Front. Vet. Sci.* , 4, 139.
- CAPORASO, J. G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J et al., (2010). correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group*, 7(5), 335–336.
- CARDING, S., VERBEKE, K., VIPOND, D. T., et al., (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*, 26(1), 26191.
- CHABAN, B., LINKS, M. G., HILL, J. E. (2012). A Molecular Enrichment Strategy Based on *cpn60* for Detection of Epsilon-Proteobacteria in the Dog Fecal Microbiome. *Microb Ecol*, 63(2), 348–357.
- COLLINS, A.M.; BARCHIA, I.M. The critical threshold of *Lawsonia intracellularis* in pig faeces that causes reduced average daily weight gains in experimentally challenged pigs. *Vet.Microb.*, v.168, p.455–458, 2014.
- COSTA, M.O.; CHABAN, B.; HARDING, J.C.; et al., (2014) Characterization of the fecal microbiota of pigs before and after inoculation with “*Brachyspira hampsonii*”. *PLoS One*, 9(8): e106399.
- DIAO, H., YAN, H. L., XIAO, Y., et al., (2016). Intestinal microbiota could transfer host Gut characteristics from pigs to mice. *BMC microbiol*, 16(1), 238.

DOWD, S. E., SUN, Y., WOLCOTT, R. D., et al., (2008). Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: Bacterial diversity in the ileum of newly weaned salmonella-infected pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 5(4), 459-472.

DURMIC, Z., PETHICK, D. W., PLUSKE, J. R. et al., (1998). Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fiber and the development of swine dysentery after experimental infection. *J Appl Microbiol* , 85(3), 574-582.

EARLEY, H., LENNON, G., BALFE, A., et al., (2015). A preliminary study examining the binding capacity of *Akkermansia muciniphila* and *Desulfovibrio* spp., to colonic mucin in health and ulcerative colitis. *PLoS One*, 10(10), e0135280.

EDGAR, R. C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Meth.*, 10(10), 996–998.

EDGAR, R. C. (2017). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *bioRxiv*, 192211.

ENEMCHUKWU, C. U., BEN-FARAS, H., GIALANELLA, P., et al. (2016). *Butyricimonas virosa* bacteraemia and bowel disease: case report and review. *New microbes and new infections*, 13, 34-36.

GUEDES, R.M.C., FRANÇA, S.A., MACHADO, G.S., et al. (2009) Use of tylvalosin-medicated feed to control porcine proliferative enteropathy. *Vet. Rec.*, v.165, p.342-345.

GUEDES, R.M. & GEBHART, C.J., (2003) Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous *Lawsonia intracellularis* isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine. *Vet. Microbiol.* 93, 159–166.

GUEDES, R.M.C.e GEBHART, C.J. (2003a) Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* v.15, p.438–446.

GUEDES, R. M., GEBHART, C. J., ARMBRUSTER, G. A. et al., (2002a). Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. *Can J Vet Res.*66(4), 258-263.

GUEDES, R. M., GEBHART, C. J., WINKELMAN, N. L., et al. (2002b). Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Can J Vet Res.*, 66(2), 99-107.

GLOCK, R. D., HARRIS, D. L. KLUGE, J. P. (1974). Localization of spirochetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the lesions of swine dysentery. *Infect Immun*, 9(1), 167-178.

HAMPSON, D.J. *Brachyspira* 1 colitis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; et al., eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; p.680-696, 2012.

HARRIS, D.L., ALEXANDER, T.J.L., WHIPP, S.C., et al. Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 468–471, 1978.

HOBSON, P. N., & MANN, S. O. J. (1961). The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *Microbiology*, 25(2), 227-240.

HUGHES R, OLANDER HJ., WILLIAMS CB (1975). Swine dysentery: Pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. *Am J Vet Res.* 36: 971–977.

JACOBSON, M., FELLSTRÖM, C., LINDBERG, R. et al., (2004) Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J Med Microbiol.*, 53,,273-280.

JACOBSON, M., AF SEGERSTAD, C. H., GUNNARSSON, A., et al., (2003). Diarrhoea in the growing pig—a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res Vet Sci.* , 74(2), 163-169.

JIANG, W., WU, N., WANG, X., et al. (2015). Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.*, 5, 8096.

- JENSEN, B. B., & JØRGENSEN, H. (1994). Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl Environ Microbiol.* 60(6), 1897-1904.
- JOOSSENS M, HUYS G, CNOCKAERT M, et al., (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 60: 631-637.
- KIM, H. B., BOREWICZ, K., WHITE, B. A. et al., (2011). Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet. Microbiol.*, 153(1), 124-133.
- KINYON, J.M., & HARRIS. D. L. (1979) *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29:102-109.
- KINYON, J.M., HARRIS, D.L., GLOCK, R.D. (1977) *Enteropathogenicity of various isolates of Treponema hyodysenteriae*. *Infect Immun.*, 15, p.638-646.
- KOH, H.W., KIM, M.S., LEE, J.S., et al., (2015). Changes in the Swine Gut Microbiota in Response to Porcine Epidemic Diarrhea Infection. *Microbes Environ.* 30(3), 284.
- KROLL, J. J., ROOF, M. B., HOFFMAN, L. J., et al., (2005). Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Anim Health Res Rev.*, 6(2), 173-197.
- KUNKLE, R.A.; HARRIS, D.L.; KINYON, J.M. (1986) Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol.*, 24, p.669-671.
- LAWSON, G.H.K. & GEBHART, C.J. (2000) Proliferative enteropathy: review. *J. Comp. Pathol.*, 122, 77-100.
- LAWSON, G. H., MCORIST, S., JASNI, S., et al. (1993). Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance “*in vitro*”. *J Clin Microbiol*, 31(5), 1136-1142.
- LESER, T.D., MØLLER, K., JENSEN, T.K et al. (1997) Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly  $\beta$ -haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol Cell Probes.*, 11, p.363-372.
- LOOFT, T., ALLEN, H. K., CANTAREL, B. L. et al., (2014A). Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J*, 8(8), 1566-1576.
- LIU, H., IVARSSON, E., DICKSVED, J., et al., (2012). Dietary Inclusion of Chicory (*Cichorium intybus L.*) Affects Pig Intestinal Micro-environment and Gut Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM-07702.
- LIU, S., ZHAO, L., ZHAI, Z et al., (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection induced the unbalance of gut microbiota in piglets. *Curr Microbiol.*, 71(6), 643-649.
- LUNA, L.G. Routine Staining Procedures: Manual of Histologic Staining. *Methods of The Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw-Hill Book Co, 24-58, 1968.
- MCORIST, S., GEBHART, C.J., BOSWORTH, B.T.,(2006). Evaluation of porcine ileum models of enterocyte infection by *Lawsonia intracellularis*. *Can. J. Vet. Res.* 70, 155–159
- MCDONALD, D., CLEMENTE, J. C., KUCZYNSKI, J., et al., (2012). The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: How I learned to stop worrying and love the ome-ome. *GigaScience*, 464(1), 1–6.
- MCORIST, S. & LAWSON, G.H.K., (1989) Proliferative enteropathies—*Campylobacter* species in the feces of normal and contact pigs. *Vet. Rec.* 124, 41–141.
- MCORIST S, JASNI S, MACKIE RA, et al.(1993) Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont *intracellularis*. *Infect. Immun.* 61 (10):4286–4292,.
- MCORIST, S., MACKIE, R.A., NEEF, N., et al. (1994) Synergism of ileal symbiont *intracellularis* and gut bacteria in the reproduction of porcine proliferative enteropathy. *Vet. Rec.* 134, 331–332.

- MCORIST, S., ROBERTS, L., JASNI, S. et al., (1996). Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. *J Comp Pathol.* 115(1), 35-45.
- MEYER R.C., SIMON J., BYERLY C.S. (1975) The etiology of swine dysentery. III. The role of selected gram-negative obligate anaerobes. *Vet. Pathol.* 12: 46–54.
- MACINTYRE, N., SMITH, D. G. E., SHAW, D. J., et al., (2003). Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. *Vet. Pathol.*, 40(4), 421-432.
- 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: 527–534, 1974.
- MIQUEL, S., MARTIN, R., ROSSI, O., et al. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol.*, 16(3), 255-261.
- MOLBAK, L., JOHNSEN, K., BOYE, M., et al., (2008). The microbiota of pigs influenced by diet texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Vet. Microbiol.*, 128(1-2), 96-107.
- OH, Y. S., LEE, J. B., MCORIST, S. (2010). Microarray analysis of differential expression of cell cycle and cell differentiation genes in cells infected with *Lawsonia intracellularis*. *Vet J*, 184(3), 340-345.
- OPRIESSNIG, T., GIMÉNEZ-LIROLA, L. G., HALBUR, P. G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev*, 12(2), 133-148.
- OPRIESSNIG, T., THACKER, E. L., YU, S., et al. (2004). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.*, 41(6), 624-640.
- PALLARES, F. J., HALBUR, P. G., OPRIESSNIG, T., et al. (2002). Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) *J Vet Diagn Invest.*, 14(6), 515-519.
- PASCAL, V., POZUELO, M., BORRUEL, Net al., (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*, gutjnl-2016.
- PHILLIPS, N.D.; LA, T.; ADAMS, P.J.; et al. (2009) Detection of *Brachyspira* hyodysenteriae, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. *Vet Microbiol.*, 134, 294-299.
- PYLRO, V. S., ROESCH, L. F. W., MORAIS, D. Ket al.,. (2014). Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods*, 107, 30-37.
- QUINTANA-HAYASHI, M.P., MAHU, M., DE PAUW, N. et al. (2015) The levels of *Brachyspira hyodysenteriae* binding to porcine colonic mucins differ between individuals, and binding is increased to mucins from infected pigs with *de novo* MUC5AC synthesis. *Infect Immun.* ;83:1610–9.
- RADECKI, S. V.; YOKOYAMA, M. T. (1991) Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition. In: MILLER, E. R.; ULLREY, D. E.; LEWIS, A. (Eds.). *Swine nutrition*. [S.l.]: Butterworth-Heinemann, cap. 27, p. 439-447.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011), R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. Available online at <http://www.R-project.org/>
- REINER, G., WINKELMANN, M., WILLEMS, H. (2011) Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *Eur. J. Wildl. Res.*57:443–448.
- ROWAN F., DOCHERTY N. G., MURPHY M., Murphy T. B., et al., (2010). Bacterial colonization of colonic crypt mucous gel and disease activity in ulcerative colitis. *Ann. Surg.* 252, 869–875.
- ROWAN, F., DOCHERTY, N. G., MURPHY, M., et al., (2010). *Desulfovibrio* bacterial species are increased in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum.*, 53(11), 1530-1536.



- ROWLAND A.C. & LAWSON G.H.K. (1975) Porcine intestinal adenomatosis: a possible relationship with necrotic enteritis, regional ileitis and proliferative haemorrhagic enteropathy. *Vet. Rec.* 97(10):178-180.
- RUBIN, J.E., COSTA, M.O., HILL, J.E. et al. (2013) Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from Swine Dysentery following experimental inoculation with “*Brachyspira hampsonii*” Strain 30446 *PLoS ONE* 8(2): e57146, 2013.
- SATO, J.P.H., (2017). Diversidade genética e virulência de amostras de *Brachyspira hyodysenteriae* isoladas de suínos assintomáticos e com doença clínica. Tese UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 70.
- SAMPIERI, F., VANNUCCI, F. A., ALLEN, A. L., et al. (2013). Species-specificity of equine and porcine *Lawsonia intracellularis* isolates in laboratory animals. *Can J Vet Res.*, 77(4), 261-272.
- SCHWARZ, P., DEON KICH, J., COLDEBELLA, A., et al., (2010). Frequência de suínos soropositivos para *Salmonella sp.* em granjas afetadas em diferentes níveis de severidade pela Síndrome Multissistêmica de Definhamento do Leitão Desmamado. *Acta Sci. Vet. B.*, 38(2).
- SMITH, S. H. & MCORIST, S. (1997). Development of persistent intestinal infection and excretion of *Lawsonia intracellularis* by piglets. *Research in veterinary science*, 62(1), 6-10.
- SOKOL, H., PIGNEUR, B., WATTERLOT, L., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.
- STANTON, T. B. (1997) Physiology of ruminal and intestinal spirochaetes *In*: D. J. HAMPSON AND T. B. STANTON (Eds.) *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans* CAB International New York, NY 7–45
- STANTON, T. B. (1987) Cholesterol metabolism by *Treponema hyodysenteriae* *Infect. Immun.* 55 309–313.
- STEGE, H., JENSEN, T. K., MØLLER, K., et al., (2001). Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med* , 50(1-2), 153-164.
- SU, T., LIU, R., LEE, A., et al. (2018). Altered Intestinal Microbiota with Increased Abundance of *Prevotella* Is Associated with High Risk of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol Res Pract.* 2018.
- SUCHODOLSKI, J. S., MARKEL, M. E., GARCIA-MAZCORRO, J. F., et al., (2012). The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PloS one*, 7(12), e51907.
- SUH D.K. & SONG J.C. (2005) Prevalence of *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae*, and *Salmonella* in swine Herds. *J. Vet. Sci.* 6:289-293.
- TAYLOR, D.J. & ALEXANDER, T.J.L., 1971. The Production of Dysentery in Swine by Feeding Cultures Containing a Spirochaete. *Br. Vet. J.* 127, lviii–lxi.
- USHIDA, K., SEGAWA, T., TSUCHIDA, S. et al. (2015). Cecal bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans. *Journal of J Vet Med Sci.* 15-0313.
- VANNUCCI, F. & GEBHART, C., 2014. Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Vet. Pathol.* 51, 465–477.
- VAREL, V. H., ROBINSON, I. M., JUNG, H. J. (1987). Influence of dietary fiber on xylanolytic and cellulolytic bacteria of adult pigs. *Appl Environ Microbiol* , 53(1), 22-26.
- YU, T., ZHU, C., CHEN, S., et al. (2017). Dietary high zinc oxide modulates the microbiome of ileum and colon in weaned piglets. *Front. Microbiol.* 8, 1–12.
- YANG, Q., HUANG, X., ZHAO, S., et al. (2017) Structure and function of the fecal microbiota in diarrheic neonatal piglets. *Front Microbiol* (2017) 8:502.
- YOUMANS BP, AJAMI NJ, JIANG ZD, et al. Characterization of the human gut microbiome during travelers’ diarrhea. *Gut Microbes* (2015) 6:110–9.
- WADE, W. G. (2015). *Dialister*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.

- WANG, J., HAN, M., ZHANG, G., et al, (2016). The Signal Pathway of Antibiotic Alternatives on Intestinal Microbiota and Immune Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 17, 785–796.
- WELLENBERG, G.J.; DWARS, R.M.; LANDMAN, W.J. (2008) 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.
- WHIPP, S.C., ROBINSON, I.M., HARRIS, D.L., et al. (1979) Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 26: 1042–1047.

## 12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos nesse trabalho foi possível analisar a microbiota de suínos acometidos por essas enfermidades.

Foram encontradas diferenças significativas no perfil microbiano nos dois trabalhos, com menor diversidade entre animais positivos para disenteria suína e enteropatia proliferativa em relação à negativos, constatando a existência de uma perturbação da microbiota quando a *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* estão presentes no intestino dos suínos.

Avaliando animais inoculados experimentalmente em coinfeção com *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*, e *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* em infecção individual em comparação com animais negativos foi possível observar que animais do grupo coinfeção apresentaram quadro severo em relação aos demais grupo, demonstrando que a presença da *Lawsonia intracellularis* exerceu um papel importante para o estabelecimento da infecção por *Brachyspira hyodysenteria*.

**13. ANEXO 1. DETALHAMENTO DE PRIMERS, ADAPTADORES E CÓDIGO DE BARRAS DESENVOLVIDOS PARA MÉTODO FUSION DE SEQUENCIAMENTO.**

Nome do oligonucleotídeo	Sequência
R806_trP1_rev	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGACTACHVGGGTWTCTAAT
F515_A_for_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC04	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC05	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC06	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC07	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC08	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGGATAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC09	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCGCAATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTATTCGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAGTCGGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATCCATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGCAATTACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGAGACGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGCCACGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCTCATTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGAGATACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTACAACCTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCATCCGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCCGGAATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGACCACTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGGTTATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCAAGCTGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTTACACACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCTCATTGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGCATCGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGCCATTGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGGAATCGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGAGAATGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGGAGGACGGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAACAATCGGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACATAATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTCCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

F515_A_for_BC42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACGAATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGACACCGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGGCCAGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGGAGCTTCTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAGTCCGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC47	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGCAACCACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC48	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCTAAGAGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC49	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTAACATAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC50	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGACAATGGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC51	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGAGCCTATTGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC52	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGCATGGAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC53	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGGCAATCCTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC54	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGGAGAATCGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC55	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCACCTCCTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC56	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGCATTAAATTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC57	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGCAACGGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC58	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTAGAACACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC59	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTTGATGTTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC60	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTCTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC61	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGGATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC62	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGCTTACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC63	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGAGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC64	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGAGTTCCGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC65	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCGGCACATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC66	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGCAATCATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC67	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTACCAGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC68	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAAGAAGTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC69	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCAATTGGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC70	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTACTGGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC71	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGGCTCCGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC72	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAAGGCCACACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC73	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGCCTGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC74	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGATCGGTTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC75	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAGGAATACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC76	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGAAGAACCCTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC77	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAAGCGATTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC78	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGCCAATTCTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC79	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGGTTGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC80	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGAAGCAGGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC81	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGCCATTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC82	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGCATCTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC83	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAGGACATTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC84	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCATAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC85	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCAGCCTAACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC86	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGGTTATTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC87	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGCTGGACGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC88	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGAACACTTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

F515_A_for_BC89	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGAATCTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC90	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAACCACGGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC91	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGAAGGATGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC92	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAGGAACCGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC93	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGCCAATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC94	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCGACAAGCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC95	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGACAGATCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC96	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAAGCGGTCGATGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

#### 14. ANEXO 2. DETALHAMENTO DAS AMOSTRAS UTILIZADOS NO CAPÍTULO 1 SEPARADAS POR ESTADO E GRANJAS AVALIADAS

1	Diagnóstico de disenteria suína	Amostra	Granja	Estado	Ano
5	Positivo	GB13	1	MG	2013
6	Positivo	AV3	3	PR	2012
7	Positivo	AWA3	2	SC	2012
8	Negativo	F10/16 4	12	PR	2016
9	Negativo	F68/13 3	13	MS	2013
10	Negativo	F3/14 1	14	MS	2014
11	Negativo	F69/13 6	15	MG	2013
12	Positivo	GB11	1	MG	2013
13	Positivo	GB5	1	MG	2013
14	Positivo	GB2	1	MG	2013
15	Positivo	AV2	3	SC	2012
16	Positivo	AV1	3	SC	2012
17	Positivo	829/12 3	4	SC	2012
18	Positivo	829/12 2	4	SC	2012
19	Positivo	AWA9	2	SC	2012
20	Positivo	AWA7	2	SC	2012
21	Positivo	574/12 7	5	SC	2012
22	Positivo	GB4	1	MG	2013
23	Positivo	AWA4	2	SC	2012
24	Positivo	AWA6	2	SC	2012
25	Positivo	AWA5	2	SC	2012
26	Positivo	GB9	1	MG	2013
27	Positivo	GB10	1	MG	2013
28	Positivo	GB12	1	MG	2013
29	Positivo	GB8	1	MG	2013
30	Positivo	GB6	1	MG	2013
31	Positivo	APB	10	SP	2013
32	Positivo	AMB	10	SP	2013
33	Positivo	473/13	9	SC	2013

34	Positivo	703/12 2	8	RS	2012
35	Positivo	574/12 12	5	RS	2012
36	Positivo	948/13 5F	11	SP	2013
37	Positivo	365/13 1	7	MG	2013
38	Positivo	365/13 2	7	MG	2013
39	Positivo	828/13 1	6	MG	2013
40	Positivo	828/13 2	6	MG	2013
41	Negativo	F68/13 2	13	MS	2013
42	Negativo	F14/16 1	16	MG	2016
44	Negativo	F7/16 10	17	MG	2016
45	Negativo	F11/16 1	18	MT	2016
46	Negativo	F3.1/16	19	MG	2016
47	Negativo	F63/13 10	20	RS	2013
48	Negativo	F76/13 10	21	RS	2013
49	Negativo	F61/13 3	22	PR	2013
50	Negativo	F71/13 1	23	MG	2013
51	Negativo	F76/13 8	21	RS	2013
52	Negativo	F51/13 11	24	MG	2013
53	Negativo	F51/13 12	24	MG	2013
54	Negativo	F65/13 4	25	RS	2013
55	Negativo	F65/13 1	25	RS	2013
56	Negativo	F63/13 4	20	RS	2013
57	Negativo	F05/14 1	26	RS	2014
58	Negativo	F14/15 4	27	DF	2015
59	Negativo	F16/15 5	28	MT	2015
60	Negativo	F16/15 6	28	MT	2015
61	Negativo	F69/13 27	15	MG	2013
62	Negativo	F10/14 1	29	RS	2014
63	Negativo	F10/14 4	29	RS	2014
64	Negativo	F02/14 4	30	MG	2014
65	Negativo	F61/13 1	22	PR	2013
66	Negativo	F62/13 17	31	SP	2013
67	Negativo	F71/13 1	23	MG	2013
68	Negativo	F02/14 3	30	MG	2014
69	Negativo	F73/13 1	32	MG	2013
70	Negativo	F62/13 13	33	SP	2013
71	Negativo	F75/13 8	34	MT	2013
72	Negativo	F3/14 4	14	MS	2014
73	Negativo	F75/13 10	34	MT	2013
74	Negativo	F8/16 2	35	MG	2016

## 15. ANEXO 3. TABELAS SUPLEMENTARES CAPÍTULO 2

### 14.1 ANEXO 3.1 TABELA. ESCORE FECAL COM A MÉDIA DO SOMÁTARIO DAS FEZES, AS LETRAS (ABC) INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA $P \leq 0,05$

DPI	-5	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
CO	0,333	0,917	0,75	1,000 <sup>a</sup>	1,083 <sup>a</sup>	0,917	0,833 <sup>a</sup>	0,833 <sup>a</sup>	0,833 <sup>a</sup>	0,750 <sup>a</sup>	0,833 <sup>a</sup>	1,250 <sup>a</sup>	1,333 <sup>a</sup>	2,167 <sup>a</sup>	2,333 <sup>a</sup>	1,9	2,700 <sup>a</sup>	2,400 <sup>a</sup>	2,500 <sup>a</sup>	3,000 <sup>a</sup>
BRA	0,091	0,273	0,545	0,364 <sup>ab</sup>	0,545 <sup>a</sup>	0,455	0,000 <sup>b</sup>	0,000 <sup>b</sup>	0,455 <sup>ab</sup>	0,273 <sup>b</sup>	0,364 <sup>ab</sup>	0,182 <sup>a</sup>	0,591 <sup>ab</sup>	1,409 <sup>ab</sup>	1,409 <sup>a</sup>	1,273	1,273 <sup>bcd</sup>	2,045 <sup>a</sup>	1,900 <sup>bd</sup>	1,500 <sup>b</sup>
LAW	0,417	0,417	1,083	0,500 <sup>ab</sup>	1,583 <sup>b</sup>	1,083	0,667 <sup>a</sup>	0,750 <sup>ac</sup>	0,167 <sup>b</sup>	0,917 <sup>a</sup>	0,833 <sup>a</sup>	0,667 <sup>a</sup>	0,917 <sup>ab</sup>	0,833 <sup>b</sup>	0,545 <sup>b</sup>	0,727	1,182 <sup>c</sup>	0,636 <sup>b</sup>	0,636 <sup>bc</sup>	0,818 <sup>b</sup>
NEG	0,455	0,364	0,273	0,091 <sup>b</sup>	0,364 <sup>b</sup>	0,727	0,364 <sup>a</sup>	0,364 <sup>bc</sup>	0,727 <sup>ab</sup>	0,727 <sup>ab</sup>	0,000 <sup>b</sup>	0,273 <sup>a</sup>	0,182 <sup>b</sup>	0,636 <sup>b</sup>	0,273 <sup>b</sup>	0,636	0,182 <sup>d</sup>	1,182 <sup>ab</sup>	0,727 <sup>d</sup>	1,091 <sup>b</sup>

### 14.2 ANEXO 3.2 TABELA RESULTADOS DE QPCR COMPARANDO A ELIMINAÇÃO DO AGENTE NAS FEZES, AS LETRAS “A,B” INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA $P \leq 0,05$ .

#### LAWSONIA PCR

DIAS	CO	BRA	LAW	NEG
-5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
3	9,82x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>a</sup>	3,52x10 <sup>5a</sup>	0 <sup>a</sup>
6	1,80x10 <sup>5a</sup>	0 <sup>b</sup>	1,06x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>a</sup>
10	1,03x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>	7,42x10 <sup>5a</sup>	0 <sup>b</sup>
12	1,16x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>	1,24x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>
15	7,62x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>	6,66x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>
18	3,45x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>	3,35x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>
21	2,81x10 <sup>8a</sup>	0 <sup>b</sup>	1,96x10 <sup>7a</sup>	0 <sup>b</sup>

#### Brachyspira PCR

Dias	CO	BRA	LAW	NEG
-5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
3	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
6	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
10	3,82x10 <sup>3a</sup>	2,30x10 <sup>3ab</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
12	2,50x10 <sup>6a</sup>	8,75x10 <sup>3a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
15	1,56x10 <sup>7a</sup>	5,02x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
18	1,14x10 <sup>7a</sup>	4,81x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
21	1,27x10 <sup>7a</sup>	1,82x10 <sup>6a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>