

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**BRUNO RAMOS OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DE *Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira pilosicoli* EM  
SUÍNOS COM DIARREIA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL  
AGOSTO DE 2015**

**BRUNO RAMOS OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DE *Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira pilosicoli* EM  
SUÍNOS COM DIARREIA NO DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL  
AGOSTO DE 2015**

**BRUNO RAMOS OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DE *Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira pilosicoli* EM  
SUÍNOS COM DIARREIA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Uberlândia, 27 de Agosto de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi  
(Orientadora - UFU)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anna Monteiro Correia lima  
(Examinadora - UFU)

---

Prof. Dr. Humberto Eustáquio Coelho  
(Examinador - UNIUBE)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
(CIP) Sistema de Bibliotecas da UFU, MG,  
Brasil.

---

- O48i Oliveira, Bruno Ramos, 1985-  
2015 Investigação de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli*  
em suínos com diarreia no estado do Espírito Santo / Bruno Ramos  
Oliveira. - 2015.  
41 f. : il.
- Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Suíno - Doenças - Teses. 3. Diarréia em  
animais - Teses. I. Medeiros-Ronchi, Alessandra Aparecida. II.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. III. Título.

*“Ao único que é digno de receber, a honra e a glória, a força e o poder [...] Rei Jesus.”*

*Benedito Carlos (Bené)*

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, por me dar Sua inestimável, imensurável e maravilhosa graça e misericórdia, me concedendo o privilegio de concluir mais uma etapa em minha vida, mesmo não sendo merecedor de nada. E por não me deixar desistir dos meus sonhos, me entregando ferramentas para enfrentar todas as dificuldades, pois Ele é fiel para cumprir.

Agradeço aos meus pais, Jeová e Tarcilene, meu alicerce, por me darem o verdadeiro amor, que é derramado em minha vida todos os dias. Aos cuidados oferecidos e orações eficazes, e por serem exemplos de verdadeiros filhos de Deus. Pela sempre pronta ajuda e socorro, que mesmo eu estando distante, continuamente me fortalecem. Amo vocês.

Ao meu irmão Giovanni e cunhada Inara, por sempre me apoiarem. E ao Enzo, a nossa mais nova alegria. Orgulho-me de fazer parte dessa família.

À minha nova família capixaba, Luana, Beth, Ormindo, Luis Ângelo e Luísmar, por terem me acolhido com um dos seus. Já me considero um Nandorf. Em especial agradeço à Luana, por toda força, paciência e amor, se fazendo forte por mim quando eu me encontrava fraco, obrigado. Nunca me esquecerei de tudo que se passou para que eu chegasse até aqui.

À professora Doutora Alessandra, pela orientação durante esse longo período, vencendo comigo as dificuldades da distância. Foi uma honra poder conviver com você. Obrigado por ter me proporcionado grande crescimento profissional.

Ao professor Doutor Robson, por toda essencial contribuição nesse trabalho.

Aos meus amigos de Uberlândia e do Espírito Santo. Obrigado pela amizade e colaboração. Sempre carregarei cada um comigo.

Aos produtores que me auxiliaram nas coletas, e que me permitiram conduzir esse trabalhado em suas granjas, me recebendo tão bem. O meu eterno agradecimento.

## RESUMO

Distúrbios entéricos em suínos são mais frequentemente observados na recria e terminação provocando perdas econômicas. No Espírito Santo (ES) são escassas as pesquisas sobre identificação de patógenos que são responsáveis por doenças entéricas em suínos. Objetivou-se nesse estudo determinar a presença de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos com sinais clínicos de diarreia, na região Centro-Serrana do ES através da técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR e avaliar as condições epidemiológicas das propriedades estudadas. Amostras foram coletadas em granjas com histórico de diarreia e com suspeita clínica de infecção por *Brachyspiras* spp. patogênicas, sendo obtido 30 amostras constituídas por pool de fezes de suínos com diarreia, provenientes de 30 granjas em 10 diferentes municípios do ES. *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* não foram detectadas em nenhuma das 30 propriedades analisadas (0/30), mesmo com condições propícias de baixa biosseguridade das suinoculturas, indicando que estes agentes não são importantes causadores de diarreia nesta região. O pequeno porte dessas granjas e a baixa densidade de unidades produtoras no ES, aliados ao uso de antimicrobianos na ração podem ter interferido na identificação dos agentes investigados.

**PALAVRAS-CHAVE:** qPCR, disenteria suína, colite espiroquetal, diarreia, espiroquetas patogênicas.

## ABSTRACT

Enteric disorders in pigs are more frequently observed in growing and finishing stages causing economic losses. In Espírito Santo (ES) there is a few research about pathogens that are responsible for enteric diseases in pigs. The objective of this study was to determine the presence of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pigs with clinical signs of diarrhea in the Central-Serrana region of the state of ES by real time polymerase chain reaction technique – qPCR and evaluate epidemiological conditions of the properties. Samples were collected in farms with historic of diarrhea and clinical suspicion of infection with pathogenic *Brachyspira* ssp. We obtained 30 samples that contain a pool of pig feces with diarrhea, from 30 farms in 10 different counties of ES. *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* were not detected in any of the 30 properties analyzed (0/30), even with favorable conditions of low biosecurity of swine production farms, indicating that these agents are not important cause of diarrhea in this region. The small size of these farms and the low density of production units in ES, combined with the use of antimicrobials in feed may have interfered in identifying agents investigated.

KEYWORDS: qPCR, swine dysentery, spirochaetal diarrhea, pathogenic spirochaetes.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Doenças entéricas.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Disenteria Suína.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Colite Espiroquetal .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4</b>	<b>Patogênese.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5</b>	<b>Prevalência.....</b>	<b>16</b>
<b>2.6</b>	<b>Epidemiologia.....</b>	<b>17</b>
<b>2.7</b>	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>18</b>
<b>2.8</b>	<b>Prevenção e Tratamento.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Identificação de <i>Brachyspira</i> spp. .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação das condições epidemiológicas das propriedades.....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As afecções entéricas, caracterizadas principalmente pela diarreia, são frequentes dentro da criação comercial de suínos no Brasil e no mundo, e seu diagnóstico preciso constitui-se um desafio ao suinocultor brasileiro e a toda cadeia produtiva, já que em algumas regiões do país não se tem de forma acessível ferramentas laboratoriais complementares para diagnóstico (HANSEN, 2013).

Distúrbios entéricos são mais frequentemente observados na recria e terminação provocando perdas econômicas em decorrência da redução do ganho de peso, impacto negativo na conversão alimentar, aumento da mortalidade, necessidade de manejo durante o surto, cuidados específicos com os doentes e o aumento das despesas veterinárias (HANSEN, 2013). Hansen (2006) afirma que as afecções entéricas tem morbidade alta, e a mortalidade em leitões pode ser observada entre 10 a 20%.

Por ser a causa mais comum de diarreias bacterianas em suínos, o gênero *Brachyspira* ssp. tem ganhado nos últimos anos destaque pela reemergência de casos clínicos nas principais regiões produtoras do Brasil, especialmente associadas à disenteria suína. Concomitantemente tem sido observado que a *Brachyspira hyodysenteriae* tem adquirido resistência a antimicrobianos específicos a esse patógeno, caso dos terapêuticos: tilosina, tiamulina e lincomicina (DANIEL, 2014).

Esses fatores, aliados a recente descoberta de novas espécies patogênicas para suínos, denominadas de *Brachyspira suanatina* e *Brachyspira hampsonii* (CLOTHIER et al. 2011), além dos recentes isolamentos no Brasil e nos EUA, em suinoculturas comerciais, das espécies patogênicas já conhecidas *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* (TAYLOR, ALEXANDER, 1971; TAYLOR et al., 1980), têm gerado uma grande preocupação na suinocultura nacional. Desta forma, estudos sobre patógenos mais presentes em uma criação comercial, região, estado ou país, e sobre prevalência da *Brachyspira* ssp. é de extrema relevância para a suinocultura nacional (GUEDES et al., 2011).

No Estado do Espírito Santo (ES), são escassas pesquisas sobre identificação de patógenos que são responsáveis por doenças entéricas em suínos, o que dificulta ou impossibilita a adoção de medidas apropriadas de controle, tratamentos específicos e identificação de surtos, culminando em perdas econômicas para o produtor.

Sendo assim, foi proposto nesse estudo investigar a presença de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos com sinais clínicos de diarreia, na

região Centro-Serrana do ES através da técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR, e avaliar as condições epidemiológicas das propriedades.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doenças entéricas

As doenças entéricas têm sido descritas como importante fator de desuniformidade de lotes e de desequilíbrio nos indicadores zootécnicos da suinocultura brasileira e mundial. Essas patologias tem alta prevalência, devido, principalmente, ao tipo de manejo encontrado nas granjas, o confinamento total dos animais, sendo que seu diagnóstico e controle são desafios iminentes, isso por conta da participação de vários fatores infecciosos e não infecciosos na etiopatogenia, atuando de maneira a cooperar para a disposição do quadro patológico e maximizando o seu impacto (MORES, ZANELLA, 2005).

As doenças entéricas são, ao lado de enfermidades do trato respiratório, os desafios sanitários mais frequentes na fase de recria e terminação da suinocultura moderna (GUEDES, 2010).

A diarreia, principal afecção entérica, é definida como a emissão de fezes com um conteúdo elevado de água em proporção à matéria seca. De acordo com o conteúdo em água as fezes passam de mole a pastosas e, por último, totalmente líquidas. A consistência pode variar de pastosa ou mucosa a líquida, e a cor pode ser amarelada, cimento, sanguinolenta ou vermelha (HANSEN, 2013). É verificado na diarreia perdas de fluidos, com consequente desidratação, depleção de eletrólitos e desequilíbrio ácido-básico podendo ser fatal em leitões se não ocorrer tratamento adequada (LIEBLER-TENORIO et al., 2006).

Vários são os agentes implicados como possíveis causadores de diarreia em suínos, nas fases de recria e terminação, sendo esses: *Lawsonia intracellularis* geradora da enteropatia proliferativa suína, igualmente conhecida como ileíte; salmonelose suína causada pela *Salmonella entérica* sorovar *Typhimurium*; o Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) agente da síndrome denominada de Circovirose Suína e finalmente o *Trichuris suis* causador da Tricuríase Intestinal. Essas são as infecções mais prevalentes nesta faixa etária (STEGE et al., 2000; SUH, SONG, 2005).

## 2.2 Disenteria Suína

O gênero *Brachyspira* spp. se destaca como o mais comum agente desencadeador das diarreias bacteriana em suínos nos principais países produtores, nas fases de recria e terminação (LA et al., 2003). Outras bactérias associadas à patogênese das enterites nas fases finais de produção são a *Salmonella* spp. (SCHWARTZ, 1999), a *Lawsonia intracellularis* (MCORIST, GEBHART, 1999), a *Escherichia coli* enteropatogênica (JACOBSON et al., 2003).

Esse gênero é composto por sete espécies, descritas como: *B. aalborgi* (HOVIND-HOUGEN et al., 1982), *B. alvinipulli* (SWAYNE et al., 1995), *B. hyodysenteriae* (TAYLOR, ALEXANDER, 1971), *B. innocens* (STANTON, 1992), *B. intermedia* e *B. murdochii* (STANTON et al., 1997), e *B. pilosicoli* (TAYLOR et al., 1980). Destaca-se que a *B. alvinipulli* e a *B. murdochii* não são isoladas dentro do intestino de suínos, as demais espécies são (GUEDES, 2014).

Recentemente na Escandinávia foi isolada uma cepa patogênica em suínos que se diferenciava geneticamente de todas as outras espécies já descritas. Assim, surgiu uma nova espécie, denominada *B. suanatina*. Os quadros clínicos observados nos experimentos e forma de crescimento *in vitro* foram análogos aos da *Brachyspira hyodysenteriae* (RASBACK et al., 2007).

O ressurgimento das doenças entéricas causadas por espiroquetas é evidente, já que por muito tempo, aproximadamente 20 anos, a disenteria suína ficou ausente nos rebanhos da América do Norte, porém inúmeros surtos dessa patologia têm sido notificados nos EUA e no Canadá recentemente. Essa reemergência é objeto de estudo de diversas pesquisas que levaram a identificação de novas espécies patogênicas, nomeadas de “Novel Strong Hemolytic-*Brachyspira*” (NSH-*Brachyspira*). A mais recente descoberta do gênero *Brachyspira* é chamada de *B. hampsonii* (CHANDLER et al., 2012). A descoberta da *B. suanatina* e da *B. hampsonii* vêm confirmar a grande necessidade do isolamento e caracterização detalhada, para identificação e reconhecimento de novas cepas patogênicas (GUEDES, 2014).

A presença da *Brachyspira hyodysenteriae* é observada nas infecções por quadros de diarreia mucóide, concomitantes com hemorragia na maior parte dos casos, sendo essas ligadas a lesões muco-hemorrágicas achadas no colón ou no ceco (GUEDES, BARCELLOS, 2012).

A *Brachyspira hyodysenteriae*, agente da disenteria suína, tem grande importância econômica, afetando suínos de crescimento e terminação, entre 15 e 70 Kg de peso vivo (GUEDES 2005).

É uma bactéria gram-negativa, com formato espiralado, anaeróbia estrita, mas com um determinado grau de tolerância ao oxigênio de mais ou menos 1% (HAMPSON et al., 1997).

No seu cultivo em ágar sangue, a *B. hyodysenteriae* produz forte hemólise (GUEDES, BARCELLOS, 2012). Composta por um cilindro protoplasmático com presença de envelope trilaminar. Tem de 16 a 24 flagelos periplasmáticos implantados em cada ponta da bactéria que envolve a célula no seu centro. A presença de flagelos confere a esse patógeno a característica de ser móvel exercendo movimentos do tipo “serpentino” em meio de cultura semi-sólido (HAMPSON et al., 1997).

A disenteria suína gera tifocolite fibrino-hemorrágica, quadros diarreicos graves e exacerbada perda da condição corporal. Em se tratando de disenteria o período de incubação é bastante variável, frequentemente influenciado pelo status imunológico do animal, virulência da cepa e carga infectante envolvida na infecção. De forma geral é verificado sinais clínicos após 10 a 14 dias de vida (HAMPSON, TROTT, 2006).

Macroscopicamente, na disenteria, a fase aguda é caracterizada por hiperemia acentuada da mucosa, edema de mesocôlon, linfonodos mesentéricos inflamados e aumentados em volume, além de conteúdo rico em muco e fibrina associada muitas vezes com sangue. Em lesões crônicas comumente é observado exsudato fibrinoso aparente associado à necrose exacerbada (HAMPSON et al., 2006).

Porém, a morbidade e a mortalidade da disenteria são influenciadas por presença de condições estressantes, tais como: tamanho do lote, fluxo de produção, peso dos animais, circulação em baias e mistura de animais, superlotação, alterações de formulação de rações, rações com alta concentração de energia e baixa concentração de fibras e rações deficientes em vitamina E e microminerais, por exemplo o selênio. Em instalações úmidas e frias e com higiene deficiente, os prejuízos são mais acentuados, causando impacto negativo (GUEDES, BARCELLOS, 2012).

### 2.3 ColiteEspiroquetal

A *Brachyspira pilosicoli* provoca uma doença chamada de colite espiroquetal, é uma espiroqueta classificada como gram-negativa, anaeróbia, flagelada, que produz

fraca hemólise em ágar sangue (GUEDES, 2005), a qual tende a ser autolimitante e se caracteriza por colite moderada, diarreia mucóide e crescimento retardado e de aparecimento nos intervalos terapêuticos (GUEDES, BARCELLOS, 2012).

Clinicamente a colite é caracterizada por fezes pastosas e de cor acinzentadas, semelhantes a cimento fresco, dificilmente há presença de sangue nas fezes. O período de incubação é entre 3 a 20 dias e a morbidade chega a 50% (GUEDES, BARCELLOS, 2012). Alguns animais podem se infectar e permanecer sem sintomas aparentes, mas mesmo há evidente interferência no crescimento, sendo que, de forma geral, não há mortalidade nos lotes afetados (DUHAMEL et al., 1995).

A *B. pilosicoli* é visivelmente mais curta e fina, quando relacionada à *B. hyodysenteriae*, medindo quase seis  $\mu\text{m}$  de comprimento e  $0,3\mu\text{m}$  de diâmetro, sendo possuidora de 8 a 10 flagelos periplasmáticos implantados, se desenvolvendo em meio anaeróbio em temperaturas de 37 a 42°C, e causa diminuta hemólise em meio sólido enriquecido com sangue (THOMSON et al., 1998).

Essa enfermidade é mais frequentemente observada em suínos nas fases de crescimento e terminação, correspondendo à idade de 60 a 100 dias, sendo especialmente observadas nos primeiros dias ou semanas após mudanças de ambiente ou alojamento nas instalações de recria, podendo ocorrer independente do tipo de manejo seguido na granja e da forma de arraçoamento dos animais (GUEDES, BARCELLOS, 2012).

## 2.4 Patogênese

O suíno é o reservatório natural de espiroquetas e a única espécie sensível à infecção (GUEDES, BARCELLOS, 2012), apesar do isolamento destas em aves (JANSSON et al., 2001; JANSSON et al., 2004), cães (FELLSTROM et al., 2001) e roedores (BACKHANS et al., 2011), considerados reservatórios secundários e disseminadores da infecção (HAMPSON, Trott, 2006).

A patogenia tanto da disenteria suína bem como da colite espiroquetal não estão completamente esclarecidas. A infecção inicia-se quando os leitões ingerem a *Brachyspira* spp. por via oral que se dá a partir d'água, ração ou do meio ambiente contaminado com fezes. Uma vez atingido o intestino grosso, tanto a *B. pilosicoli* como a *B. hyodysenteriae* têm quimiotaxia (processo ativo) por muco, que se encontra aderido aos enterócitos, células intestinais, e no interior das criptas da mucosa intestinal, pode-

se verificar macroscopicamente o aumento de volume dos linfonodos mesentéricos (NARESH, HAMPSON, 2010).

Na infecção com *B. pilosicolis* sabe que ocorre um tipo de propagação bacteriana maciça no epitélio intestinal o que leva na interferência da absorção e causa uma diarreia mucóide (DUHAMEL, 1996). As espiroquetas possuem um movimento de deslocamento espiralado que auxilia na penetração por meio do muco até o nível superficial do epitélio. Nessa associação da espiroqueta com a membrana do enterócito observa-se uma clara desestruturação das células que se manifesta por modificações no citoesqueleto, abrangendo destruição dos microfilamentos da membrana terminal no local da adesão e pelo dano gradual de microvilosidades (DUHAMEL et al., 1995).

As alterações na superfície epitelial causam esgotamento da capacidade de absorção do intestino grosso (DUHAMEL, 1996). Foi observado também que há outro mecanismo de patogenia da *B. pilosicoli* que é a capacidade de ligação da bactéria com o receptor glicose-galactose da célula hospedeira, essa proteína bacteriana é codificada pelo gene *mglB*. Esse gene gera a síntese de um produto de expressão que afeta diretamente na aptidão da *B. pilosicoli* em causar infecção nas células do intestino (ZHANG et al., 1998).

Já a patogênese envolvendo a *B. hyodysenteriae* parece ser mais complexa e não está totalmente elucidada (LIEBLER-TENORIO et al., 2006). Ela se utiliza também do muco para associar-se ao epitélio intestinal e penetrar no enterócito (MILNER, SELLWOOD, 1994). Essa associação se dá por ação esfoliativa, causando assim erosão da mucosa. Há estímulo à hiperplasia de células caliciformes em resposta a lesão, aumentando a produção de muco (KENNEDY et al., 1988).

É observado nessa infecção que ocorre influência negativa na absorção de água e eletrólitos, em decorrência à disfunção dos canais transportadores epiteliais de íons sódio e cloreto (LIEBLER-TENORIO et al., 2006). Nos animais afetados a concentração molar de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e guanosina monofosfato cíclica (cGMP), na mucosa do colon são normais, mas a sua resposta aos estímulos fica comprovadamente retardada (ARGENZIO, 1980). Assim, a *B. hyodysenteriae* age destruindo o intestino grosso do suíno, provocando uma necrose superficial do órgão e impedindo que ele faça a absorção normal de água. Dessa forma ocorre a diarreia, inclusive com traços de sangue. Os leitões se apresentam com apatia e estado febril, não se alimentam corretamente ou ocorre aumento da conversão alimentar, quando não há evolução para o óbito (GUEDES, 2005).

## 2.5 Prevalência

Nos principais países produtores de suínos na Europa, em locais onde possuem grande concentração de explorações agropecuárias de suinocultura próximas uma das outras, as contaminações por *B. hyodysenteriae* são bastante frequentes (THOMSON et al., 1998). Na Alemanha, em estudo em que se avaliou 2975 amostras de fezes, através de cultura e diferenciação bioquímica, foram relacionados 59,1% do total de amostras positivas para presença da *B. hyodysenteriae*, houve também poucos casos (1,8%) de infecção com *B. pilosicoli* (VERSPOHL et al., 2001).

Na Dinamarca, em estudo realizado tendo por base 72 granjas com ocorrências de diarreias, foi diagnosticado *B. hyodysenteriae* em 14% (MOLLER et al., 1998). Na Suécia, foi observado prevalência de 27% de *B. hyodysenteriae* e 18% de *B. pilosicoli*, nas 894 granjas de suínos com sinais clínicos de diarreia (FELLSTROM et al., 2004). Na Polônia, das 23 criações com sinais clínicos de diarreia, 34,8% apresentaram infecção para a *B. hyodysenteriae* (PLAWINSKA et al., 2003).

Não obstante, na Espanha, avaliando-se 225 explorações de suínos 38,5% foram positivas para *B. hyodysenteriae* (CARVAJAL et al., 2006). No Reino Unido a *B. hyodysenteriae* foi observada, primeiramente, como agente de diarreias em 7% dos rebanhos estudados (THOMSON et al., 1998), posteriormente, em outro estudo, esse agente foi isolado com prevalência 10,5% das criações (PEARCE, 1999), e finalmente a prevalência foi descrita, em novo estudo, como sendo de 13% (THOMSON et al., 2001).

Esses achados nas principais regiões produtoras do mundo demonstram e reforçam a ampla distribuição e importância no cenário da sanidade mundial que a *B. hyodysenteriae* e a *B. pilosicoli* se encontram (CALDERARO et al., 2001).

No contexto brasileiro, em Santa Catarina, avaliando granjas de suínos de engorda, foram encontradas prevalências de 6% para a *B. hyodysenteriae* e de 8,8% para a *B. pilosicoli* como agentes primários de diarreia (MENIN et al., 2008).

No Rio Grande do Sul, Barcellos et al. (2000) observaram, em suinocultura de subsistência, uma prevalência de 35,3% para *B. hyodysenteriae* de 41,2% para *B. pilosicoli*. Mais adiante, Barcellos et al. (2003) observaram prevalência de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, em estudo comparativo de granjas que não possuíam programas profiláticos de antimicrobianos e que possuíam. A *B. hyodysenteriae* e *B.*

*pilosicoli* foram detectadas respectivamente em 0% e 6,25% das granjas medicadas e 31,8% e 45,5% das granjas não medicadas.

Em outro estudo conduzido com rebanhos de suínos nas principais regiões produtoras de suínos no Brasil, nas fases finais de produção, utilizando o multiplex PCR, foram encontrados 1,4% amostras positivas para *B. hyodysenteriae* e 1% para *B. pilosicoli*, como agentes únicos (BACCARO et al., 2003). Em Minas Gerais utilizou-se a PCR para detecção da *Brachyspira* ssp., e foi verificado a presença para a *B. pilosicoli* em somente dois rebanhos dos 46 analisados, não sendo encontrado nenhum rebanho avaliado positivo para *B. hyodysenteriae* em pools de amostras (VIOTT, 2010).

Mais recentemente, a partir de 2010, no laboratório de Patologia Animal da UFMG foram relatados dezoito novos surtos de disenteria suína nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. Esses dados são importantes, pois o histórico de infecções, na suinocultura brasileira, anterior a esse período, estava sempre ligado a casos esporádicos e de pouca relevância econômica (DANIEL, 2014). A reemergência dessa enfermidade no Brasil tem desencadeado uma grande preocupação para produtores e técnicos (KIEVITSBOSCH, 2013).

## 2.6 Epidemiologia

Suínos de todas as idades são susceptíveis a doença, sendo mais comum a ocorrência de infecção nos animais que estão na recria e terminação (HAMPSON, Trott, 2006).

Os leitões se infectam pela ingestão de espiroquetas, pela via feco-oral, a partir de ambiente contaminado por animais com sinais clínicos ou assintomáticos que estejam excretando espiroquetas nas fezes (HAMPSON et al., 1997). A troca no tipo de ração, movimentação de animais, mistura de lotes na fase de crescimento ou alteração da medicação antimicrobiana da ração estão diretamente relacionados ao aparecimento da infecção (BARCELLOS, 2000).

A sobrevivência da *B. pilosicoli* foi considerada superior à da *B. hyodysenteriae*, calculada em 12,2 dias a 4°C; 3,5 dias a 24°C e 1,2 dias a 37°C (BARCELLOS et al., 2002). Porém *B. hyodysenteriae*, quando combinada às fezes úmidas, pode sobreviver por até 112 dias. É importante se ressaltar que a longa sobrevivência da *B. hyodysenteriae* também é observada nas fezes de roedores, assim se as granjas não possuem programas de controle de pragas, as infecções podem perdurar por um longo

tempo (KIEVITSBOSCH, 2013), pois os ratos são importantes reservatórios, juntamente com os camundongos (HAMPSON et al., 1997).

Na década de 1990 a incidência de doenças ligadas às espécies patogênicas do gênero *Brachyspira* em suínos, nos principais países produtores, diminuiu, porém, a detecção desses agentes tem aumentado recentemente. Esse ressurgimento pode estar relacionado ao desenvolvimento de resistência a antibióticos (CLOTHIER et al., 2011).

Na Europa já foi verificado um elevado nível de resistência da *Brachyspira* ssp. aos antimicrobianos, comumente empregados no controle da infecção ou quando esses fármacos são usados em baixas dosagens nas dietas suínas (LOBOVÁ et al., 2004, PRINGLE et al., 2006, ROHDE et al., 2004). Os maiores níveis de resistência têm ocorrido notadamente entre estirpes de *B. hyodysenteriae*, mas uma grande tendência também tem sido observada para *B. pilosicoli* (LOBOVÁ et al., 2004; ROHDE et al., 2004). Isso pode estar diretamente relacionado com o ressurgimento de doenças associadas à *Brachyspira* ssp. (CLOTHIER et al., 2011).

## 2.7 Diagnóstico

Para se estabelecer um diagnóstico preciso do gênero *Brachyspira*, os dados clínicos dos animais portadores, as alterações macroscópicas e os achados histológicos são fundamentais. Porém, para um efetivo diagnóstico, deve-se utilizar o isolamento bacteriano e identificação bioquímica ou se aplicar técnicas moleculares nas amostras de fezes ou da mucosa afetada dos suínos. Alguns testes sorológicos como aglutinação microscópica, imunofluorescência indireta, hemólise passiva, ELISA e imunodifusão podem ser aplicados, mas somente comportam identificação de positividade de rebanho, além de ser sorotipo específico (VIOTT, 2010; DANIEL, 2014).

Os testes moleculares, como a PCR (*polymerase chain reaction*), oportunizaram a identificação mais rápida dos agentes, do que outros métodos, de forma altamente específica sendo capazes de identificar facilmente a *Brachyspira* ssp. Esses testes foram concebidos principalmente para aumentar a velocidade do processo diagnóstico, sendo ferramenta a princípio aplicável a surtos, diminuindo a necessidade de equipamentos especiais aplicados nas técnicas de cultivo (ATYEO et al., 1998). Quando foram aplicados em amostras de fezes, a PCR demonstrou sensibilidade e especificidade superiores ao isolamento, e foi largamente implantada nos laboratórios (LA et al., 2003).

Houve desenvolvimento de testes de PCR individuais (PCR convencional) para cada espécie de *Brachyspira*, e técnicas de amplificação dupla ou múltipla associada aos agentes entéricos comumente relatados e patogênicos do gênero *Brachyspira*. A PCR *duplex* é capaz de detectar *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* ao mesmo tempo e tem apresentado bons efeitos quanto à sensibilidade e especificidade quando aplicados em DNA (ATYEO et al., 1998; LA et al., 2003; LA et al., 2006).

Além dessas, e com o advento da PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico da disenteria suína houve um aumento significativo da sensibilidade da detecção de *Brachyspira* ssp., em relação à PCR convencional. Embora a PCR convencional seja um método específico e altamente sensível, quando há o processamento, em laboratório, de um grande número de amostras, essa técnica se mostra um pouco mais lenta. Isso se dá porque a detecção do produto de PCR por electroforese em gel, empregado no método convencional, requer tempo adicional para obter o resultado final. Também há a possibilidade nas diversas etapas da análise de PCR de ocorrer contaminação laboratorial. (AKASE et al., 2009).

Os ensaios de PCR são concebidos para amplificação de segmentos dos genes ribossomais. Esses são particularmente importantes para identificação da *Brachyspira hyodysenteriae*, sendo os principais: 16S rRNA, 23S, oxidase NADH (nox) e hemolysin (tly). Destaca-se como melhor indicador para diagnóstico de suínos com disenteria suína o gene nox, porque é específico e facilmente diferenciável das outras espécies do gênero *Brachyspira* (LA et al., 2003; LA et al., 2006).

Apesar das facilidades encontradas no PCR, a técnica considerada como mais eficiente (“padrão ouro”) para diagnóstico laboratorial das infecções intestinais por espiroquetas em suínos é o isolamento bacteriano em meio sólido, que detecta pequenas quantidades de bactérias nas fezes, tanto para a disenteria suína como para acolite espiroquetal (BARCELLOS et al., 2010). O cultivo bacteriano deve ser feito em meio anaeróbico, posteriormente deve ser feito a identificação fenotípica da bactéria e testes bioquímicos. O cultivo pode ser conseguido através de amostras de fezes, suabes retais ou conteúdo intestinal do ceco. Esses materiais devem ser mantidos sob temperatura de refrigeração até o exame. O mais importante ponto crítico para o sucesso do isolamento é o tempo entre a coleta e a chegada ao laboratório, que deve ser de poucas horas (HAMPSON et al., 2006), como observado em estudo proposto por Neves (2012), que fez isolamento com intervalo médio entre a coleta e o início das análises em 12 horas.

Outra limitação dessa técnica é o crescimento fastidioso da *Brachyspira* spp., que de forma geral podem ser visualizadas a partir de 72h, mas em alguns casos, pode ser necessária a incubação por até 10 dias em meio seletivos (DUHAMEL, JOENS, 1994), e os resultados nem sempre são definitivos. A bactéria também possui alta necessidade nutricional e há características fenotípicas parecidas entre as espécies patogênicas e não patogênicas (LA, HAMPSON, 2001; ELDER et al., 1994).

O diagnóstico histopatológico é uma ferramenta que pode ser utilizada quando se possui principalmente fragmentos de colón (intestino grosso) de animais doentes, fixados em formol a 10%. Nos cortes histológicos corados em Hematoxilina e Eosina, para detecção de Colite Espiroquetal, há possibilidade de visualizar a presença de espiroquetas intimamente aderidas na mucosa ou no lúmen das criptas, formando a lesão de “falsa borda em escova” (TROTT et al., 1996). A evidenciação de bactérias ao corte pode se dar por coloração pela prata de Wharthin-Starry ou pela imuno-histoquímica. A coloração pela prata é uma técnica altamente inespecífica, pois ela permite somente a visualização da morfologia da bactéria indicando que se trata de uma espiroqueta, e devem-se associar a esses achados os dados clínicos e as alterações macroscópicas para um diagnóstico final de *Brachyspira* spp. (PAULOVICH et al., 2004; VIOTT, 2010). Já a imuno-histoquímica permite a detecção do gênero *Brachyspira* utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais específicos, sem diferenciação entre espécies patogênicas ou apatogênicas (HAMPSON et al., 2006).

Ainda se tratando de detecção específica em cortes histológicos, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH - Fluorescent *in situ* hybridization) é uma alternativa eficaz para agentes infecciosos. O princípio básico é o anelamento da sonda com a sequência alvo, sendo que a maioria das aplicações da FISH tem como alvo o RNA ribossomal. Para a visualização do agente é usado o microscópio epifluorescente. A FISH é utilizada para identificação de diferentes espécies de *Brachyspiras* (JENSEN et al, 2000; PLOEG, 2000).

## 2.8 Prevenção e Tratamento

A prevenção das diarreias pode ser atingida através de simples práticas de manejo e boas práticas de higiene das granjas de suínos, tais como: controle da qualidade ambiental, vazio sanitário, separação por idade e limpeza das instalações entre as introduções de lotes de suínos (LA et al., 2011; WEISSENBÖCK, 2005;

NOVOTNÁ, SKARDOVÁ, 2002). Porém, as condutas terapêuticas e/ou preventivas contra os agentes das enterites são muitas vezes diferentes, demonstrando, consequentemente, a importância do diagnóstico correto para que sejam adotadas as medidas mais adequadas (GUEDES, 2010).

Em criações com surtos de *Brachyspira* spp. os suínos devem ser tratados com a administração de antibióticos na água, sendo este um tratamento simples de ser administrado, uma vez que o consumo de ração é diminuído vertiginosamente no início da infecção. Já os animais que se apresentam demasiadamente afetados, deve-se utilizar a medicação parenteral, o que pode se tornar impraticável em granjas com um grande número de matrizes alojadas (HARRIS et al., 2006). Os antibióticos mais utilizados, e a princípio mais eficazes, para a terapêutica desta infecção são: lincomicina, gentamicina, tiamulina, valnemulina, salinomicina e o carbadox (KARLSSON et al., 2004; JACELA et al., 2009).

Para o gênero *Brachyspira* spp., estudos demonstram, nos últimos anos, uma diminuição sensível na suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de campo frente às drogas que comumente são usadas nos tratamentos terapêuticos: tiamulina, lincomicina, valnemulina e outras (LOBOVÁ et al., 2004). A ineficácia clínica destas drogas indica um risco potencial patogênico, sendo destacado que repetido uso de tiamulina em granjas foi a causa de aumento na aparição de clones resistentes de *Brachyspira* spp. (DUINHOF et al., 2008).

O uso indiscriminado de promotores de crescimento, que são amplamente utilizados na suinocultura, é um agravante, pois isso gera um aumento sensível da resistência dos micróbios (BOWER, DAESCHEL, 1999).

Já foi proposto, em estudos conduzidos por Šperling et al. (2014) o uso de substância terapêutica alternativa aos antimicrobianos no tratamento de afecção por *B. hyodysenteriae*, no entanto, não foi confirmado nenhum efeito terapêutico no uso de quelato de zinco sobre a mitigação dos sinais clínicos e nem na supressão do patógeno. Na prática, o quelato de zinco é utilizado somente na prevenção do desenvolvimento de uma infecção clínica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em rebanhos com histórico de diarreia e com suspeita clínica de infecção por *Brachyspira* ssp. patogênicas. Assim, se obtiveram 30 amostras constituídas por pool de fezes de suínos com diarreia, provenientes de 30 granjas em 10 diferentes municípios do Estado do Espírito Santo, localizados na Região Centro-Serrana.

O aspecto do conteúdo diarreico dos leitões nas granjas amostradas era de fezes pastosas, com coloração semelhante a cimento fresco (esverdeadas), e com acentuada quantidade de muco. Em 3 granjas havia leitões com casos de diarreia com presença de pequena quantidade sangue.

As amostras eram formadas por pools de fezes de 3 a 5 animais, que se encontravam nas fases de crescimento/terminação (61 a 140 dias de vida) e que apresentavam diarreia no momento da coleta, sendo obtidas durante o período de janeiro de 2015 a março de 2015. A densidade média das granjas nas fases amostradas era de 0,045m<sup>2</sup>/kg de peso vivo.

O número de amostras por município foi: Santa Maria de Jetibá (10/30), Colatina (6/30), Santa Teresa (3/30), Domingos Martins (2/30), Itaguaçu (2/30), Laranja da Terra (2/30), Marilândia (2/30), Baixo Guandu (1/30), Governador Lindenberg (1/30), e São Roque do Canaã (1/30) (Figura 01).

Identificando os animais com suspeita de infecção por *Brachyspira* ssp. patogênicas e com diagnóstico clínico de diarreia, as fezes foram coletadas, com ajuda de espátulas e suabes retais, os quais foram acondicionadas em potes plásticos, limpos e desinfetados com álcool 70% p/p. As amostras eram acondicionadas em caixas isotérmicas após a coleta na granja e transportadas para serem submetidas ao congelamento (-21°C), até o momento do envio para o laboratório.

As amostras congeladas foram enviadas para análise, em caixas isotérmicas com gelo reciclável. O tempo máximo de espera para análise das amostras foi de 3 meses. O tempo de transporte ao laboratório foi inferior a 18h.

Foi aplicado um questionário epidemiológico (Anexo I) em todas as granjas para identificação dos fatores de risco, onde se colheu informações sobre: dados dos produtores e propriedades, acesso ao mercado, presença de responsável técnico, número de animais na granja, sistema de criação, finalidade da produção, fonte de água, destino dos dejetos, destino dos cadáveres, lavanderia, tipo de instalação, animais de reposição,

biossegurança da granja, controle sanitário, tipo de alimentação e controle e registro de entrada de pessoas e veículos.



Figura 01 – Representação do mapa do Espírito Santo, com destaque aos municípios que possuíam suinoculturas amostradas.

A ração utilizada nas suinoculturas era à base de milho e farelo de soja. Em todas as granjas (30/30) eram adicionados antimicrobianos na mistura da ração. Em 23 granjas (23/30) era utilizado um produto comercial a base de tiamulina (100mg/kg). E em 7 granjas (7/30) era utilizado outro produto comercial a base de doxiciclina (190mg/kg).

O material colhido nas granjas foi submetido à análise por qPCR (PCR em Tempo Real), em laboratório comercial localizado no município de Cachoeirinha, no Estado do Rio Grande do Sul, em triplicata para identificação de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli*. Foram adicionados 4 controles negativos para monitorar exposição à falsos positivos no ensaio, e 2 controles positivos de amplificação obtidos de amostras positivas a campo.

As amostras passaram inicialmente por lise celular utilizando o reagente Prep (NewGene®), em seguida procedeu-se a extração de ácidos nucleicos utilizando o reagente Preamp (NewGene®). Após extração, realizou-se as amplificações com reagentes específicos para cada modalidade (BPamp e BHamp) (NewGene®) com metodologia in house, de acordo com o fabricante.

Na realização da lise celular, suabes estéreis eram introduzidos nas amostras de fezes e a ponta dos mesmos eram mergulhadas em 2,5 mL do reagente Prep, em tubos plásticos de 5 ml. Para assegurar lise da amostra, agitaram-se os tubos no vortex durante 10 minutos, a 60°C.

Para purificação de DNA, a partir das amostras previamente processadas, foram transferidos 500 µL de conteúdo das amostras pré-processadas a partir do reagente Prep para microtubos de 1,5mL, devidamente identificados e preparados com 20 µL de sílica. Esses microtubos passaram pelo vortex e foram mantidos por 10 minutos à temperatura ambiente, os quais foram agitados a cada 2 minutos por inversão. Em seguida os microtubos foram centrifugados por 1 minuto, à 10000 rpm, e o sobrenadante da solução foi descartado.

Após centrifugação, foi obtido um pellet de sílica, o qual passou por lavagens sequenciais (reagente Preamp) com adição de 150 µL de solução de lavagem (tiocianato de guanidina 5M e Tris HCl 0,1 M), a qual passou pelo vortex e foi centrifugada por 1 min à 10000 rpm e descartado o sobrenadante. A segunda lavagem foi feita com alíquota de 150 µL de solução de etanol 75%, usando o vortex e centrifugando por 1 min à 10000 rpm e descartado o sobrenadante. A terceira lavagem foi realizada com a com alíquota de 150 µL de solução de etanol absoluto, utilizando o vortex e centrifugando por 1 min à 10000 rpm e descartado o sobrenadante.

Após as lavagens adicionou-se 50 µL de solução de eluição (Tris 10 mM e EDTA 1 mM), finalizando a extração com o vortex. Os microtubos foram mantidos em geladeira (2 à 5°C), até o momento para utilização na amplificação.

Para a realização da amplificação do DNA de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli*, foram utilizados kits comerciais BHamp® e BPamp® (NewGene®), seguindo protocolo de acordo com o fabricante.

A amplificação foi realizada com o equipamento Step One Plus™ System (Thermo Fisher Scientific), adicionou-se às amostras já extraídas kit composto por tampão, dNTP's, água, *primers* e sonda. Adicionou-se 8µL de Taq Polimerase em cada tubo e posteriormente essa mistura foi homogeneizada e centrifugada por 30 segundo a 10.000 rpm. Posteriormente, uma alíquota de 28 µL foi adicionado nos poços da placa, tipo S de 24 canaletas.

A placa foi acondicionada no termociclador Minicycler de qPCR, identificando as amostras, NTCs (controle negativo de amplificação) e Standards (controles positivos de amplificação). Utilizou-se os seguintes corantes: FAM como *Reporter* e IOWA BLACK FQ (None) como *Quencher*. Iniciou-se o programa com 1 ciclo (1 repetição) de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos. Depois, 40 ciclos (40 repetições) de desnaturação de 95°C por 20 segundos. Ocorreu o anelamento de *primers* a 55°C por 40 segundos e extensão de 72°C por 60 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 3 minutos.

Os produtos foram visualizados em transiluminador UV, e com o software Step One™ v2.2.2 (Applied Biosystems) os resultados foram avaliados, determinando e quantificando os produtos através de ferramentas: Threshold e Baseline.

Os resultados foram tabulados e posteriormente realizou-se uma análise descritiva dos dados.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

##### **4.1 Identificação de *Brachyspira* spp.**

Esse é o primeiro estudo no Estado do Espírito Santo sobre investigação do gênero *Brachyspira* spp. em rebanhos suínos comerciais. A *B. hyodysenteriae* e a *B. pilosicoli* não foram detectadas em nenhuma das 30 propriedades analisadas (Figura 2 e Figura 3).

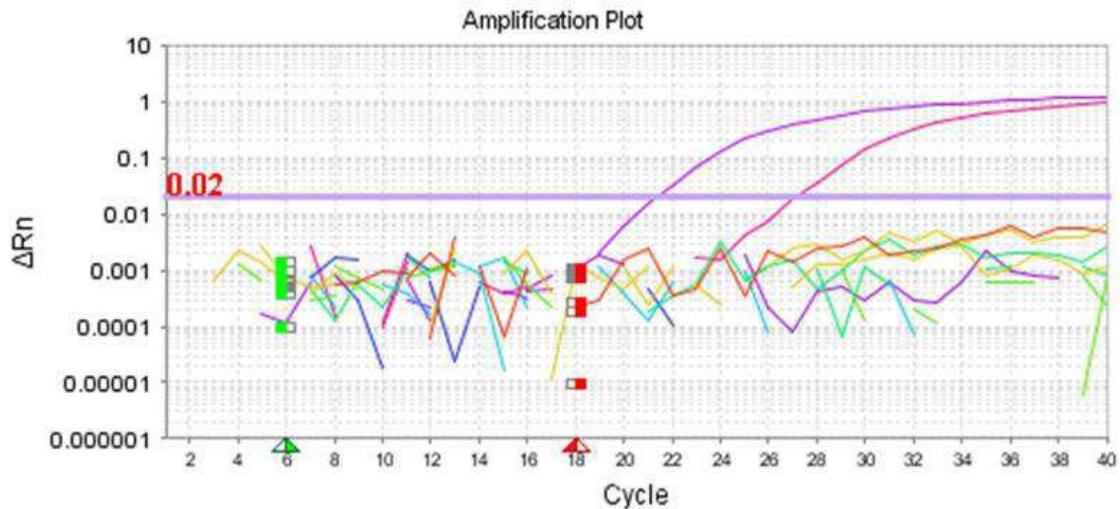


Figura 2. Curvas de amplificação obtidas na análise de *B. pilosicoli*, pela técnica de PCR em Tempo Real, a partir de fezes de suínos com diarreia.

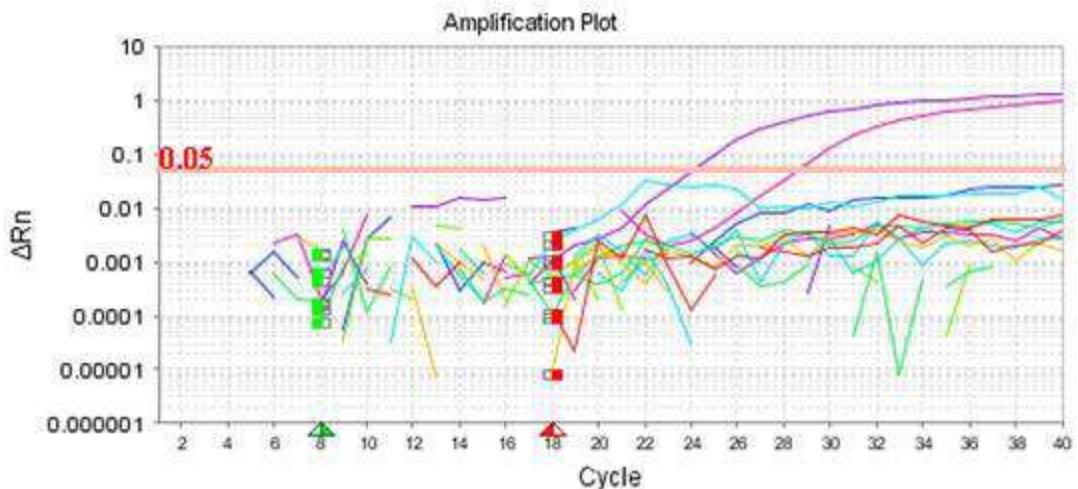


Figura 3. Curvas de amplificação obtidas na análise de *B. hyodysenteriae*, pela técnica de PCR em Tempo Real, a partir de fezes de suínos com diarreia.

Nos dois primeiros estudos conduzidos no Brasil, por Baccaro et al. (2003) e Viott (2010), com uso da PCR, observou-se uma frequência baixa dos agentes *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. A frequência, do primeiro estudo, para o gênero *Brachyspira* ssp. Em 70 granjas comerciais de vários Estados brasileiros (São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás) foi de 1,4% de amostras positivas para *B. hyodysenteriae*, e 1% para *B. pilosicoli*, em 541 amostras de fezes de suínos (BACCARO et al., 2003).

No segundo estudo, conduzido em rebanhos de Minas Gerais, em amostras formadas por pool de fezes de 10 a 15 animais, só foi observada positividade de 0,04 % para a *B. pilosicoli*, a qual foi diagnosticada em dois rebanhos dos 46 analisados, não sendo encontrado nenhum rebanho avaliado positivo para *B. hyodysenteriae* (VIOTT,

2010). Estudos tem demonstrado que fatores como variações no protocolo de extração de DNA e o uso de amostras formadas por pool de fezes podem interferir negativamente no teste de PCR com redução da sensibilidade (CHIRIBOGA et al., 1999).

No Estado do Mato Grosso, empregando-se testes moleculares, foi observada uma frequência relativamente baixa também. Nessa pesquisa a *B. hyodysenteriae* foi observada em 3,40% das amostras (5/147). Segundo aos mesmos autores a variação na prevalência dos enteropatógenos nos rebanhos suínos provavelmente está intimamente ligada aos modos gerais de manejo, eficácia da infecciosidade dos agentes, capacitação gastrointestinal, ao sistema imunitário do rebanho, nutrição, planejamento de vacinação, uso de antibióticos e aos fatores que promovem o estresse (OLIVEIRA FILHO et al. 2010).

No presente estudo, apesar de se saber previamente que o uso de medicamentos era feito em todas as granjas, se tentou simular o que é rotineiramente realizado a campo pelos profissionais especialistas em suínos, na tentativa de estabelecer um diagnóstico preciso para o agente causador de diarreias com base na sintomatologia clínica. A presença dos antibióticos na ração é um fator que pode ter contribuído para que não fosse detectado o microrganismo, que possui crescimento fastidioso.

É extremamente importante salientar que o uso de antimicrobianos na forma preventiva, na ração, pode disfarçar a doença e dificultar o seu diagnóstico (GUEDES, 2010). O uso de antimicrobianos pode também impedir o isolamento de determinadas espiroquetas de materiais fecais conforme demonstraram Heinonen et al. (1998) e Harris et al. (2006). Estes últimos autores analisaram o uso de antibióticos via ração, para prevenção ou tratamento de afecções entéricas e afirmam que esse uso interfere negativamente na quantidade de organismos viáveis excretados no bolo fecal, e que por sua vez interfere também negativamente nos testes diagnósticos empregados para detecção do gênero *Brachyspira* spp.

Em estudo conduzido por Barcellos et al. (2003), no Rio Grande do Sul, a identificação da *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* entre as criações que empregavam antimicrobianos na alimentação dos leitões, o número de isolamentos foi 0% de 12,5%, respectivamente. Já nas granjas não medicadas o resultado foi respectivamente de 31,8% e 45,5%. Antibioticoterapia aliada a infecções mistas por espiroquetas pode reduzir as chances de identificação de *B. pilosicoli* (STAHL et al., 2011).

A dificuldade no isolamento e identificação de espécies de *Brachyspira* também foi relatada por Hampson e Trott (2006) e Neves (2012). Esses autores levantam

dificuldades encontradas no cultivo da bactéria e na detecção por PCR e ratificam que a *Brachyspira* spp. necessita de meios específicos para o crescimento e apresenta um longo período de incubação.

Da mesma forma, Komarek et al. (2009) e Stahl et al. (2011), La et al. (2003) e Moe et al. (2011) relataram que várias amostras fecais dos seus experimentos foram negativas para *Brachyspira* spp. nos testes de PCR e qPCR, e positivas no isolamento bacteriano.

A combinação dos sinais clínicos a campo com outras técnicas de diagnóstico, como por exemplo, PCR e FISH, em muitos casos são determinantes para o diagnóstico de *B. hyodysenteriae* como o agente etiológico em surtos (DANIEL et al., 2014).

Segundo Boye et al. (2001), os resultados negativos ou de baixa prevalência em levantamentos, podem ser atribuídos ao dano no genoma bacteriano ou quantidade insuficiente de DNA na amostra fecal.

Além disso, a detecção de DNA a partir de material clínico pode ser ineficiente, porque amostras de fezes geralmente não são homogêneas, no que diz respeito à presença do microrganismo, e as substâncias inibidoras presentes nas fezes podem afetar o processo de amplificação do material genético (JACOBSON et al., 2004).

Apesar de que todos os animais submetidos à avaliação apresentavam diarreia e mesmo o PCR sendo um ferramenta boa para estudos epidemiológicos (LADINIG et al., 2009), o isolamento bacteriano tem se mostrado como melhor método diagnóstico quando comparado à técnica de PCR, pois resultados negativos à PCR podem ocorrer em amostras de fezes com quantidade insuficiente de DNA bacteriano (DANIEL, 2014).

No presente estudo foi utilizado um kit comercial para extração de DNA, que foi aplicado em amostras que esperaram um período grande (até 3 meses) para serem processadas, e esse tempo pode ter influenciado na detecção do patógeno. Apesar de Zmudzki et al. (2012) afirmarem que a utilização de kits comerciais para isolamento de DNA é recomendado quando se é necessário o armazenamento a longo prazo do DNA extraído.

Song et al. (2004) relataram que métodos baseados em extração utilizando sílica são fortemente recomendados, devido à sua elevada especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade. Este método foi empregado no presente trabalho, porém não se obteve o mesmo resultado descrito por estes autores.

O limite de detecção do PCR em tempo real para a suspensão de fezes inoculadas com *B. hyodysenteriae* foi determinada por Zmudzki et al. (2012) como sendo de  $1,5 \times 10^3$  UFC / ml. Os mesmos autores sugerem que a PCR em tempo real é capaz de detectar um número mais baixo de *B. hyodysenteriae* do que é excretado pelos animais clinicamente doentes. Elder et al. (1994) determinaram que animais clinicamente doentes excretam  $2 \times 10^6$  UFC/ ml. Então seria possível identificar tanto os suínos infectados subclinicamente quanto aqueles animais que apresentam uma forma aguda da doença.

#### 4.2 Avaliação das condições epidemiológicas das propriedades

**Quadro 1.** Frequência dos dados epidemiológicos obtidos a partir dos questionários aplicados nas propriedades, analisados no intervalo de janeiro de 2015 a março de 2015.

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	Sim		Não	
	Frequência (%)	Frequência (%)		
Sistema de criação familiar	30	100	0	0
Sistema de criação integrado	0	0	30	100
Assistência médica veterinária	27	90	3	10
Confinado	30	100	0	0
Granja de Ciclo Completo	28	93,3	2	6,7
Unidade Produtora de leitão	2	6,7	28	93,3
Água de nascente	30	100	0	0
Água clorada	0	0	30	100
Composteira para dejetos	12	40	18	60
Uso de fossa para dejetos	18	60	12	40
Possui lavanderia	0	0	30	100
Instalações em alvenaria	30	100	0	0
Reposição de plantel próprio	1	3,3	29	96,7
Vacinação	30	100	0	0
Medicamento na ração	30	100	0	0
Controle/registro de entrada de pessoas	0	0	30	100
Controle/registro de entrada de veículos	0	0	30	100

Em todas as granjas amostradas (30/30) o número de suínos que apresentavam diarreia era menor ou igual a 10 animais. Do total de 30 granjas, apenas duas granjas (6,7%) não possuíam ciclo completo, as quais eram somente unidade produtora de leitões.

A partir do questionário aplicado nas suinoculturas (Anexo I) foi possível detectar que todas as granjas amostradas possuíam baixo nível de biossegurança: ausência de isolamento da granja, funcionários desuniformizados, ausência de controle de entrada e saída de pessoas e veículos, controle de pragas deficiente, ausência de cloração da água (proveniente de nascente), e inexistência de controle na introdução de novos animais no rebanho.

As granjas também possuíam deficiências de manejo como: grande movimentação e mistura de leitões no desmame ou em final de creche, falta de registro das informações zootécnicas, deficiência nos procedimentos de limpeza, desinfecção e vazio sanitário da granja.

Com essa realidade, era de se esperar que o gênero *Brachyspira* spp. fosse detectado nos leitões com diarreia, fato que não ocorreu. Por outro lado, estas condições sanitárias também favorecem a ocorrência de outros agentes infecciosos, como *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium*, circovírus suíno tipo 2 (PCV2), *Escherichia coli*, uma vez que estes agentes possuem grande prevalência e são importantes desencadeadores de doenças entéricas no Brasil, nos Estados Unidos e na Europa, em suínos de criação comercial, nas fases de recria e terminação (BACCARO et al., 2003; SUH, SONG, 2005; NEEF, 1993; NAGY, FEKETE, 1999; JACOBSON et al., 2003).

Todas as granjas tinham baixo nível de tecnificação (arroçoamento manual e instalações antigas). As granjas da Região Centro-Serrana do ES se caracterizam por possuírem baixa densidade animal ( $0,045\text{m}^2/\text{kg}$  de peso vivo), e por se enquadrarem como granjas de pequeno porte, já que em nenhuma a quantidade de matrizes ultrapassava o total de 50 fêmeas reprodutoras e o número total de suínos alojados por granja nunca era superior a 180 animais. Estas características podem ter contribuído para a não ocorrência da bactéria neste estudo, já que o Espírito Santo não se encontra nas principais regiões criadoras de suínos do Brasil (IBGE, 2015). Nos Estados ou regiões onde se possui maior densidade de unidades produtoras de suínos as condições de transmissão das doenças são mais propícias. Isso se dá pela proximidade das unidades produtoras, presença de rodovias com grande fluxo de caminhões, além da

circulação de agentes patogênicos entre granjas próximas (HAMPSON et al., 2006; THOMSON et al., 1998).

## 5. CONCLUSÃO

*Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* não foram identificadas em suínos com sinais clínicos de diarreia, na região Centro-Serrana do ES, através da técnica qPCR, mesmo com condições propícias de baixa biosseguridade das suinoculturas, indicando que estes agentes não são importantes causadores de diarreia nesta região, no período avaliado.

O pequeno porte dessas granjas e a baixa densidade de unidades produtoras no ES, aliados ao uso de antimicrobianos na ração podem ter interferido na identificação dos agentes investigados.

## REFERÊNCIAS

- AKASE, S.; UCHITANI, Y.; SOHMURA, Y.; TATSUTA, K.; SADAMASU, K.; ADACHI, Y. Application of real time PCR for diagnosis of swine dysentery. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, Japan, v. 71, n. 3, p. 359-362, 2009.
- ARGENZIO, R. A. Glucose-Stimulated Fluid absorption in the pig small intestine during the early stage of swine dysentery. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 12, p. 2000-2006, December 1980.
- ATYEO, R. F.; OXBERRY, S. L.; COMBS, B. G.; HAMPSON, D. J. Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 126-130, February 1998.
- BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; SHINYA, L. T.; DOTTO, D. S. Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finishing pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 225-229, September 2003.
- BACKHANS, A.; JANSSON, D. S.; ASPAN, A.; FELLSTRÖM, C. Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 156-162, November 2011.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; DUNHAMEL, G.; MATHIESEN, M. R. Survival of pathogenic intestinal spirochetes kept in pure cultures and in pig feces held at four different temperatures. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, vol. 30, n. 3, p. 151-157, August 2002.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; MATHIESEN, M. R.; UZEDA, M.; KADER, I. I.; DUHAMEL, G. E. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. **Veterinary Record**, v. 146, n. 14, p. 398-403, April 2000.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; RAZIA, L. E.; BOROWSKI, S. M. Ocorrência e identificação de espiroquetas intestinais em suínos em granjas de porte industrial de duas regiões criatórias do estado do Rio Grande do Sul, em relação à medicação da ração. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 725-729, Agosto 2003.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; SOUZA, R. F.; OLIVEIRA FILHO, J. X.; BOROWSKI, S. M. Diarréias causadas pela infecção com *Brachyspira* spp. em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 1, p. 229-245, 2010.
- BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 33-34, September 1999.
- BOYE, M.; BALODA, S. B.; LESER, T. D.; MOLLER, K. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 33-40, July 2001.

CALDERARO, A.; MERALDI, G.; PERINI, S.; RAGNI, P.; GUE'GAN, R.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. A novel method for isolation of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 47-52, May 2001.

CARVAJAL, A.; DE ARRIBA, M. L.; RODRIGUEZ, H.; VIDAL, A. B.; DUHAMEL G. E.; RUBIO, P. Prevalence of *Brachyspira* species in pigs in Spain. **Veterinary Record**, v. 158, n.1, p. 700-701, May 2006.

CHANDLER, Y.; PRIMUS, A.; OLIVEIRA, S.; GEBHART, C. J. Phenotypic and molecular characterization of novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated “*Brachyspirahampsonii*”. **Journal of Veterinary, Diagnostic, Investigation**, St. Paul, v. 24, n. 5, p. 903-910, February 2012.

CHIRIBOGA, A. E.; GUIRAES, W. V.; VANETTI, M. C.; ARAUJO, E. F. Detection of *L. intracellularis* in feces of swine from the main producing regions in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p. 230-234, 1999.

CLOTHIER, K. A.; KINYON, J. M.; FRANA, T. S.; NABERHAUS, N.; BOWER, L.; STRAIT, E. L.; SCHWARTZ, K. Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Visalia, v. 23, n. 6, p. 1140-1145, November 2011.

DANIEL, A. G. de S. **Determinação dos padrões de Concentração Mínima Inibitória (MIC) e caracterização genotípica de cepas de *Brachyspirahyodysenteriae* isoladas de suínos com quadros clínicos de disenteria suína no Brasil**. 2014. 39f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na área de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

DUHAMEL, G.E. Espiroquetosis del colon porcino causada por *Serpulinapilosicoli* (espiroquetosis colónica porcina). **Pigs**, v.12, n. 1, p.11-14, 1996.

DUHAMEL, G. E.; JOENS, L. A. **Laboratory procedures for the diagnosis of swine dysentery**. Columbia: SAGE Publications, 1994. 94 p.

DUHAMEL, G. E.; MUNIAPPA, N.; MATHIESEN, M. R.; JOHNSON, J. L.; TOTH, J.; ELDER, R. O.; DOSTER, A. R. Certain canine weakly b-hemolytic intestinal spirochetes are phenotypically and genotypically related to spirochetes associated with human and porcine spirochetosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2212-2215, August 1995.

DUINHOF, T. F.; DIERIKX, C. M.; KOENE, M. G.; VAN BERGEN, M. A.; MEVIUS, D. J.; VELDMAN, K. T.; VAN BEERS-SCHREURS, H. M.; WINNE, R. T. Multiresistant *Brachyspirahyodysenteriae* in a Dutch sow herd. **TijdschrDiergeeskd**, v. 133, n. 14, p. 604-608, August 2008.

ELDER, R .Q.; DUHAMEL, G. E.; SCHAFER, R. W.; MATHIESEN, M. R.; RAMANATHAN, M. Rapid detection of *Serpulinahyodysenteriae* in diagnostic

specimens by PCR. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 1497-1502, June 1994.

FELLSTROM, C.; MELIN, L.; WIERUP, M.; GUNNARSSON, A.; HOLMGREN, N. Mice as a reservoir of *Brachyspirahyodysenteriae* in repeated outbreaks of swine dysentery in Swedish fattening herd. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 18., 2004, Hamburg. **Anais...** Hamburg: 2004. p. 280.

FELLSTROM, C.; PETTERSSON, B.; ZIMMERMAN, U.; GUNNARSSON, A.; FEINSTEIN, R. Classification of *Brachyspira* spp. isolated from Swedish dogs. **Animal Health ResearchReviews**, v. 2, n. 1, p. 75-82, June 2001.

GUEDES, R. M. C. Atualidades em transtornos digestivos na fase de crescimento. **Suínos & Cia**, Paulínia, v. 50, p.10-12, Março 2014.

GUEDES, R.M.C.; BARCELLOS, D. E. S. N. Disenteria Suína. In: BARCELLOS, D.E.S.N., SOBESTIANSKY, J. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Canone,2012. cap 2, p. 128-134.

GUEDES, R. M. C. Controle racional das diarreias de recria e terminação. **Acta ScientiaeVeterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 4, p. 247-253, Dezembro 2010.

GUEDES, R. M. C. Diarreia em suínos de recria e terminação principais enfermidades. **Suínos e Cia**, Paulínia, n. 11, p. 11-18, Julho 2005.

GUEDES, R. M. C.; VIOTT A. M.; CRUZ JR E. C. C. Estudos recentes com enteropatógenos de suínos no Brasil. **Revista de PorciculturaIberoamericana**, Zaragoza, v. 2, n. 3, p. 3-8, Maio 2011.

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

HAMPSON, D. J.; FELLSTRON, M. C.; THOMSON, J. R. Swine dysentery. In: Edited by: STRAW, B.E., ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIRE, S. et al. **Diseases Of Swine**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2006. cap. 9, p. 785-805.

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

HANSEN, G. D. Abordagem prática da síndrome diarreica na maternidade. In CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3., 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Animalworld, 2006, p. 167-178.

HANSEN, G. D. Diagnóstico diferencial das patologias intestinais da recria e terminação, com foco em disenteria. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE SUINOCULTURA, 6., 2013, Concórdia. **Anais...**Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2013. p. 24-44.

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

HEINONEN, M.; FOSSI, M.; JALLI, J. P.; TUOVINEN, V. Prevalence of *Serpulina* species in herds rearing health class (LSO 2000) feeder pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. **Anais...** Birmingham: 1998. p. 57.

HOVIND-HOUGEN, K.; BIRCH-ANDERSEN, A.; HENRIK-NIELSEN, R.; ORHOLM, M.; PEDERSEN, J. O.; TEGLBJÆRG, P. S.; THAYSEN, E. H. Intestinal spirochetosis: morphological characterization and cultivation of the spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov., sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1127-1136, December 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. Estatística da produção pecuária, março de 2015. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, 2015. 14-27, Brasil, 2015.

JACELA, J. Y.; DEROUCHEY, J. M.; TOKACH, M. D. Feed additives for swine: fact sheets acidifiers and antibiotics. **Journal of Swine Health and Production**, v. 17, n. 5, p. 270-275, October 2009.

JACOBSON, M.; ASPAN, A.; KONIGSSON, M. H.; SEGERSTAD, C. H.; WALLGREN, P.; FELLSTRO, M. C.; JENSEN-WAERN, M.; GUNNARSON, A. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 189-201, September 2004.

JACOBSON, M.; HÅRD A. F.; SEGERSTAD, C.; GUNNARSSON, A.; FELLSTRÖM, C.; DE VERDIER KLINGENBERG, K.; WALLGREN P.; JENSEN-WAERN, M. Diarrhoea in the growing pig - a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. **Research in Veterinary Science**, v. 74, n. 2, p. 163-169, April 2003.

JANSSON, D. S.; BRÖJER, C.; GAVIER-WIDÉN, D.; FELLSTRÖM C. *Brachyspira* spp. (*Serpulina* spp.) in birds: a review and results from a study of Swedish game birds. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 93–100, June 2001.

JANSSON, D. S.; JOHANSSON, K.; OLOFSSON, T.; RÅSBÄCK, T.; VÅGSHOLM, I.; PETTERSSON, B.; GUNNARSSON, A.; FELLSTRÖM, C. *Brachyspirahydysenteriae* and other strongly-haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 293–300, April 2004.

JENSEN, T. K.; MOLLER, K.; BOYE, M.; LESER, T. D.; JORSAL, S. E. Scanning electron microscopy and fluorescent in situ hybridization of experimental *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* infection in growing pigs. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 22-32, January 2000.

KARLSSON, M.; ASPAN, A.; LANDEN, A.; FRANKLIN, A. Further characterization of porcine *Brachyspirahyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, n. 4, p. 281–285, 2004.

KENNEDY, M. J.; ROSNICK, D. K.; ULRICH, R. G.; .Association of *Treponemahyodysenteriae* with Porcine Intestinal Mucosa. **Journal of general microbiology**, v. 134, n. 6, p. 1565-1576, June 1988.

KIEVITSBOSCH, T. *Brachyspirahyodysenteriae*: é preciso conhecer a causa da disenteria suína. **O Presente Rural**, Marechal Cândido Rondon, v. 15, n. 1, p. 22, Agosto 2013.

KOMAREK, V.; MADERNER, A.; SPERGSER, J.; WEISSENBOCK, H. Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pigs with miscellaneous chronic diseases. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 311-317, March 2009.

LA, T.; COLLINS, A. M.; PHILLIPS N. D.; OKSA, A.; HAMPSON, D. J. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspirahyodysenteriae*, and *Brachyspirapilosicoli* in porcine faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n.3, p. 284-288, March 2006.

LA, T.; HAMPSON, D. J. Serologic detection of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* infections. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 45-52, June 2001.

LA T.; PHILLIPS N. D.; HAMPSON D. J. Development of a Duplex PCR Assay for Detection of *Brachyspirahyodysenteriae* and *Brachyspirapilosicoli* in Pig Feces. **Journal Clinical Microbiology**, Washington ,v. 41, n. 7, p. 3372-3375, July 2003.

LA, T.; PHILLIPS, N. D.; WANCHANTHUEK, P.; BELLGARD, M. I.; O'HARA, A. J.; HAMPSON, D. J. Evidence that the 36 kb plasmid of *Brachyspirahyodysenteriae* contributes to virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 150-155, November 2011.

LADINIG, A.; SOMMERFELD, S.; WEISSENBOCK, H. Comparative evaluation of diagnostic methods for *Lawsonia intracellularis* infection in pigs, with emphasis on cases lacking characteristic lesions. **Journal of Comparative Pathology**, v.140, n. 2, p. 140-148, February 2009.

LIEBLER-TENORIO E. M.; POHLENZ, J. F.; WHIPP S. C. Diseases of the Digestive System. In: STRAW, B. E. (Ed.); ZIMMERMAN, J. J. (Ed.); D'ALLAIRE, S. (Ed.) et al. **Diseases Of Swine**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2006. cap. 57, p. 821-832.

LOBOVÁ, D.; SMOLA, J.; CIZEK, A. Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspirahyodysenteriae*. **Journal of medical microbiology**, v. 53, n. 4, p. 287-291, April 2004.

McORIST, S.; GEBHART, C. J. Porcine proliferative enteropathies. In: STRAW B, E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELENG, W. L. et al. **Diseases of swine**. Ames, Iowa State: University Press, 1999. cap. 40, p.521-534.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, Setembro 2008.

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

MOE, K. K.; MUGURUMA, M.; MISAWA, N. Quantitative detection of *Brachyspira hyodysenteriae* from swine dysentery lesions by using direct polymerase chain reaction (PCR) method. **KKU Veterinary Journal**, v. 21, n. 2, p. 104-119, July - December 2011.

MOLLER, K., JENSEN, T. K., JORSAL, S. E.; LESER, T. D.; CARSTENSEN, B. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulinhodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 30, n. 62, p. 59-72, April 1998.

MORES, N.; ZANELLA, J. R. C. Perfil Sanitário da suinocultura no Brasil. **Suinocultura Industrial**, Itu, v. 189, n. 27, p. 36-40, Abril 2005.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. **Veterinary Research**, v. 30, n. 3, p. 259-284, March 1999.

NARESH, R.; HAMPSON, D. J. Attraction of *Brachyspira pilosicolito* mucin. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 191-197, January 2010.

NEEF, N. Non-specific colitis in the growing pig: literature review. **Recueil Médicine Veterinaire**, v. 169, n. 1, p. 675-684, 1993.

NEVES, S. M. N. **Avaliação das técnicas de isolamento, reação em cadeia da polimerase e hibridização fluorescente in situ para diagnóstico de Brachyspirasp. em suínos**. 2012. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na área de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

NOVOTNÁ, M.; SKARDOVÁ, O. *Brachyspirahydysenteriae*: detection, identification and antibiotic susceptibility. **Veterinarni Medicina Czech**, v. 47, n. 4, p. 104-109, 2002.

OLIVEIRA FILHO, J. X.; PAULA, D. A. J.; OLIVEIRA, J. T.; SILVA, M. C.; SILVA, G. F. R.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Ocorrência de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspirahydysenteriae* e *Salmonellasp.* em suínos com diarreia na região norte do Estado do Mato Grosso. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 4, p. 218-223, Janeiro 2010.

PAULOVICH, F. B.; BOROWSKI, S. M.; DRIEMEIER, D.; RAZIA, L. D.; COUTINHO, T. A.; PRATESI, A. B. H.; PESCADOR, C.; CORREA, C.;

BARCELLOS, D. E. S. N. Avaliação da patogenicidade de amostras de *Brachyspirapilosicoli* através de técnicas histopatológicas convencionais e por imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 144-148, Setembro 2004.

PEARCE, G. P. Epidemiology of enteric disease in grower-finisher pigs: a postal survey of pig producers in England. **Veterinary Record**, v. 144, n. 13, p. 338-42, March 1999.

PLAWINSKA, J.; JAKUBOWSKI, T.; RZEWUSKA, M.; KIZERWETTER, M.; BINEK, M. Occurrence of *Lawsoniaintracellularis* and *Brachyspira* spp. infection in pigs in Poland. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 59, n. 5, p. 406-409, 2003.

PLOEG, M. Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. **European Journal of Histochemistry**, v. 44, n. 1, p. 7-42, 2000.

PRINGLE, M.; LANDÉN, A.; FRANKLIN, A. Tiamulin resistance in porcine *Brachyspirapilosicoli* isolates. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 1, p. 1-4, February 2006.

RASBACK, T.; JANSSON, D. S.; JOHANSSON, K.; FELLSTOM, C. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspirasuanatina*' sp. nov. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 983-991, April 2007.

ROHDE, J.; KESSLER, M.; BAUMS, C. G.; AMTSBER, G. Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspirahydysenteriae* isolated in Germany. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1-2, p. 25-32, August 2004.

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, et al. **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: University Press, 1999. cap. 39, p. 535-551.

SONG, Y.; LIU, C.; FINEGOLD, S. M. Real-time PCR quantitation of *Clostridia* in feces of autistic children. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6459-6465, November 2004.

ŠPERLING, D.; ČÍŽEK, A.; SMOLA, J. Effect of zinc chelate and valnemulin for the treatment of swine dysentery in an experimental challenge study. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 1, p. 30-32, February 2014.

STAHL, M.; KOKOTOVIC, B.; HJULSAGER, C. K.; BREUM, S. O.; ANGEN, O. The use of quantitative PCR for identification and quantification of *Brachyspirapilosicoli*, *Lawsoniaintracellularis* and *Escherichia coli* fimbrial types F4 and F18 in pig feces. **Veterinary Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 307-314, August 2011.

STANTON, T. B.; FOURNIE-AMAZOUZ, E.; POSTIC, D.; TROTT, D. J.; GRIMONT, P. A. D.; BARANTON, G.; HAMPSON, D. J.; SAINT GIRONS, I. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulinaintermedia* sp. nov. and *Serpulinaurdochii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1007-1012, October 1997.

STANTON, T. B. Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen nov. containing the species *Serpulinahyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulinainnocens* comb. nov. **International journal of systematic bacteriology**, v. 42, v. 1, p. 189-90, January 1992.

STEGE H.; JENSEN T. K.; MÖLLER K.; BAEBO P.; JORSAL S. E. Prevalence of intestinal pathogens in danish finishing pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, n. 4, p. 279-292, September 2000.

SUH D. K.; SONG J. C. Prevalence of *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae*, and *Salmonella* in swine Herds. **Journal of Veterinary Science**, Daegu, Korea, v. 6, n. 4, p. 289-293, 2005.

SWAYNE, D. E.; EATON, K. A.; STOUTENBURG, J.; TROTT, D. J.; HAMPSON, D. J.; JENSEN, N. S. Identification of a new intestinal spirochete with pathogenicity to chickens. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 430-436, February 1995.

TAYLOR, D. J.; ALEXANDER, T. J. L. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. **The British veterinary journal**, London, v. 127, n. 11, p. 58-61, November 1971.

TAYLOR, D. J.; SIMMONS, J. R.; LAIRD, H. M. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponemahyodysenteriae*. **Veterinary Record**, London, v. 106, n. 15, p. 326-332, April 1980.

THOMSON, J. R.; SMITH, W. J.; MURRAY, B. P.; DICK, J. E.; SUMPTION, K. J. Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical iso-lates. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 31-36, June 2001.

THOMSON, J. R.; SMITH, W. J.; MURRAY, B. P. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulinapilosicoli*. **Veterinary Record**, v. 142, n. 10, p. 235-239, March 1998.

TROTT, D. J.; STANTON, T. B.; JENSEN, N. S. et al. *Serpulinapilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. **International journal of systematic bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 206-215, January 1996.

VERSPOHL, J.; FELTRUP, C.; THIEDE, S.; AMTSBERG, G. Diagnosis of swine dysentery and spirochaetal diarrhea: Part III: Results of cultural and biochemical differentiation of intestinal *Brachyspira* spec. by rotinec culture from 1997 to 1999. **Deutsche tierärztliche Wochenschrift**, v. 108, n. 2, p. 67-69, February 2001.

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

WEISSENBOCK, H.; MADERNER, A.; HERZOG, A. M.; LUSSY H.; NOWOTNY, N. Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of nox using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspiramurdochii*. **Veterinary Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 67-75, November 2005.

ZHANG, P.; WITTERS, N. A.; DUHAMEL, G. E. Identification of *Serpulinapilosicoli* outer membrane antigens (SPOMA) by western blot analysis of human isolate SP 16 with convalescent and hyperimmune swine soro. In: PAUL, P. S., FRANCIS, D. H., BENFIELD, D. **Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases**. Washington: Plenum, 1998. cap. 3, p. 39-57.

ZMUDZKI, J.; SZCZOTKA, A.; PODGÓRSKA, K.; NOWAK, A.; GRZESIAK, A.; DORS, A.; PEJSAK, Z. Application of real-time PCR for detection of *Lawsoniaintracellularis* and *Brachyspirahyodysenteriae* in fecal samples from pigs. **PolishJournalofVeterinarySciences**, vol. 15, n. 2, p. 267-273, 2012.

## ANEXO I

### Questionário Granjas

#### 1. DADOS CADASTRAIS:

1.1- Nome do Produtor: \_\_\_\_\_

1.2- Endereço: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

1.3- Nome da Propriedade: \_\_\_\_\_

1.4- Município: \_\_\_\_\_

1.5- Data da Visita: \_\_\_\_\_

1.6- Telefone: \_\_\_\_\_

1.7- Outras informações: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

#### 2. PERFIL DA CRIAÇÃO:

2.1- Acesso ao mercado:  Integração  Cooperativa  Independente

2.2- Médico Veterinário Responsável:

2.3- N° animais:  Matrizes  Cachaços  Leitões Maternidade  
Leitões Creche  Terminação

2.4- Sistema de criação:  Confinado  Siscal  
 Tecnificada  Não-Tecnificada

2.5- Finalidade da Produção:  Ciclo Completo  Unidade Produtora de leitão  
 Recria/Terminação

2.6- Fonte de água:  Nascente  Lagoa/Rio  Empresa de Abastecimento  
 Cloração

2.7- Destino dos dejetos:  Fossa  Rio  Lagoa de decantação  
 Outro

2.8- Destino Cadáveres: \_\_\_\_\_

2.9- Lavanderia:  Sim  Não

2.10- Tipo de Instalação:  Alvenaria  Madeira  Outra

2.11- Animais para Reposição:  Mesmo Plantel  Mesmo Estado

Outro Estado

2.12- Biossegurança:  Protegida  Moderada  Baixa

2.13- Controle Sanitário  Vermifugação  Vacinação

Uso de antibióticos  Medicações

OBS: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

2.14- Tipo de alimentação: \_\_\_\_\_

2.15- Controle/registro de entra de pessoas:  Sim  Não

2.16- Controle/registro de entra de veículos:  Sim  Não