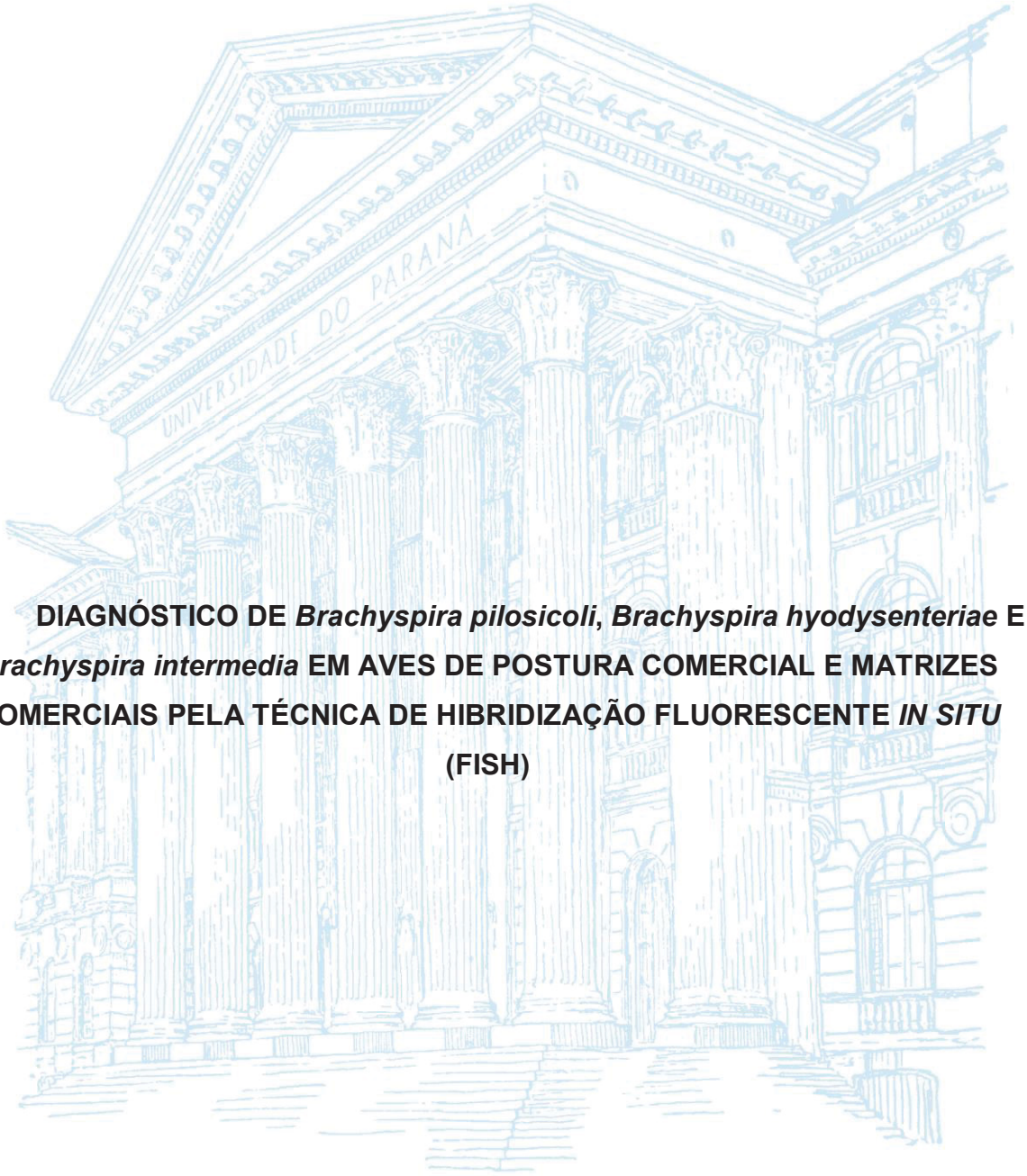
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO GRUCHOUSKEI



DIAGNÓSTICO DE *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira intermedia* EM AVES DE POSTURA COMERCIAL E MATRIZES COMERCIAIS PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

PALOTINA

2017

LEONARDO GRUCHOUSKEI

DIAGNÓSTICO DE *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira intermedia* EM AVES DE POSTURA COMERCIAL E MATRIZES COMERCIAIS PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Patologia Animal, Setor de Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.ª Dra. Aline de Marco Viott

PALOTINA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G885

Gruchouskei, Leonardo
Diagnóstico de *brachyspira pilosicoli*, *brachyspira hyodysenteriase* e *brachyspira intermedia* em aves de postura comercial e matrizes comerciais pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (fish) / Leonardo Gruchouskei. -- Palotina, 2017
30f.

Orientadora: Aline de Marco Viott
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Espiroquetose intestinal aviária. 2. Hibridização fluorescente *in situ*. 3. *Brachyspira*. I. Viott, Aline de Marco. II. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.5

Ficha catalográfica elaborada por Liliane Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LEONARDO GRUCHOUSKEI** intitulada: **DIAGNÓSTICO DE *Brachyspira pilosicoli, Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira intermedia* EM AVES DE POSTURA COMERCIAL E MATRIZES COMERCIAIS PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 18 de Dezembro de 2017.

ALINE DE MARCO VIOTT
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCO ANTÔNIO BACELLAR BARREIROS
Avaliador Externo (UFPR)

EDNA TEREZA DE LIMA
Avaliador Interno (UFPR)

RESUMO

Bactérias do gênero *Brachyspira* podem ocasionar enfermidades entéricas em aves e a correta identificação se faz necessário tendo em vista que algumas espécies não são patogênicas. Devido à característica fastidiosa de crescimento e a sua importância na agroindústria comercial, técnicas de identificação rápidas e eficazes se fazem necessárias. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para o diagnóstico de *Brachyspira pilosicoli, Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* utilizando amostras de ceco de aves de postura comercial e matrizes comerciais fixadas em formol. Foram coletadas amostras de 112 aves com idade entre 35 e 82 semanas, sendo 42 oriundas de granjas de galinhas de postura comercial e 70 de granjas de matrizes de corte. Para avaliação primeiramente procedeu-se ao isolamento bacteriano a partir das fezes, técnica ouro para identificação do agente. As amostras positivas foram submetidas a qPCR para identificação de espécies patogênicas. Posteriormente, segmentos formolizados de ceco, dessas mesmas aves, foram processados pela técnica de FISH utilizando sondas marcadas de *Brachyspira pilosicoli, Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia*. A comparação dos dados encontrados foi realizada através do teste não paramétrico de qui-quadrado. Das 112 amostras foram obtidos 40 isolamentos característicos de *Brachyspira* e destes, no qPCR, 14 identificadas como *B. hyodysenteriae* e 7 como *Brachyspira intermedia*, 2 foram positivas para ambas e 21 não foram caracterizadas. Na FISH 52 amostras foram positivas para *Brachyspira* sp, 22 *para B. hyodysenteriae*, 28 para *B. intermedia*, 7 para *B. pilosicoli* e 8 amostras foram positivas para duas espécies. A avaliação estatística revelou que a técnica de FISH foi capaz de indicar maior número de aves positivos quando comparada ao isolamento bacteriano e a qPCR, inclusive revelando aves positivos para *B. pilosicoli* que não tinham sido identificados anteriormente. Dessa forma conclui-se que a FISH apresentou-se eficaz na identificação das *Brachyspiras* avaliadas servindo assim como uma ferramenta rápida e eficiente para o diagnóstico.

Palavras-chave: Espiroquetose intestinal aviária. Hibridização fluorescente *in situ*. *Brachyspira*.

ABSTRACT

Bacteria of the genus Brachyspira can cause enteric diseases in birds and its correct identification is necessary because some species are nonpathogenic. Due to the fastidious growth characteristic and importance of these bacteria in agroindustry, fast and effective identification techniques are required. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the Fluorescent *in situ* Hybridization technique (FISH) for diagnosis of the *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira intermedia*, using formalin-fixed samples from the cecum of laying hens and commercial matrices. Samples were collected from 112 animals with age from 35 to 82 weeks, being 42 from commercial farm laying hens and 70 from broiler matrices farm. Firstly, the bacterial isolation was made from feces, which is a gold technique for microorganism identification. The samples were submitted to qPCR for identification of pathogenic species. Subsequently, the cecal fragments fixed with formalin, from the same birds, were processed through FISH technique, using marked probes of *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira intermedia*. A comparison of the obtained data was performed through chi-square non-parametric test. From the 112 samples, it was obtained 40 bacterial isolates characteristic of *Brachyspira*. From that, qPCR identified 14 as *B. hyodysenteriae* and seven as *Brachyspira intermedia*, two samples were positive for both and 21 were no characterized. In FISH, 52 samples were positive for *Brachyspira* sp., 22 for *B. hyodysenteriae*, 28 for *B. intermedia*, 7 for *B. pilosicoli* and eight samples were positive for two bacterial species. The statistical evaluation showed that using the FISH technique it was possible to identify a greater number of positive animals in comparison with bacterial isolation and qPCR, inclusive identifying positive animals for *B. pilosicoli*, which were not identified before. Therefore, it is concluded that the FISH technique is efficient for identification of the *Brachyspira* species evaluated in this study as well as is a fast and efficient tool for the diagnosis.

Key-words: Fluorescent *in situ* hybridization. Avian intestinal spirochaetosis. *Brachyspira*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fotomicrografia com marcação positiva para Brachyspira em ceco de galinhas pela técnica de FISH. (A) Marcação específica para *B*. sp. (seta); (B) Marcação específica para *B*. *hyodysenteriae* (seta); (C) Marcação específica para *B*. *pilosicoli* (seta); (D) Marcação específica para *B*. *intermedia* (seta).....20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Positividade das amostras por método de diagnóstico.....21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **9**
2 CAPÍTULO 1 ..... **13**
3 INTRODUÇÃO 15
4 MATERIAL E MÉTODOS 15
4.1 Amostras 16
4.2 Isolamento bacteriano 16
4.3 qPCR (Reaçao em cadeia da Polimerase em tempo) 16
4.4 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) 16
4.5 Análise estatística 16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 16
6 CONCLUSÕES 18
REFERÊNCIAS 18
REFERÊNCIAS **22**
APÊNDICE A – PROTOCOLO FISH **26**
APÊNDICE B – TAMPÃO HIBRIDIZAÇÃO **27**
APÊNDICE C – TAMPÃO DE LAVAGEM **28**
APÊNDICE D – INSTRUÇÕES AOS AUTORES **29**

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2016 o Brasil produziu 12,90 mil toneladas de carne de frango e deste total foram exportadas 4,384 mil toneladas. Neste mercado, o Paraná ocupou local de destaque sendo o responsável por 35,85% das exportações (ABPA, 2016). Tendo em vista a importância que este mercado possui para o país, o controle sanitário é peça fundamental na produção, assim se faz necessário o controle de agentes com potencial patogênico.

Bactérias do gênero Brachyspira podem causar doenças entéricas principalmente em suínos e aves, além disto, possui caráter zoonótico, pois afetam humanos. Dentre as sete espécies de *Brachyspira* que são conhecidas atualmente, são consideradas patogénicas para aves a *B. intermedia, B pilosicoli, B. hyodysenteriae* e *B. alvinipulli*, aonde mais de uma espécie pode estar ocasionando a enfermidade concomitantemente (SONG e HAMPSON, 2009; MAPPLEY et al., 2014).

Em aves ela é responsável pela espiroquetose intestinal aviaria (EIA) (MAPPLEY et al., 2014). As principais causadoras são as *B. intermedia* e *B. pilosicoli* (STEPHENS e HAMPSON, 1999; BANO et al., 2008), em menor frequência a *B. alvinipulli* (PHILLIPS et al., 2006; FEBERWEE et al., 2008), os sinais que podem aparecer são diarreia crônica, perda de peso, baixa produção de ovos e ovos sujos de fezes (MEDHANIEA et al., 2013). Histologicamente, podem apresentar tiflite linfoplasmocítica, hiperplasia de criptas, erosão epitelial, infiltrado leve a moderado de macrófagos e heterófilos na lâmina própria e aumento do número de células caliciformes (SHIVAPRASAD e DUHAMEL, 2005; FEBERWEE et al., 2008).

A *B. hyodysenteriae* está associada a ocorrência de tiflites severas em emas (*Rhea americana*) naturalmente infectadas, sendo a mesma espiroqueta causadora da disenteria suína (JENSEN; STANTON; SWAYNE, 1996).

A capacidade de transmissão de *Brachyspira* sp. entre espécies foi verificada entre aves, suínos e roedores, e todos eles podem ser colonizados a partir de uma fonte ambiental comum. Ratos e camundongos podem atuar na transmissão da *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, que são agentes causadores da EIA em aves e, em suínos, a disenteria suína e colite espiroquetal, respectivamente. Devem ser levado em conta os programas de controle de roedores em granjas, pois eles podem manter a bactéria dentro da granja após a retirada de lotes ou até mesmo carrear o agente entre granjas (BACKHANS et al., 2011).

A colonização por *Brachyspira* é significativamente maior em aves mais velhas, sugerindo que após uma infecção inicial a população bacteriana aumenta com o passar do tempo. Assim testes rotineiros para detecção precoce poderiam ser utilizados para serem tomadas as medidas necessárias para o controle do agente dentro das propriedades avícolas minimizando futuras perdas econômicas (PHILLIPS et al., 2005; MEDHANIE et al., 2013).

A prevalência de *Brachyspira* sp. em aves relatada na Itália foi de 72,4% em granjas de postura sendo que 31% destas amostras eram patogênicas (BANO et al. 2008). Na Austrália, a prevalência encontrada foi de 42% em frangos de corte e 68% em poedeiras (STEPHENS et al., 1999). Recentemente na Argentina foi encontrado positividade entre 50 a 65% nas granjas de poedeiras avaliadas (ILLANES et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial tradicional de *Brachyspira* sp. é realizado através de cultura e provas bioquímicas. No entanto, estes métodos são trabalhosos e demorados, podendo levar até 40 dias para obter-se o resultado. Além disso, a identificação da espécie por parâmetros bioquímicos podem ser dificultada com o fraco crescimento das colônias puras ou por uma microbiota acompanhante (BOYE et al., 1998; RÅSBÄCK et al., 2006). Sendo que em alguns casos, não é possível realizar a identificação da espécie em amostras positivas (ILLANES et al., 2016). Assim métodos alternativos para o diagnóstico de *Brachyspira* sp. vem sendo desenvolvidos e testados entre as diferentes espécies afetadas (BOYE et al., 1998; JENSEN et al., 2000; PHILLIPS et al., 2005; PHILLIPS et al., 2006; RÅSBÄCK et al., 2006; SCHMIEDEL et al., 2009; SONG e HAMPSON, 2009; JENSEN et al., 2010; BURROUGH et al., 2013; WILBERTS et al., 2015).

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) possui a característica de ser rápida e sensível, e possibilita a identificação no corte histológico do agente, sua localização, número e morfologia das células bacterianas, utilizando tecidos fixados em formol. Embora a sua aplicação seja rápida e barata, controles minuciosos são fundamentais para garantir a qualidade dos resultados. Portanto, o desenvolvimento e avaliação da técnica devem ser realizados por laboratórios de referência especializados com equipamentos para cultura, bem como técnicas moleculares (BOYE et al., 1998; MOTER e GÖBEL, 2000).

A técnica de FISH detecta sequências de ácidos nucleicos com uma sonda marcada com fluorescência, que se hibridiza especificamente com a sua sequência

alvo complementar no interior da célula intacta. Na microbiologia as áreas mais utilizadas para a síntese de sondas são as porções 16S rRNA devido a sua preservação e estabilidade genética. As sondas utilizadas são produzidas utilizando-se sequências exclusivas que permitem a identificação de um gênero especifico, espécie especifica chegando até mesmo a um nível intraespécie especifico (MOTER e GÖBEL, 2000; SCHMIEDEL et al., 2009).

As principais fases do FISH são as seguintes: Fixação do material a ser testado, procedimento essencial, pois evita a degradação do material genética alvo da técnica. Preparação do material e pré-tratamento que consiste nas fases de emblocamento, corte histológico e desparafinização. Hibridização, aonde vai ocorrer o anelamento da sonda com a sequência alvo do tecido avaliado, este procedimento é realizado em uma câmara úmida escura em temperatura controlada, esta etapa leva de minutos a algumas horas dependendo do tipo de sonda utilizada, finaliza-se lavando as lâminas a fim de retirar as sondas que não se ligaram ao material, desidratação e montagem das lâminas. Visualização é a última etapa que deve ser feita em um microscópio fluorescente (MOTER e GÖBEL, 2000).

A utilização da técnica de FISH em intestino de suínos fixados em formol apresentou aplicabilidade da técnica para a identificação de *B. pilosicoli*, aonde a identificação correta da espécie da Brachyspira é essencial, pois há espécies não patogênicas, porém, de ocorrência comensal (JENSEN et al., 2010).

Em humanos a técnica de FISH foi realizada em biópsias intestinais com sucesso para o diagnóstico da espiroquetose intestinal humana, doença causada principalmente pela *Brashyspira pilosicoli* e que raramente pode ser causada pela *Brachyspira aalborgi*. Neste caso a técnica de FISH isolada foi suficiente para realizar o diagnóstico. Já o isolamento bacteriano, que demorou seis semanas para ser realizado, ainda necessitou de técnicas auxiliares como o PCR para confirmar as estirpes (SCHMIEDEL et al., 2009; ROJAS et al., 2017).

A comparação entre as técnicas de qPCR e FISH onde buscou-se a identificação de *Brachyspira* sp. utilizando fezes, aprsentaram níveis de detecção semelhantes comparando a qPCR com fezes frescas e FISH utilizando fezes fixadas em formol. A técnica de FISH falhou quando se utilizou fezes fresca, pois o formol utilizado para fixação preserva a integridade celular e evita a degradação dos ácidos nucleicos necessários para a técnica, no entanto o qPCR quando executado com amostras fixadas em formol raramente apresenta positividade, pois o formol inibe o

acesso iniciador do PCR. Desta maneira, amostras fixadas em formol são mais adequadas para a utilização na FISH (WILBERTS et al., 2015).

Devido a necessidade de métodos alternativos para o diagnóstico de *Brachyspiras* sp. em aves tendo em vista a morosidade da cultura, considerando que regiões produtoras de aves no Brasil muitas vezes ficam afastados dos centros de diagnóstico e a limitação logística acaba dificultando a remessa de amostras viáveis para a cultura microbiológica, desta forma amostra fixadas em formol possuem a vantagem de se manterem viáveis por um longo período possibilitando a chegada até o centro de diagnóstico. Portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência da técnica de FISH em amostras de intestino de aves fixadas em formol para a detecção de *Brachyspira* sp, *B. pilosicoli, B. intermedia* e *B. hyodysenteriae*.

A presente dissertação apresentasse em capítulo único no formato de artigo a ser submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

2 CAPÍTULO 1

Artigo intitulado: Diagnóstico de *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* em aves de postura comercial e matrizes comerciais pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH

Diagnóstico de *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* em aves de postura comercial e matrizes comerciais pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Leonardo Gruchouskei[2]*, Thiago Goulart[3], Jessica Gonçalves[3], João Cavasin[3], Monica R. de Matos[3], Mayane Faccin[3], Aline de M. Viott[3]

ABSTRACT.- Gruchouskei L., Goulart T., Gonçalves J., Cavasin J., Matos M.R., Faccin M & Viott A.M. 2017**. [Nome do artigo em inglês]** Diagnóstico de *Brachyspira pilosicoli, Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* em aves de postura e matrizes comerciais pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00.* Laboratório de Anatomia e Patologia Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, Av. Edmunddo Gaievski 1000, Realeza, PR 85770-000, Brazil. E-mail: leonardo.gruchouskei@uffs.edu.br

Bacteria of the genus Brachyspira can cause enteric diseases in birds and its correct identification is necessary because some species are nonpathogenic. Due to the fastidious growth characteristic and importance of these bacteria in agroindustry, fast and effective identification techniques are required. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the Fluorescent in Situ Hybridization technique (FISH) for diagnosis of the *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira intermedia*, using formalin-fixed samples from the cecum of laying hens and commercial matrices. Samples were collected from 112 animals with age from 35 to 82 weeks, being 42 from the commercial farm of laying hens and 70 from broiler matrices farm. Firstly, the bacterial isolation was made from feces, which is a gold technique for microorganism identification. The samples were submitted to qPCR for identification of pathogenic species. Subsequently, the cecal fragments fixed with formalin, from the same birds, were processed through FISH technique, using marked probes of *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira intermedia*. A comparison of the obtained data was performed through chi-square non-parametric test. From the 112 samples, it was obtained 40 bacterial isolates characteristic of *Brachyspira*. From that, qPCR identified 14 as *B. hyodysenteriae* and seven as *Brachyspira intermedia*, two samples were positive for both and 21 were no characterized. In FISH, 52 samples were positive for *Brachyspira* sp., 22 for *B. hyodysenteriae*, 28 for *B. intermedia*, 7 for *B. pilosicoli* and eight samples were positive for two bacterial species. The statistical evaluation showed that using the FISH technique it was possible to identify a greater number of positive animals in comparison with bacterial isolation and qPCR, inclusive identifying positive animals for *B. pilosicoli*, which were not identified before. Therefore, it is concluded that the FISH technique is efficient for identification of the *Brachyspira* species evaluated in this study as well as is a fast and efficient tool for the diagnosis.
INDEX TERMS: Fluorescent *in situ* hybridization, avian intestinal spirochaetosis, laying hens, broiler breeders.

RESUMO.- Bactérias do gênero Brachyspira podem ocasionar enfermidades entéricas em aves e a correta identificação se faz necessária, tendo em vista que algumas espécies não são patogênicas. Devido a característica fastidiosa de crescimento e a sua importância na agroindústria comercial técnicas de identificação rápida e eficazes se fazem necessárias. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para o diagnóstico de *Brachyspira pilosicoli, Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* utilizando amostras de ceco de aves de postura e matrizes comerciais fixados em formol. Foram coletadas amostras de 112 aves com idade entre 35 e 82 semanas, sendo 42 de granjas de postura comercial e 70 de granjas de matrizes de corte. Para avaliação primeiramente procedeu-se ao isolamento bacteriano a partir das fezes, técnica ouro para identificação do agente. As amostras positivas foram submetidas a qPCR para identificação de espécies patogênicas. Posteriormente, segmentos formolizados de ceco, dessas mesmas aves, foram processados pela técnica de FISH utilizando sondas marcadas de *Brachyspira pilosicoli, Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia*. A comparação dos dados encontrados foi realizada através do teste não paramétrico de qui-quadrado. Das 112 amostras foram obtidos 40 isolamentos característicos de *Brachyspira* e destes na qPCR 14 identificadas como *B. hyodysenteriae* e 7 como *Brachyspira intermedia*, 2 amostras foram positivas para ambas e 21 não foram caracterizadas, na técnica de FISH 52 amostras foram positivas para *Brachyspira* sp. 22 *para B. hyodysenteriae*, 28 para *B. intermedia*, 7 para *B. pilosicoli* e 8 amostras foram positivas para duas espécies. A avaliação estatística revelou que a técnica de FISH foi capaz de indicar maior número de aves positivas quando comparada ao isolamento bacteriano e a qPCR, inclusive revelando aves positivas para *B. pilosicoli* que não tinham sido identificados anteriormente. Dessa forma conclui-se que a técnica de FISH apresentou-se eficiente para identificação das Brachyspiras avaliadas servindo assim como uma ferramenta rápida e eficiente para o diagnóstico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Hibridização Fluorescente *in situ*, espiroquetose intestinal aviária, aves de postura, matriz de corte.

3 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Brachyspira* podem causar doença entérica principalmente em aves e suínos, além disto, possui caráter zoonótico. Quatro espécies de Brachyspira são consideradas patogénicas para aves sendo elas a *Brachyspira intermedia*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira alvinipulli* e a *Brachyspira hyodysenteriae* aonde pode estar envolvida uma ou mais espécies concomitantemente (Song & Hampson 2009, Mappley et al. 2014). A capacidade de transmissão de *Brachyspira* sp. entre espécie foi verificada entre aves, suínos e roedores, e todos eles podem ser colonizados a partir de uma fonte ambiental comum, desta forma ratos e camundongos podem atuar na transmissão da *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*, mantendo a bactéria nas granjas entre os lotes (Backhans et al. 2011).

Em aves a *Brachyspira* sp. está associada a uma condição clínica conhecida como espiroquetose intestinal aviária (EIA), que pode causar diarreia crônica, perda de peso, baixa produção de ovos e ovos sujos de fezes (Medhaniea et al. 2013). Podendo apresentar tiflite linfoplasmocítica, hiperplasia de criptas, erosão epitelial e aumento do número de células caliciformes (Shivaprasad & Duhamel 2005; Feberwee et al. 2008). As principais causadoras são as *B. intermedia* e *B. pilosicoli* (Stephens & Hampson 1999, Bano et al. 2008) e em menor frequência a *B. alvinipulli* (Phillips et al. 2006, Feberwee et al. 2008).

A colonização por *Brachyspira* é significativamente maior em aves mais velhos, sugerindo que após uma infecção inicial a população bacteriana aumenta com o passar do tempo. Assim testes rotineiros para detecção precoce poderiam ser utilizados e serem tomadas as medidas necessárias para o controle do agente dentro das propriedades avícolas minimizando futuras perdas econômicas (Phillips et al. 2005, Medhanie et al. 2013).

Diversos países produtores de aves já constataram a ocorrência de *Brachyspira* sp. as produções. Na Itália a presença de *Brachyspira* foi de 72,4% em granjas de postura sendo que 31% destas amostras eram patogênicas (Bano et al. 2008), na Austrália a prevalência encontrada foi de 42% em frangos de corte e 68% em poedeiras (Stephens & Hampson 1999) e recentemente na Argentina foi encontrado positividade entre 50 a 65% nas granjas de poedeiras avaliadas (Illanes et al. 2016).

O diagnóstico laboratorial tradicional de *Brachyspira* spp. é realizado através de cultura e provas bioquímicas. No entanto, estes métodos são trabalhosos e demorados, podendo levar até 40 dias para se obter o resultado, além disso, a identificação da espécie por parâmetros bioquímicos podem ser dificultada com o fraco crescimento das colônias puras ou por uma micribiota acompanhante (Boye et al. 1998, Råsbäck et al. 2006). Sendo que em alguns casos não é possível realizar a identificação da espécie em amostras positivas (Illanes et al., 2016). Assim métodos alternativos para o diagnóstico de *Brachyspira spp.* vem sendo desenvolvidos e testados entre as diferentes espécies afetadas (Boye et al. 1998, Jensen et al. 2000, Phillips et al. 2005, Phillips et al. 2006, Råsbäck et al. 2006, Schmiedel et al. 2009, Song & Hampson 2009, Jensen et al. 2010, Burrough et al. 2013, Wilberts et al. 2015).

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é rápida e sensível além de possibilitar a identificação e localização do agente. A FISH ainda permite que se avalie o número e morfologia das células bacterianas, além de identificar as espécies, utilizando tecidos fixados em formol. Com a capacidade de detectar a presença de uma célula especifica na presença de 10^6 celulas as quais não são alvo. FISH detecta sequências de ácidos nucleicos com uma sonda marcada com um agente fluorescente que se hibridiza especificamente com a sua sequência alvo complementar no interior da célula intacta. Na microbiologia as áreas mais utilizadas são as porções do gene 16S rRNA devido a sua preservação e estabilidade genética. As sondas testadas são produzidas a partir de sequências exclusivas que permitem a identificação de um gênero especifico, espécie especifica chegando até mesmo a um nível intraespécie especifico (Amann et al. 1995, Boye et al. 1998, Moter & Göbel 2000, Schmiedel et al. 2009).

Na avaliação de *Brachyspira* sp. em fezes, os níveis de detecção são semelhantes quando comparando a qPCR utilizando fezes frescas e FISH utilizando fezes fixadas em formol. A técnica de FISH falhou na utilização de fezes fresca, pois o formol utilizado para fixação evitou a degradação dos ácidos nucleicos alvos da técnica, no entanto o qPCR quando executado com amostras fixadas em formol raramente apresentou positividade, pois o formol inibi a reação de PCR. Desta maneira amostras fixadas em formol são mais adequadas para a utilização na FISH (Wilberts et al. 2015).

Este estudo avaliou a eficiência da técnica de FISH em amostras de ceco de poedeiras comerciais fixadas em formol para a detecção de *B. pilosicoli, B. intermedia* e *B. hyodysenteriae*, comparado com a técnica de cultura de fezes fresca com posterior confirmação da espécie através da qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná com o protocolo CEUA/Palotina 06/2017.

4.1 Amostras

Ao total foram coletadas 112 amostras sendo 42 oriundas de granjas de galinhas de postura comercial e 70 de granjas de matrizes de corte. A idade das aves variou entre 35 a 82 semanas. Foram realizados *swabs* de cloaca em aves escolhidas aleatoriamente ao longo do galpão de aves com e sem diarreia ou histórico de queda de postura. Os swabs coletados foram imediatamente acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e enviadas ao laboratório para o isolamento bacteriano. As aves foram necropsiadas e fragmentos de ceco foram coletados e fixados em formol tamponado a 10% e posteriormente processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina preconizada por Tolosa et al. (2003).

4.2 Isolamento bacteriano

As amostras foram semeadas em meio seletivo para *Brachyspira* sp. composto por ágar T.S.Y (Agar de isolamento de anaerobiose microtrade KM 1000, Extrato de levedura OXOIDL0021 e Agar triptona de soja DB 211043), suplementado com 5% de sangue ovino desfibrinado, Rinfampicina 100% (Sigma R-3501), Espectiomicina 100% (Sigma S-9007), Vancomicina 100% (Sigma V-2002) e Colistina 25.000 und (Sigma C-1511), e incubadas em jarras de anaerobiose, utilizando meios de anaerobiose (Anaerobac – Probac do Brasil) a 42°C por 5 dias ou até evidenciação da hemólise.

As amostras com crescimento de colônias suspeitas de *Brachyspira* sp. foram subcultivadas em Agar de isolamento de anaerobiose (Microtrade KM 1000) suplementados com 5% de sangue ovino desfibrinado, incubadas em condições anaeróbias utilizando meio de anaerobiose (Anaerobac – Probac do Brasil) a 42°C por 7 dia. Posteriormente as colônias foram acondicionadas em criotubos contendo Soro Fetal Bovino e estocados a -80°C para posterior fenotipagem por qPCR.

4.3 qPCR (Reaçao em cadeia da Polimerase em tempo)

As amostras foram analisadas em laboratório particular, utilizando primers descritos por La et al. (2003) para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, e para a *B. intermedia* a sequencia descrita por Phillips et al., (2005). O protocolo seguiu o preconizado por Song & Hampson (2009).

4.4 Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Para a realização da técnica de FISH, utilizou-se quatro sondas que foram testadas individualmente em cada amostra, sendo uma sonda para o gênero *Brachyspira* e outras três espécies especifica sintetizadas comercialmente (Invitrogem), as sequências utilizadas foram a descrita por Schmiedel et al. (2009) para *B*. spp. porção alvo 16S rRNA sendo ela: ATTAGTCCATGTTTCCAT; as descritas por Boye et al. (1998) para *B. hyodysenteriae* porção 23S rRNA: CTCACGATGAACCTTCGAC e para a *B. pilosicoli* porção 16S rRNA*:* GCTCATCGTGAAGCGAAA; e a descrita por Phillips et al. (2006) para *B. intermedia* porção do gene *nox*: ATAAACATCAGGATCTTTGC. Todas foram marcadas com o fluorcromo Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher) e com purificação HPLC. Cortes histológicos de 5µm em lâminas silanizadas foram desparafinados em duas baterias de xilol por10 minutos cada, reidratados durante 5 minutos em cada uma das seguintes soluções etanol absoluto, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70% e água destilada. As lâminas foram secas em temperatura ambiente para então serem montadas em Coverplates (Thermo Fisher, cat n°72110017, Waltham, MA, USA) e encaixadas a uma câmara de hibridização (Coverplate slide rack, Thermo Fisher, cat n° 73310017, Waltham, MA, USA), cada lâmina foi incubada com 99µl de tampão de hibridização (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio) adicionada de 1µl de solução contendo 100 ng de sonda, a 45°C por 16 horas. Após esse período, as lâminas foram lavadas três vezes com tampão de hibridização pré-aquecido a 45°C, lavadas três vezes com solução de lavagem pré-aquecida a 45°C (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl) e por último lavadas em água ultrapura durante dois minutos e secas em estufa a 45°C. As lâminas forma montadas utilizando meio de montagem próprio para microscopia de fluorescência e imediatamente foi realizada a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus, FSX 100, Japão) em filtro adequado para o fluorcromo, em aumento de 40x.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram comparados em quatro grupos sendo eles o isolamento contra técnica de FISH *B.* sp., e as análises especificas de qPCR e FISH para as três espécies *B. hyodysenteriae, B. intermedia* e *B. pilosicoli* utilizando as amostras positivas no isolamento. O teste realizado foi o de qui-quadrado, considerando $p<0,05$ estatisticamente significativo, utilizando o software SAS 9.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na comparação entre a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e a qPCR, apartir das amostras positivas no isolamento bacteriano, valores demonstrados no quadro 1, foi observado que a

técnica de FISH foi estatisticamente superior para a identificação das espécies *B. pilosicoli* e a *B. intermedia* e não ocorreu diferença significativa entre as técnicas para a *B. hyodysenteriae*.

Entre as amostras submetidas a qPCR, duas aves avaliadas apresentaram infecções mistas e em 21 delas não foi possível definir a espécie entre as três pesquisadas. Dentre as espécies patogênicas descritas em aves, a *B. alvinipulli* é relatada em baixa frequência a campo, com poucos isolamentos e surtos relatados na literatura (Phillips et al., 2005, Feberwee et al., 2008), não sendo alvo desse trabalho. Apesar disso um grande número de espécies apatogenicas de Brachyspira já foram identificadas no intestino de aves, entre elas a *B. innocens, B. murdochii* e a *B. pulli* (Feberwee et al., 2008) o que explica a presença de amostras não caracterizadas nesse estudo.

As quatro sondas da técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) foram testadas individualmente nas 112 amostras, e os resultados encontrados foram os seguintes; 52 amostras positivas para a sonda *Brachyspira* spp, 22 amostras positivas para a sonda *Brachyspira hyodesenteriae*, 7 amostras positivas para a sonda *Brachyspira pilosicoli* e 28 amostras positivas para a sonda *Brachyspira intermedia*, 44 amostras foram negativas para todas as sondas, 11 amostras foram positivas apenas para a sonda *Brachyspira* spp. O número de amostras com infecção mista foi de cinco e para *B. hyodysenteriae* e *B. intermedia*, uma para *B. intermedia* e *B. pilosicoli* e duas amostras para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. Hess et al. (2017), identificaram que aves podem se infectar com diferentes espécies de *Brachyspira* durante a vida, ocorrendo uma mudança das espécies ao longo do tempo. Isso decorre da introdução de diferentes espécies do ambiente, levando a reinfecções contínuas das aves, aonde uma cepa não interfere na infecção heteróloga.

O resultado encontrado na FISH com a sonda para *B.* spp, 52 amostras, foi estatisticamente superior ao encontrado no isolamento bacteriano. Esta diferença pode estar associada ao fato que a cultura possui como limitação para detecção o número de bactérias presentes na amostra (Råsbäck et al. 2006, Mappley et al. 2014). Esta limitação também foi observada quando utilizado apenas a técnica de qPCR. Segundo Philips et al. (2006), o limite de detecção da técnica é de 10^6 células/g de fezes para *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira intermedia* e quando associada o isolamento bacteriano com qPCR este limite foi de 10^3 células/g para ambas as espécies.

Baixos números de células bacterianas podem ser mantidos no intestino de aves sem a ocorrência da EIA, que pode se manifestar após as aves passarem por algum desafio (Mappley et al. 2012, Mappley et al. 2014). Como as aves deste estudo não estavam manifestando sinais clínicos de espiroquetose, o número de bactérias excretadas poderia estar abaixo do limite para serem detectadas através da cultura, porém, a técnica de FISH é capaz de detectar até mesmo apenas uma única célula bacteriana desde que esteja presente no corte histológico visualizado (Boye et al. 1998).

As amostras positivas na FISH apresentaram forte sinal brilhante no formato típico de espiroquetas que foi facilmente identificada (Figura 1), este sinal se destacou da autofluorescência do tecido, esta característica também foi observada por Rojas et al. (2017) que realizaram FISH utilizando sonda para o gênero *Brachyspira* em amostras de intestino humano, porém, Neves (2012) e Boye et al. (1998) ao realizarem FISH em intestino de suínos encontram dificuldades para visualizar *B. pilosicoli* devido ao fraco sinal apresentado pela sonda nesta espécie. Para contornar tal dificuldade em situações de dúvida, foi realizada a troca do filtro utilizando-se um inespecífico para a sonda testada, desta forma a sonda não emitiria o seu sinal. Os sete casos positivos para *B. pilosicoli* neste estudo não se apresentaram ofuscados ou com sinal fraco.

A colonização por *B. intermedia* pode levar a perdas na produção de ovos até mesmo nos casos aonde não são observadas lesões macroscópicas ou microscópicas no sistema digestório. Nesses casos prejuízos são detectados associados a presença de espiroquetas no lúmen das criptas. Desta forma o diagnóstico de EIA causado por *B. intermedia* depende de métodos complementares que permita a especificação deste agente (Stephens & Hampson 2002, Hess et al. 2017). Desta forma a FISH apresentou-se efetiva para a detecção da *B. intermedia*, sendo útil para a triagem do agente em granjas em que a manifestação da EIA é branda.

A colonização intestinal por *B. hyodysenteriae* em suínos pode causar diarreia grave de alto impacto econômico, denominada disenteria suína (Boye et al. 1998). Já foi evidenciado que roedores presentes em granjas podem carrear *Brachyspira.* spp. (Backhans et al. 2011). Dessa forma a positividade de amostras para a *B. hyodysenteriae* deve servir de alerta devido à proximidade de granjas de suínos e aves em regiões aonde a agroindústria é prevalente, pois as aves podem servir como uma fonte da infecção para os suínos.

Apesar da alta eficiência da FISH, se faz necessária a ressalva, quanto ao uso exclusivo dos métodos moleculares de diagnóstico. Não podemos deixar de pautar que possíveis mutações genéticas ou até mesmo alguma limitação do banco de dados de sequencias com relação a *Brachyspir*a spp. podem fazer com que casos positivos passem desapercebidos tanto pela FISH como pela qPCR. Nesse caso o isolamento

ainda é uma ferramenta útil, principalmente quando se objetiva a realização de testes de resistência bacteriana (Råsbäck et al. 2006, Rojas et al. 2017).

6 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a técnica de FISH aplicado em ceco de galinhas fixados em formol foi eficiente para identificação de *Brachyspira* spp*., B. intermedia, B pilosicoli* e a *B. hyodysenteriae,* servindo como uma ferramenta rápida para o diagnóstico das principais *Brachyspiras* causadoras de EIA, desta forma reduzindo o tempo entre o envio de amostras até o diagnostico possibilitando assim o início da intervenção terapêutica.

REFERÊNCIAS

Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation. Microbiological Reviews. 59:143–69.

Backhans A., Jansson D.S., Aspán A. & Fellström C. 2011. Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. Vet. Microbiol. 153:156-162.

Bano L., Merialdi G., Bonilauri P., Dall'anese G., Capello K., Comin D., Cattoli G., Sanguinetti V., Hampson D. J. & Agnoletti, F. 2008. Prevalence, disease associations asn risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira spp.*) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. Avian Pathol. 37(3):281-286.

Boye M., Jensen T.K., Møller K., Leser T.D. & Jorsal, S.E. 1998. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA *in situ* hybridization. Mol. Cell. Probes. 12:323-330.

Burrough E.R., Wilberts B.L., Bower L.P., Jergens A.E. & Schwartz K.J. 2013. Fluorescent *in situ* hybridization for detection of "*Brachyspira hampsonii*" in porcine colonic tissues. J. Vet. Diagn. Invest. 25(3):407-412.

Feberwee A., Hampson D.J., Phillips N.D., La T., Van Der Heijden H.M.J.F., Wellenberg G.J., Dwars R.M., Landman W.J.M. 2008. Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and Other Pathogenic *Brachyspira* Species in Chickens from Laying Flocks with Diarrhea or Reduced Production or Both. J. Clin. Microbiol. 46(2):593-600.

Hess C., Zloch A., Bilic I., Hacksteiner K., Kuchling S. & Hess M. 2017. High prevalence of Brachyspira spp. in layers kept in alternative husbandry systems associated with frequent species variations from end of rearing to slaughter. Avian Pathol. 46(5):481-487.

Illanes N.J.V., Tamiozzo P.J., Cabral A., Bertone J., Romanini S., Yaciuk R., Vazquez M. & Pelliza B. R. 2016. Detección de *Brachyspira pilosicoli* y otras espécies de *Brachyspira* en granjas avícolas argentinas. Ver. Argent. Micribiol. 48(1):67-70.

Jensen T.K., Møller K., Boye M., Leser T.D. & Jorsal S.E. 2000. Scanning electron microscopy and fluorescent *in situ* hybridization of experimental *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* infection in growing pigs. Vet. Pathol. 37(22):22-32.

Jensen T.K., Christensen A.S. & Boye M. 2010. *Brachyspira murdochii* colitis in pigs. Vet. Pathol. 47(2):334-338.

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: 3372–3375.

Mappley L.J., Black M.L., AbuOun M., Darby A.C., Woodward M.J., Parkhill J., Turner A.K., Bellgard M.I., La T., Phillips N.D., Ragione R.M.L. & Hampson D.J. 2012. Comparative genomics of *Brachyspira pilosicoli* strains: genome rearrangements, reductions and correlation of genetic compliment with phenotypic diversity. BMC Genomics 13:454.

Mappley L.J., La Ragione R.M. & Woodward M.J. 2014. *Brachyspira* and its role in avian intestinal spirochaetosis. Vet. Microbiol. 168:245-260.

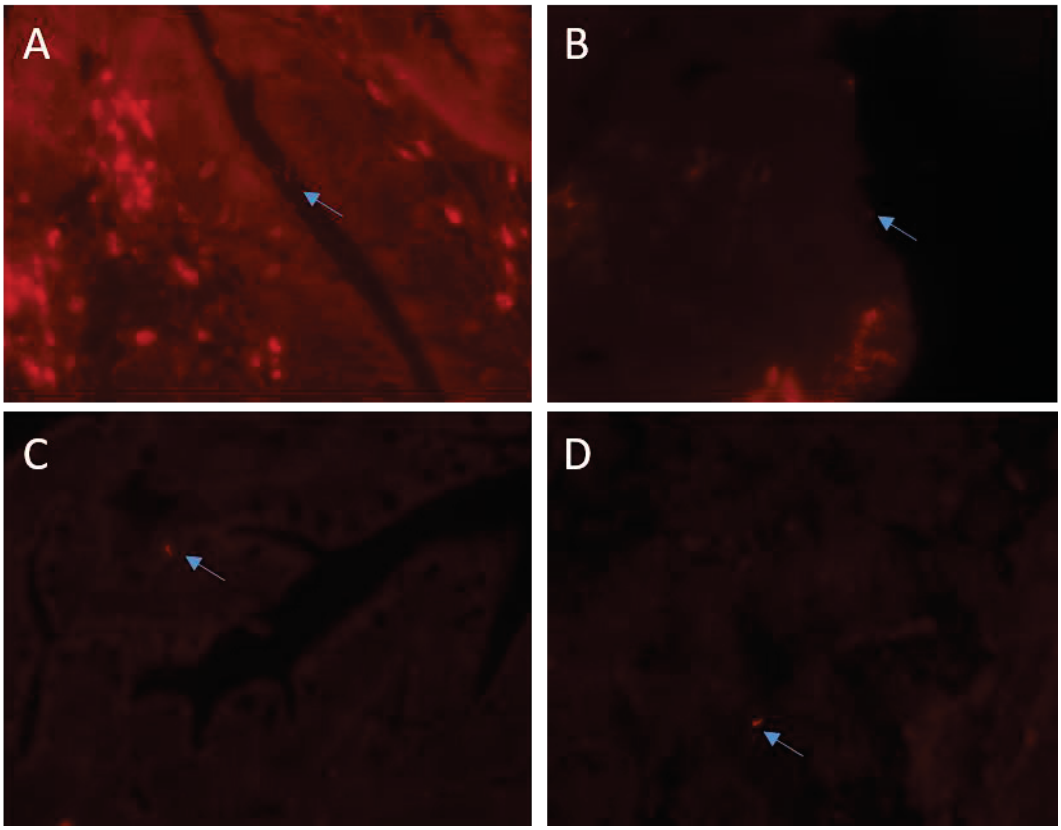
Medhanie G.A., Mcewen S.A., Weber L., Sanei B., Cooley L., Houghton S., Slavic D. & Guerin M. T. 2013. Risk factors associated with the colonization of Ontario layer chicken flocks with *Brachyspira* species. Prev. Vet. Med. 109:304-311.

Moter A. & Göbel U.B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Methods. 41:85-112.

Neves S. M. N. Avaliação das técnicas de isolamento, reação em cadeia da polimerase e hibridização fluorescente *in situ* para diagnóstico de *Brachyspira* sp. em suínos. Dissertação de Mestrado. Disponível em < http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-97XF8W/saira_mabel_nara_neves.pdf?sequence=1> Acesso em 20 abr. 2017.

Phillips N.D., La T. & Hampson D.J. 2005. A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens. Vet. Microbiol. 105:189-198.
Phillips N. D., La T. & Hampson D.J. 2006. Development of a two-step nested duplex PCR assay for the rapid detection of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* in chicken faeces. Vet. Microbiol. 116:239-245.
Råsbäck T., Fellström C., Gunnarsson A. & Aspán A. 2006. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. J. Microbiol. Methods. 66:347-353.
Rojas P., Annett P., Schulze J., Wiessner A., Loddenkemper C., Epple H.J., Sterlacci W., Vieth M., Kikhney J. & Moter A. 2017. Distribution and phylogeny of *Brachyspira* spp. in human intestinal spirochetosis revealed by FISH and *16S rRNA*-gene analysis. Anaerobe. 47:25-42.
Schmiedel D., Epple H.J., Loddenkemper C., Ignatius R., Wagner J., Hammer B., Petrich A., Stein H., Göbel U.B., Schneider T. & Moter A. 2009. Rapid and accurate diagnosis of human intestinal spirochetosis by Fluorescence *in Situ* Hybridization. J. Clin. Microbiol. 47(5):1393-1401.
Shivaprasad H.L. & Duhamel G.E. 2005. Cecal Spirochetosis Caused by *Brachyspira pilosicoli* in Commercial Turkeys. Avian Dis. 49(4):609-613.
Song Y. & Hampson D.J. 2009. Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens. Vet Microbiol. 137:129-136.
Stephens C.P. & Hampson D.J. 1999. Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. Avian Pathol**.** 28:447-454.
Stephens, C.P. & Hampson, D.J. 2002. Experimental infection of broiler breeder hens with the intestinal spirochaete *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* causes reduced egg production. Avian Pathol. 31(2):169-175.
Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A. & Freitas Neto A.G. Manual de Técnicas Para Histologia Normal e Patológica. 2 ed. Barueri: Manole, 2003. P. 20-41.
Wilberts B.L., Warneke H.L., Bower L.P., Kinyon J.M. & Burrough E.R. 2015. Comparison of culture, polymerase chain reaction, and fluorescent *in situ* hybridization for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and "*Brachyspira hampsonii"* in pig feces. J. Vet. Diagn. Invest. 27(1):41-46.

Fig.1. Fotomicrografia com marcação positiva para Brachyspira em ceco de galinhas pela técnica de FISH. (A) Marcação específica para *B*. sp. (seta); (B) Marcação específica para *B*. *hyodysenteriae* (seta); (C) Marcação específica para *B*. pilosicoli (seta); (D) Marcação específica para *B*. *intermedia* (seta).



Fonte: O autor (2017).

Quadro 1. Comparação da identificação das espécies *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *B. intermedia* através das técnicas de qPCR e FISH para amostras positivas em cultura para Brachyspira sp. de aves de postura e matrizes comerciais, N=40:

FISH*	qPCR**	*B. hyodysenteriae*	*B. pilosicoli*	*B. intermedia*
Positivo	Positivo	10	0	6
Positivo	Negativo	3[a]	4[a]	9[a]
Negativo	Positivo	4[a]	0[b]	1[b]
Negativo	Negativo	23	36	24

* Hibridização fluorescente *in situ*; ** qPCR reação em cadeia da Polimerase em tempo real. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste Qui- quadrado (P<0,05); letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: O autor (2017).

REFERÊNCIAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual ABPA 2016**. Disponível em: < http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso em: 02 set. 2017.

AMANN R. I., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation. **Microbiological Reviews**. 59:143–69, 1995.

BACKHANS, A.; JANSSON, D.S.; ASPÁN, A.; FELLSTRO, C. Typing of Brachyspira spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. **Vet. Microbiol**., v. 153, p.156-162, 2011.

BANO, L.; MERIALDI, G.; BONILAURI, P.; DALL'ANESE, G.; CAPELLO, K.; COMIN, D.; CATTOLI, G.; SANGUINETTI, V.; HAMPSON, D. J.; AGNOLETTI, F. Prevalence, disease associations asn risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (Brachyspira spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. **Avian Pathol**., v. 37, n. 3, p. 281-286, 2008.

BOYE, M.; JENSEN, T.K.; MØLLER, K.; LESER, T.D.; JORSAL, S.E. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA *in situ* hybridization. **Mol. Cell. Probes**., v. 12, p. 323-330, 1998.

BURROUGH, E.R.; WILBERTS, B.L.; BOWER, L.P.; JERGENS, A.E.; SCHWARTZ, K.J. Fluorescent in situ hybridization for detection of "*Brachyspira hampsonii*" in porcine colonic tissues. **J. Vet. Diagn. Invest**., v. 25, n. 3, p. 407-412, 2013.

FEBERWEE, A.; HAMPSON, D.J.; PHILLIPS, N.D.; LA, T.; VAN DER HEIJDEN, H.M.J.F.; WELLENBERG, G.J.; DWARS, R.M.; LANDMAN, W.J.M. Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and Other Pathogenic Brachyspira Species in Chickens from Laying Flocks with Diarrhea or Reduced Production or Both. **J. Clin. Microbiol**., v. 46, n. 2, p. 593-600, 2008.

HESS, C.; ZLOCH, A.; BILIC, I.; HACKSTEINER, K.; KUCHLING, S.; HESS, M. High prevalence of *Brachyspira* spp. in layers kept in alternative husbandry systems associated with frequent species variations from end of rearing to slaughter. **Avian Pathol.**, v. 46, n. 5, p. 481-487, 2017.

ILLANES, N.J.V.; TAMIOZZO, P.J.; CABRAL, A.; BERTONE, J.; ROMANINI, S.; YACIUK, R.; VAZQUEZ, M.; PELLIZA, B. R. Detección de *Brachyspira pilosicoli* y otras espécies de Brachyspira en granjas avícolas argentinas. **Ver. Argent. Micribiol.**, v. 48, n. 1, p. 67-70, 2016.

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

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

JENSEN, T.K.; CHRISTENSEN, A.S.; BOYE, M. *Brachyspira murdochii* colitis in pigs. **Vet. Pathol.**, v. 47, n. 2, p. 334-338, 2010.

La T., Phillips N.D., Hampson D.J. Development of a duplex PCR assay for detection of Brachyspira hyodysenteriae and Brachyspira pilosicoli in pig feces**. J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3372-3375, 2003.

MAPPLEY, L.J.; BLACK, M.L.; ABUOUN, M.; DARBY, A.C.; WOODWARD, M.J.; PARKHILL, J.; TURNER, A.K.; BELLGARD, M.I.; LA, T.; PHILLIPS, N.D.; RAGIONE, R.M.L.; HAMPSON, D.J. Comparative genomics of *Brachyspira pilosicoli* strains: genome rearrangements, reductions and correlation of genetic compliment with phenotypic diversity. **BMC Genomics**, v. 13, p. 454, 2012.

MAPPLEY, L.J.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Brachyspira and its role in avian intestinal spirochaetosis. **Vet. Microbiol.**, v. 168, p. 245-260, 2014.

MEDHANIE, G.A.; MCEWEN, S.A.; WEBER, L.; SANEI, B.; COOLEY, L.; HOUGHTON, S.; SLAVIC, D.; GUERIN, M.T. Risk factors associated with the colonization of Ontario layer chicken flocks with Brachyspira species. **Prev. Vet. Med.**, v. 109, p. 304-311, 2013.

MOTER, A.; GÖBEL, U.B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms**. J. Microbiol. Methods.**, v. 41, p. 85-112, 2000.

NEVES, S. M. N. Avaliação das técnicas de isolamento, reação em cadeia da polimerase e hibridização fluorescente in situ para diagnóstico de *Brachyspira* sp.

em suínos. Dissertação de Mestrado. Disponível em < http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-97XF8W/saira_mabel_nara_neves.pdf?sequence=1> Acesso em 20 abr. 2017.

PHILLIPS, N.D.; LA, T.; HAMPSON, D.J. A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (Brachyspira spp.) in three flocks of laying hens. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p. 189-198, 2005.

PHILLIPS, N. D.; LA, T.; HAMPSON, D.J. Development of a two-step nested duplex PCR assay for the rapid detection of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* in chicken faeces. **Vet. Microbiol.**, v. 116, p. 239-245, 2006.

RÅSBÄCK, T.; FELLSTRÖM, C.; GUNNARSSON, A.; ASPÁN, A. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. **J. Microbiol. Methods.**, v. 66, p. 347-353, 2006.

ROJAS, P.; ANNETT, P.; SCHULZE, J.; WIESSNER, A.; LODDENKEMPER, C.; EPPLE, H.J.; STERLACCI, W.; VIETH, M.; KIKHNEY, J.; MOTER, A. Distribution and phylogeny of *Brachyspira* spp. in human intestinal spirochetosis revealed by FISH and 16S rRNA-gene analysis. **Anaerobe**, v. 47, p.25-42, 2017.

SCHMIEDEL, D.; EPPLE, H.J.; LODDENKEMPER, C.; IGNATIUS, R.; WAGNER, J.; HAMMER, B.; PETRICH, A.; STEIN, H.; GÖBEL, U.B.; SCHNEIDER, T.; MOTER, A. Rapid and accurate diagnosis of human intestinal spirochetosis by *Fluorescence in Situ* Hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 5, p.1393-1401, 2009.

SHIVAPRASAD, H.L.; DUHAMEL, G.E. Cecal Spirochetosis Caused by *Brachyspira pilosicoli* in Commercial Turkeys. **Avian Dis.**, v. 49, n. 4, p. 609-613, 2005.

SONG, Y.; HAMPSON, D.J. Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens. **Vet. Microbiol.**, v. 137, p.129-136, 2009.

STEPHENS, C.P.; HAMPSON, D.J. Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. **Avian. Pathol.**, v. 28, p.447-454, 1999.

STEPHENS, C.P.; HAMPSON, D.J. Experimental infection of broiler breeder hens with the intestinal spirochaete *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* causes reduced egg production. **Avian Pathol.**, v. 31, n. 2, p. 169-175, 2002.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS NETO, A.G. Manual de Técnicas Para Histologia Normal e Patológica. 2 ed. Barueri: Manole, 2003. P. 20-41.

WILBERTS, B.L.; WARNEKE, H.L.; BOWER, L.P.; KINYON, J.M.; BURROUGH, E.R. Comparison of culture, polymerase chain reaction, and fluorescent *in situ* hybridization for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and "*Brachyspira hampsonii*" in pig feces. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 27, n.1, p.41-46, 2015.

APÊNDICE A – PROTOCOLO FISH

Passo 1: Após o corte levar as lâminas para retirada de parafina em estufa de 65°C;

Passo 2: Lavar as cover plates em água destilada e secá-los em estufa de secagem a 45°C;

Passo 3: Desparafinizar e reidratar os cortes, mergulhar as lâminas no xilol I por 10 minutos, xilol II por 10 minutos, etanol absoluto por 5 minutos, etanol 90% por 5 minutos, etanol 80% por 5 minutos, etanol 70% por 5 minutos e água destilada por 5 minutos;

Passo 4: Secar as lâminas e montar na cover plates: pingar 80 microlitros de tampão de hibridização na superfície do cover plate, encaixar a lâmina com o tecido em contato com o cover plate e encaixar na rack;

Passo 5: Diluir a sonda: 1 microlitro com 100ng de sonda/amostra* a ser testada para 99 microlitros de tampão de hibridização (a sonda é sensível a luz, a partir desse passo a técnica deve ser realizada na ausência de luz);

Passo 6: Pipetar 100 microlitros da sonda diluída na superfície superior “do complexo” cover plate e lâmina;

Passo 7: Tampar o suporte e incubar over night (mínimo de 16 horas) à 45°C;

Passo 8: Fazer 3 lavagens sucessivas com tampão de hibridização pré-aquecido a 45°C na superfície superior “do complexo” cover plate & lâmina. Repetir a lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem pré-aquecido 45°C, e por último uma vez com água destilada que deve permanecer por dois minutos;

Passo 9: secar as lâminas em estufa a 45°C até desaparecer toda a água, aproximadamente 10 min.

Passo 10: Montar as lâminas utilizando meio de montagem próprio para microscopia de fluorescência, utilizar uma pequena gota do meio. As lamínulas devem ser limpas antes de usar.

Passo 11: Fazer a leitura em microscópio de fluorescência, no aumento de 40x. Quando não se consegue fazer o foco verificar se a lâmina não está suja com próprio meio de montagem.

APÊNDICE B – TAMPÃO HIBRIDIZAÇÃO

Reagentes:

SDS 10%	5 mL
NaCl 5M	90 mL
Tris 1M pH 7,2	50 mL
Água destilada	Até 500 mL
HCl 1M	O suficiente para a reação

Modo de preparo:

Passo 1: Pesar os reagentes separadamente e diluir nas devidas concentrações: Tris (1M) 6,057 gramas para 50 mL de água destilada; NaCl (5M) 26,298 gramas para 90 mL de água destilada;

Passo 2: Ajustar o pH da solução de Tris para 7,2 utilizando solução a 1M de HCl;

Passo 3: Colocar a solução de Tris em proveta de 500 mL;

Passo 4: Adicionar a solução de NaCl na proveta de 500 mL;

Passo 5: Adicionar 5 ml do SDS 10% (cuidadosamente para evitar excesso de bolhas);

Passo 6: Completar com água destilada até 500 mL (cuidadosamente para evitas excesso de bolhas).

O tampão de hibridização tem validade de 2 meses.

APÊNDICE C – TAMPÃO DE LAVAGEM

Reagentes:

NaCl 5M	90 mL
Tris 1M pH 7,2	50 mL
Água destilada	Até 500 mL
HCl 1M	O suficiente para a reação

Modo de preparo:

Passo 1: Pesar os reagentes separadamente e diluir nas devidas concentrações: Tris (1M) 6,057 gramas para 50 mL de água destilada; NaCl (5M) 26,298 gramas para 90 mL de água destilada;

Passo 2: Ajustar o pH da solução de Tris para 7,2 utilizando solução a 1M de HCl;

Passo 3: Colocar a solução de Tris em proveta de 500 mL;

Passo 4: Adicionar a solução de NaCl na proveta de 500 mL;

Passo 5: Completar com água destilada até 500 mL.

O tampão de lavagem tem validade de 4 meses.

APÊNDICE D – INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short commu-nications) sob a forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R$ 2.000,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores**;

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de "INDEX TERMS" que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=**Figuras**), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabetica e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. **Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:**

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do "Inserir nota de fim", do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicatívas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas**. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçandos, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.