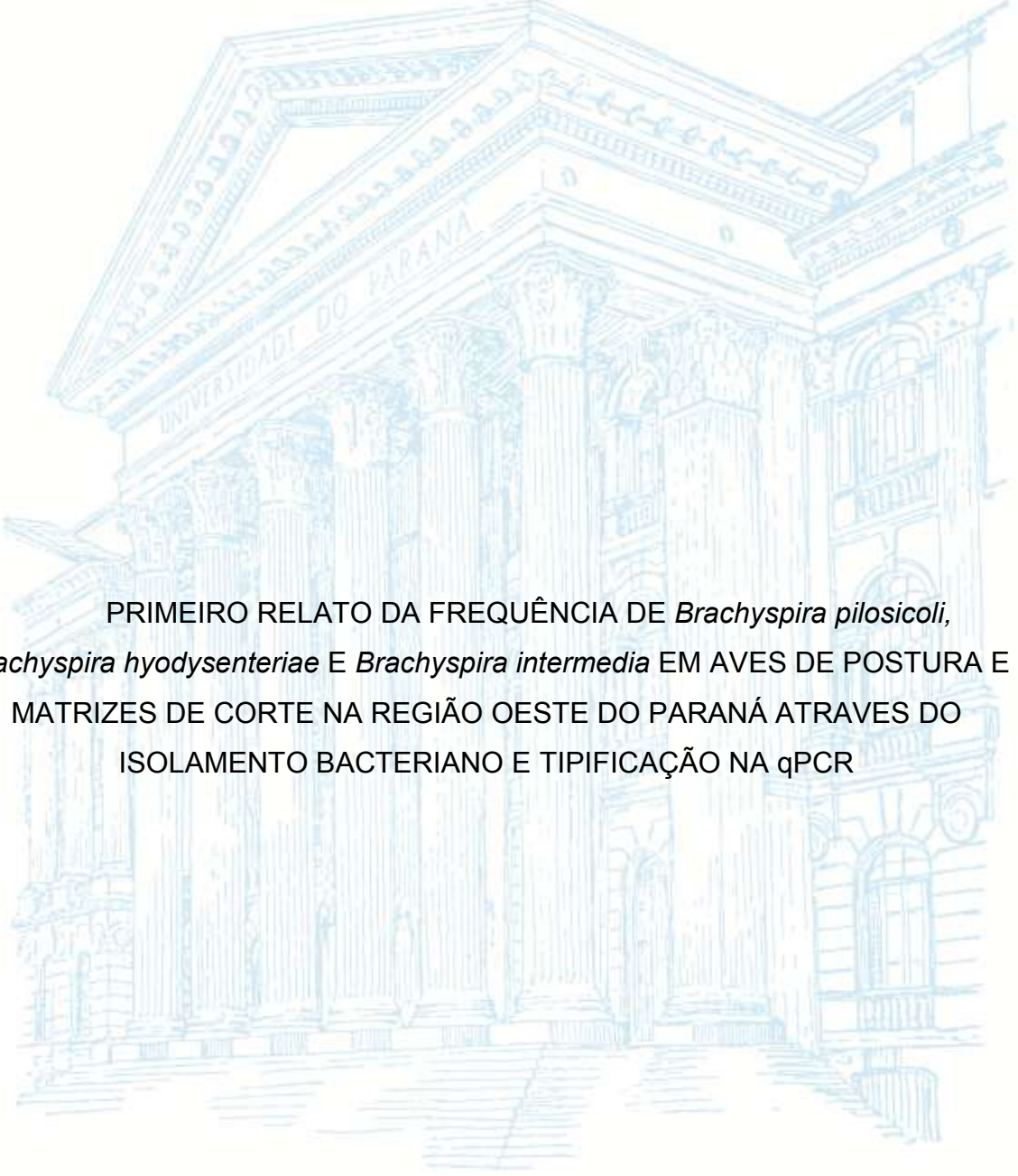


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO GOULART



PRIMEIRO RELATO DA FREQUÊNCIA DE *Brachyspira pilosicoli*,
Brachyspira hyodysenteriae E *Brachyspira intermedia* EM AVES DE POSTURA E
MATRIZES DE CORTE NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ ATRAVES DO
ISOLAMENTO BACTERIANO E TIPIFICAÇÃO NA qPCR

PALOTINA

2018

THIAGO GOULART

PRIMEIRO RELATO DA FREQUÊNCIA DE *Brachyspira pilosicoli*,
Brachyspira hyodysenteriae E *Brachyspira intermedia* EM AVES DE POSTURA E
MATRIZES DE CORTE NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ ATRAVES DO
ISOLAMENTO BACTERIANO E TIPIFICAÇÃO NA qPCR

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

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G694 Goulart, Thiago
Primeiro relato da frequência de *brachyspira pilosicoli*,
brachyspira hyodysenteriae e *brachyspira intermedia* em aves de
postura e matrizes de corte na região oeste do Paraná através do
isolamento bacteriano e tipificação na qPCR / Thiago Goulart.
-- Palotina, 2018
31f.

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

1. Aves comerciais. 2. Enteropatogenos . 3. Espiroquetose.
I. Viott, Aline de Marco. II. Universidade Federal do Paraná.
III. Título.

CDU 636.5



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 THIAGO GOULART intitulada: **PRIMEIRO RELATO DA FREQUÊNCIA DE *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* EM AVES DE POSTURA E MATRIZES DE CORTE NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ ATRAVES DO ISOLAMENTO BACTERIANO E TIPIFICAÇÃO NA qPCR**, 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, 29 de Março de 2018.

ALNEIDE MÁRCO VIOTT

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CLAUDIA YURIKA TAMEHIRO

Avaliador Externo (UENP/LM)

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, no Brasil são escassos os dados de frequência ou prevalência desses patógenos em aves comerciais. Devido à característica fastidiosa de crescimento, estes microorganismos são negligenciados e seus sinais confundidos com outras patologias. O presente trabalho buscou isolar, identificar e relatar a frequência dessas bactérias na avicultura assim como as possíveis lesões histopatológicas e contagem de células caliciformes. Foram coletadas amostras de fezes frescas colhidas diretamente do ceco de 110 animais 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 com e sem histórico de diarreia. Desses animais foram coletados fragmentos de ceco para avaliação histopatológica e contagem de células caliciformes. As amostras de fezes coletadas foram submetidas ao isolamento bacteriano. Para identificação primeiramente procedeu-se ao isolamento bacteriano a partir das fezes, técnica ouro para identificação do agente. As amostras que apresentaram características de crescimento positivo foram submetidas a qPCR para identificação das espécies *B. pilosicoli* (BP), *B. intermedia* (BI) e *B. hyodysenteriae* (BH). Das 110 amostras foram obtidos 48 isolamentos característicos de *Brachyspira* (43,6%) e destes na qPCR 13 identificadas como *B. hyodysenteriae* (11,8%) e 5 (4,5%) como *Brachyspira intermedia*, 2 amostras foram positivas para ambos os agentes (1,8%) e 28 não foram caracterizadas através da qPCR (25,5%). Não foram observadas lesões histopatológicas compatíveis com infecção por *Brachyspira* nas amostras positivas no isolamento e na qPCR assim como alteração estatística significativa na contagem de células caliciformes quando comparada com as amostras negativas. Dessa forma conclui-se que as bactérias do gênero *Brachyspira*, incluindo espécies patogênicas, são frequentes em galinhas poedeiras e matrizes comerciais na região oeste do Paraná.

Palavras-chave: Aves comerciais, Frequencia, enteropatogenos, espiroquetose, qPCR.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Brachyspira* can cause enteric diseases in birds and the correct identification is necessary because some species are not pathogenic, in Brazil the frequency or prevalence data about these pathogens in commercial birds is scarce. Due to the fastidious characteristic of growth, these microorganisms are neglected and their signs confused with other pathologies. The present work sought to isolate, identify and report the frequency of these bacteria in poultry farming as well as possible histopathological lesions and count of goblet cells. Samples were collected from fresh feces collected directly from the cecum of 110 animals aged 35 to 82 weeks, 42 from commercial poultry farms and 70 from broiler breeders with and without history of diarrhea. From these animals, cecum fragments were collected for histopathological evaluation and counts of goblet cells. The fecal samples collected were submitted to bacterial isolation. For the first identification, bacterial isolation was performed from the feces, a great technique to identify the agent. Samples that presented positive growth characteristics were submitted to qPCR in order to identify the *B. pilosicoli* (BP), *B. Intermedia* (BI) and *B. hyodysenteriae* (BH) species. From the 110 samples, 48 isolation characteristic of *Brachyspira* (43.6%) were obtained and of these 13 were identified in the qPCR as *B. hyodysenteriae* (11.8%) and 5 (4.5%) as *Brachyspira intermedia*, 2 samples were positive for both the agents (1.8%) and 28 were not characterized by the qPCR (25.5%). Histopathological lesions compatible with *Brachyspira* infection were not observed in the *Brachyspira* positive samples in isolation and in qPCR as well as significant statistical alteration in goblet cell counts when compared to negative samples. Thus, it is conclusive that the bacteria of the genus *Brachyspira* including pathogenic species are frequent in laying hens and commercial matrices in the western region of Parana.

Key-words: Commercial birds, Frequency, enteropathogens, spirochetosis, qPCR

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – CRESCIMENTO POSITIVO PARA BRACHYSPIRA SP. EM MEIO SELETIVO	20
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS EM CULTURA PARA <i>BRACHYSPIRA</i> SP. DE AVES DE POSTURA E MATRIZES COMERCIAIS E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>B. HYODYSENTERIAE</i> , <i>B. PILOSICOLI</i> E <i>B. INTERMEDIA</i> ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE qPCR	19
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
CAPÍTULO 1	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODO	15
Amostras	15
Isolamento bacteriano	15
qPCR (Reação em cadeia da Polimerase em tempo real)	16
Histopatologia.....	16
PAS e contagem de células calciformes	16
Análise estatística	16
RESULTADOS E DISCUSSÕES	16
CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....	18
REFERÊNCIAS	22
APÊNDICE A – PROTOCOLO PARA CONFEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA ISOLAMENTO DE <i>BRACHYSPIRA</i> SPP.	25
APÊNDICE B – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA	27
APÊNDICE C – INSTRUÇÕES AOS AUTORES	29

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango no mundo e o maior exportador desta proteína, para atingir estes números em 2016 alojou 50.524.652 matrizes de corte gerando uma produção 12.90 mil toneladas de carne de frango onde 34% da sua produção foi exportada, neste cenário o Paraná é responsável por 33,46% do abate nacional tornando-o maior produtor nacional (ABPA, 2017). Tendo em vista a importância que esta atividade representa para o país, faz-se necessário elencar alguns pontos críticos que limitam a produção e causam perdas zootécnicas e por consequência, financeiras. Dentre os patógenos que causam tais problemas estão as enterobactérias. A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico (SILVA, 2000). O desenvolvimento de uma microbiota benéfica inibe o crescimento de muitas bactérias patogênicas. (ANDREATTI e CROCCI, 2002).

Devido ao saprofitismo de alguns microrganismos no trato gastrintestinal das aves, vários agentes têm sido frequentemente isolados das excretas. Desta maneira, as aves têm sido consideradas como importante fonte de disseminação das bactérias intestinais para o meio ambiente e deste para o homem, podendo as excretas e a cama dos galpões conterem uma população diversificada de microrganismos, alguns dos quais potencialmente patogênicos para o homem, aves ou ambos (CARVALHO, FLORIOTO e SCHOCKEN-ITURRINO., 2001)

O presente trabalho trata do isolamento e tipificação das bactérias envolvidas na espiroquetose intestinal aviária (EIA). A EIA é uma enfermidade produzida por microorganismos pertencentes ao gênero *Brachyspira*. Esta afeta o ceco e o colón das aves e é reconhecida como um problema na criação de poedeiras comerciais desde o ano de 1986 (VENOSA, 2014).

As bactérias do gênero *Brachyspira* são gram negativas, anaeróbicas restritas e possuem formato espiralado (VENOSA, 2014). O gênero *Brachyspira* compreende várias espiroquetas comensais e patogênicas para muitas espécies animais incluindo o homem, aves e suínos (ILLANES et al, 2016).

Em suínos as enfermidades mais comuns associadas com estas espiroquetas são a disenteria suína causada pela *Brachyspira hyodysenteriae* e a espiroquetose intestinal suína causada pela *Brachyspira pilosicoli*. No ano de 2012, os quadros de colite espiroquetal e disenteria suína, se agravaram no Brasil e desde

então o estado do Paraná vem sofrendo grandes prejuízos principalmente, a região oeste, importante polo da suinocultura. Essas bactérias cursam com diarreia em suínos e perdas econômicas devido a despesas com tratamentos, elevação do custo de produção devido ao aumento da conversão alimentar, desuniformidade entre lotes e também pelo aumento da taxa de mortalidade no rebanho além de representarem um risco zoonótico para humanos imunossuprimidos (NEVES, 2012). Na Austrália, infecção natural com *B. pilosicoli* já foi relatada em criadores de frangos de corte (STEPHENS e HAMPSON, 1999).

Em aves de produção a espiroquetose intestinal aviária (EIA) se caracteriza por sinais clínicos como a diminuição na produção de ovos, ovos sujos de fezes, diarreia crônica e perda de peso (MEDHANIEA et al., 2013) e é causada por uma ou mais bactérias do gênero *Brachyspira* spp., destacando-se a *Brachyspira intermedia* a *Brachyspira pilosicoli* e em menor frequência a *B. alvinipulli* (PHILLIPS e HAMPSON., 2006; FEBERWEE et al., 2008). Histologicamente, as aves acometidas podem apresentar tiflites 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 à ocorrência de tiflites severas em emas (*Rhea americana*) naturalmente infectadas, a mesma espiroqueta responsável pela disenteria suína (JENSEN; STANTON; SWAYNE, 1996).

Perdas econômicas relevantes na avicultura, associada a esses agentes, já foram relatadas em diversos países como Austrália, Estados Unidos, Argentina e México (ALVAREZ, 2009; ILLANES et al., 2016).

A capacidade de transmissão de *Brachyspira* spp. 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*, Portanto em programas de erradicação deve-se levar em conta um rígido controle de roedores em granjas, pois eles podem manter a bactéria no ambiente 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 rebanhos 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 para serem tomadas as medidas necessárias para o controle do agente dentro das propriedades avícolas minimizando futuras perdas econômicas (PHILLIPS e HAMPSON, 2005; MEDHANIE et al., 2013).

A prevalência de *Brachyspira* spp. 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 e HAMPSON, 1999). Recentemente, na Argentina, foi encontrado positividade entre 50 a 65% nas granjas de poedeiras avaliadas (ILLANES et al., 2016).

O diagnóstico microbiológico da EIA requer o isolamento da espiroqueta e sua identificação através de provas bioquímicas. Este microorganismo tem requerimentos de cultivo exigentes e o seu crescimento é lento e fastidioso (ALVAREZ, 2009). Necessitam de meio de cultivo seletivo à temperatura de 37 a 42 °C por até 10 dias. O crescimento se detecta pela hemólise completa ou parcial que a bactéria produz. As espiroquetas podem sobreviver nas fezes por até 17 horas em temperaturas de 37 °C, e 84 horas a 4 °C, porém são susceptíveis a ação dos desinfetantes (VENOSA, 2014) e a altas temperatura.

Como já citado as bactérias do gênero *Brachyspira* possuem um crescimento anaerobiotico fastidioso com a utilização de meios de cultivos com antibióticos específicos. Esse agente requer muitos repasses em cultivo para purificação das cepas e posterior identificação mediante provas bioquímicas (ILLANES et al., 2016). Aliado a isso, muitas vezes os sinais clínicos são brandos ou facilmente confundidos com outros agentes infecciosos e não infecciosos, como Salmoneloses, colibaciloses, coccidioses, diarréias crônicas associadas à excesso de sal ou óleo de soja na dieta. Além disso, as espiroquetas devem ser diferenciadas de *Campylobacter* sp., *Arcobacter* sp., *Helicobacter* sp., e *Spirillum* sp., o que faz com que a real importância deste microorganismo seja negligenciada (VENOSA, 2014).

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), incluindo a PCR em Tempo Real (qPCR), estabeleceu uma nova era no processamento de amostras clínicas. Segundo (VARKONYI et al 2007) a técnica de qPCR é rápida, sensível, específica e conveniente para rastrear pequenas quantidades de DNA ou cDNA de forma rápida e barata. As qPCR exigem muito menos tecido e tempo, em comparação com os métodos padrões baseados em gel. A amplificação do DNA por

PCR ou biosensores trouxeram mais rapidez e precisão, com resultados sendo obtidos em torno de 24 horas (BAILEY e COX,1996).

A PCR baseia-se no processo de replicação de DNA que ocorre *in vivo*. Durante o PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas fitas simples, permitindo então a ligação de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), também em fitas simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleotídeos, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das seqüências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a atuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar (PREZZI e DUARTE, 2010).

Na reação de qPCR, os *amplicons* produzidos são marcados com moléculas fluorescentes ou corantes que se ligam ao DNA e são quantificados a cada ciclo. A qPCR foi inicialmente desenvolvida com o objetivo de estimar o número de cópias de um gene de interesse (DOLKEN, 1998; HEID, 1996; HIGUCHI, 1993) PAHL, 1999, HIGGINS, 1998). Como vantagens, a técnica tem se destacado por não requerer a detecção de banda de DNA em gel de agarose, uma vez que a detecção do *amplicon* é feita durante a reação, minimizando a possibilidade de contaminação da amostra.

A qPCR também apresenta flexibilidade de reação para qPCR multiplex com o uso de diferentes fluoróforos associados aos iniciadores e/ou sondas, além de se mostrar extremamente sensível e capaz de fornecer os resultados com grande rapidez. Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em comprimentos de onda específicos, portanto com a utilização de fluoróforos diferentes é possível acessar alvo também distintos. Os fluoróforos são projetados numa estrutura em grampo (estrutura secundária) próximo à extremidade 3' do *primer forward*. Quando o *primer* é incorporado ao produto de PCR em fita dupla, a emissão de fluorescência do fluoróforo é desbloqueada (*dequenching*), resultando num aumento significativo de sinal. Esse aumento de sinal, é baseado na propriedade de emissão de fluorescência do fluoróforo conjugado, é a base para a detecção da amplificação. Dessa forma, a fluorescência detectada é correlacionada com a quantidade de produto formado em tempo real durante a amplificação e a PCR passa a ser quantitativa (NAZARENKO et al., 2002).

Por meio da qPCR é possível obter quantificação relativa ou absoluta para as amostras em análise. O parâmetro mais importante para a quantificação propriamente dita é o valor do limiar de fluorescência do método. Esse limiar refere-se ao ciclo no qual a reação atinge o início da fase exponencial, ou seja, quando há aumento de sinal associado à formação exponencial do produto de PCR, e é denominado *Cycle Threshold* (Ct) (GIBSON, HEID e WILLIAMS, 1996). O valor de Ct sempre é calculado durante a fase exponencial da reação de amplificação e é fundamental para a construção da curva de calibração, na qual o eixo x corresponde ao log da concentração de DNA/RNA e o eixo y aos valores de Ct.

Devido a falta de dados sobre frequência ou prevalência de *Brachyspiras* sp, na avicultura nacional, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência de *B. pilosicoli*, *B. intermedia* e *B. hyodysenteriae* em aves de postura e matrizes de corte em granjas da região Oeste do estado do Parana. E avaliar e classificar a ocorrência de lesões microscópicas e a contagem de células caliciformes nas aves positivas para esses agentes.

A dissertação apresenta-se em capítulo único no formato de artigo a ser submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

CAPÍTULO 1

Artigo intitulado: Primeiro relato da frequência de *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* em aves de postura e matrizes de corte na região Oeste do Paraná através do isolamento bacteriano e tipificação na qPCR.

PRIMEIRO RELATO DA FREQUÊNCIA DE *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* E *Brachyspira intermedia* EM AVES DE POSTURA E MATRIZES DE CORTE NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ ATRAVÉS DO ISOLAMENTO BACTERIANO E TIPIFICAÇÃO NA qPCR

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

ABSTRACT.- Goulart T., Gruchouskei L., Gonçalves J., Cavasin J., Matos M.R., Faccin M & Viott A.M. 2018. [Frequency of *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira intermedia* in hens and laying hens in the state of Paraná, Brasil through bacterial isolation and qPCR] Determinação da frequência de *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* em aves de postura e matrizes comerciais no estado do Paraná através do isolamento bacteriano e qPCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Av. Pioneiro, 2153, Palotina, PR 85450-000, Brasil. E-mail: viott@ufpr.br

RESUMO.- Bactérias do gênero *Brachyspira* podem ocasionar enfermidades entéricas em aves acarretando a queda de produtividade. A ocorrência desta enfermidade em galinhas já foi verificada em países como a Austrália, Itália e Estados Unidos porém no Brasil, até o momento, trabalhos epidemiológicos sobre a frequência de *Brachyspira* sp. só foram realizados em granjas de suínos. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de bactérias do gênero *Brachyspira* sp. através do isolamento e confirmação das espécies *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira intermedia* utilizando a técnica de qPCR. Foram coletadas amostras de 110 aves com idade entre 35 e 82 semanas, sendo 40 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. As amostras positivas foram submetidas a qPCR para identificação das três espécies propostas. Fragmentos de ceco das aves foram coletados e fixados em formol para avaliação histológica e contagem de células caliciformes. Das 110 amostras foram obtidos 48 isolamentos característicos de *Brachyspira* (43,6%) e destes na qPCR 13 identificadas como *B. hyodysenteriae* (11,8%) e 5 (4,5%) como *Brachyspira intermedia*, 2 amostras foram positivas para ambos os agentes (1,8%) e 28 não foram caracterizadas através da qPCR (25,5%). Não foram observadas alterações histopatológicas no ceco e diferença estatística significativa na contagem de células caliciformes das aves positivas. Conclui-se que a *Brachyspira* sp. é frequente em granjas de poedeiras e matrizes de corte no Brasil, com especial relevância para a *Brachyspira intermedia* que possui potência patogênica para estas aves.

ABSTRACT: Bacteria of the genus *Brachyspira* can cause enteric diseases in poultry causing a decrease in productivity. The occurrence of this disease in chickens has already been verified in countries such as Australia, Italy, and the United States, but in Brazil, until now, epidemiological studies about *Brachyspira* sp. frequency were only carried out on pig farms. The objective of this study was to evaluate the presence of bacteria of the genus *Brachyspira* sp. through isolation and confirmation of the species *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira intermedia* using the qPCR technique. Samples were collected from 110 hens aged between 35 and 82 weeks, of which 40 were from commercial egg farms and 70 were from laying hens matrices. For the first evaluation, bacterial isolation was performed from the feces. Positive samples were submitted to qPCR to identify the three species proposed. Cecum fragments of the birds were collected and fixed in formaldehyde for histological evaluation and counting of goblet cells. Of the 110 samples, 48 characteristic isolates of *Brachyspira* (43.6%) were obtained and of these in qPCR 13 identified as *B. hyodysenteriae* (11.8%) and 5 as *Brachyspira intermedia* (4.5%), 2 samples were positive for both agents (1.8%) and 28 were not characterized by qPCR (25.5%). None histopathological lesions were observed in the chicken cecum and no significant statistical difference was noticed in the count of goblet cells of the positive hens. It can be evidenced the occurrence of *Brachyspira* sp. in laying farms and hens in Brazil, with special relevance to *Brachyspira intermedia* that has pathogenic potency for these animals.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Brachyspira* podem causar doença entérica principalmente em aves e suínos, além disto, possuem caráter zoonótico. Quatro espécies de *Brachyspira* são consideradas patogênicas para aves sendo elas a *Brachyspira intermedia*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira alvinipulli* e a *Brachyspira hyodysenteriae* e uma ou mais espécies podem estar envolvidas concomitantemente no desenvolvimento de doenças (Song & Hampson 2009, Mapple et al. 2014).

Em galinhas a *Brachyspira* sp. está associada a uma condição clínica conhecida como espiroquetose intestinal aviária (EIA) comumente observada em aves mais velhas (Phillips e Hampson,

2005, Medhanie et al. 2013, Mappley et al. 2014). As principais causadoras são as *B. intermedia* e *B. pilosicoli* (Stephens e Hampson 2002, Bano et al. 2008), e em menor frequência a *B. alvinipulli* (Phillips et al. 2006, Feberwee et al. 2008). Os sinais clínicos incluem diarreia crônica, perda de peso, baixa produção de ovos e ovos sujos de fezes (Medhanie et al. 2013). Burch et al (2006), compararam o desempenho de lotes com EIA e o padrão para a linhagem de poedeiras e constataram uma queda de 6% na produção de ovos e um aumento de 8,84% na taxa de mortalidade em um lote não submetido a nenhum tratamento.

A *B. hyodysenteriae* está associada à ocorrência de tífites severas em emas (*Rhea americana*) naturalmente infectadas, sendo a mesma espiroqueta causadora da disenteria suína (Jensen; Stanton; Swayne 1996) a doença que vem causando grandes perdas na suinocultura brasileira (Garcia 2015). As galinhas são portadoras naturais desta espécie, porém nessas aves a *B. hyodysenteriae* é apatogênica (Feberwee et al. 2008). Apesar disso essa espécie de *Brachyspira* possui importância em regiões produtoras de aves e suínos, pois como foi observado por Backhans et al (2011) a *Brachyspira* sp. tem a capacidade de transitar entre aves, suínos e roedores. E todos esses animais podem ser colonizados a partir de uma fonte ambiental comum, desta forma ratos e camundongos podem atuar na transmissão da *B. hyodysenteriae* e da *B. pilosicoli* entre lotes ou até mesmo granjas de espécies distintas.

Ocorrência de *Brachyspira* sp. já foi constatado em países produtores de aves como na Itália aonde 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 2002) e recentemente na Argentina foi encontrado positividade 44% nas granjas de poedeiras avaliadas (Illanes et al. 2016).

Devido à carência de dados da ocorrência no Brasil da EIA, este estudo avaliou pela primeira vez a prevalência de *Brachyspira* sp. em aves de postura comercial e matrizes de corte na região oeste do estado do Paraná, através da cultura anaeróbica seletiva, e os isolados foram identificados usando a técnica de qPCR para as espécies *B. pilosicoli*, *B. intermedia* e *B. hyodysenteriae*.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

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. Assim foram coletadas 110 amostras sendo 40 oriundas de duas granjas de galinhas de postura comercial e 70 de matrizes de corte de dois matrizeiros (um com cinco e outro com dois núcleos) com e sem histórico de diarreia ou queda de postura. A idade das aves variou entre 35 a 82 semanas. Foram colhidas fezes diretamente dos cecos das aves escolhidas aleatoriamente ao longo do galpão. Os cecos coletados foram imediatamente acondicionados em caixa isotérmica com gelo e enviadas ao laboratório para o isolamento bacteriano. As aves foram necropsiadas e fragmentos de ceco foram coletados e imediatamente fixados em formol tamponado a 10% e posteriormente processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina preconizada por Tolosa et al. (2003) para coloração de PAS e Hematoxilina & Eosina.

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 tripton de soja DB 211043), suplementado com 5% de sangue ovino desfibrinado, Rinfampicina 100% (Sigma R-3501), Espectinomicina 100% (Sigma S-9007), Vancomicina 100% (Sigma V-2002) e Colistina 25.000 und (Sigma C-1511), e incubadas em jarras de anaerobiose. 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 anaeróbicas utilizando meio de anaerobiose (Anaerobac – Probac do Brasil) a 42°C por sete dias. Posteriormente as colônias foram acondicionadas em criotubos contendo Soro Fetal Bovino e estocados a -80°C para posterior fenotipagem por qPCR.

O protocolo para isolamento bacteriano seguiu o preconizado por Neves (2012). As amostras de fezes foram semeadas através de esfregaço em placas com meio seletivo para *Brachyspira* sp. (ágar para anaerobiose¹, 5% sangue ovino, 6,25 mg/μl rinfampicina², 800 mg/μl de espectinomicina³, 25 mg/μl de

¹ Fastidious Anaerobe Agar, Acumedia, cat n° 7531, Neogen Co, Lansing, MI, USA.

² Rifampicin, Sigma-Aldrich, cat n° R3501, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

³ Spectinomycin, Sigma-Aldrich, cat n° S9007, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

vancomicina⁴, 25 mg/μl de colistina⁵) e incubadas em jarras de anaerobiose com uma atmosfera anaeróbia gerada com meios de anaerobiose (Anaerobac – Probac do Brasil⁶) a 42°C por três dias ou até evidênciação da hemólise. O ambiente anaeróbio foi confirmado por uma fita indicadora de anaerobiose⁷. As colônias milimétricas de cor branca e hemolíticas, que são compatíveis com *Brachyspira* sp., foram cuidadosamente repicadas, com auxílio de alça calibrada, em placas de ágar de isolamento de anaeróbios¹ contendo 5% de sangue ovino e incubadas em anaerobiose, por três dias, a 37°C. Após a obtenção das *Brachyspira* sp. (Figura 1) estas foram coletadas com alça calibrada e resuspendidas em 1,5mL de soro fetal bovino. Essa suspensão foi congelada a -20°C ate a realização do qPCR.

qPCR (Reação em cadeia da Polimerase em tempo real)

O DNA foi extraído de todas as amostras que apresentaram crescimento positivo para *Brachyspira* sp. utilizando-se o QIAamp cador Pathogen Mini Kit⁸ de acordo com instruções do fabricante.

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 sequência descrita por Phillips et al., (2005). O protocolo seguiu o preconizado por Song & Hampson (2009).

Histopatologia

Seções de ceco coradas por HE foram avaliadas para observação de possíveis lesões histológicas compatíveis com infecção por *Brachyspira* como: alterações inflamatórias, erosão epitelial, formação de falsa borda em escova, hiperplasia de cripta e hiperplasia folículos linfoides.

PAS e contagem de células calciformes

Cortes de 5 μm de espessura de fragmentos de ceco foram submetidos a coloração de ácido periódico-Schiff (PAS) para evidênciação das células calciformes.

Para a contagem das células calciformes foram analisados os cortes de ceco sob microscópio e contado o número de células de dez campos aleatórios, as células calciformes marcadas foram contabilizadas e destes valores foi obtida uma média.

Análise estatística

As médias de células calciformes das aves positivas no isolamento, positivas no isolamento com confirmação da espécie através de qPCR para *B. hyodysenteriae* e positivas no isolamento com confirmação da espécie através de qPCR para *B. intermedia*, foi cada um destes três grupos comparados isoladamente com o grupo negativo no isolamento bacteriano. O teste realizado foi o de qui-quadrado, considerando $p < 0,05$ estatisticamente significativo, utilizando o software SAS 9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisadas 110 amostras, das quais 48 foram positivas no isolamento para *Brachyspira* sp., sendo positivas 47,5% das amostras de poedeiras comerciais e 41% para matrizes, totalizando 43,6% das amostras, valor muito próximo ao encontrado por Illanes et al. (2016) na Argentina em galinhas poedeiras, no entanto inferior aos 68% encontrado na Austrália por Stephens e Hampson (2002) ou os 72,4% na Itália por Bano *et al.* (2008).

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 ou não ser possível devido ao fraco crescimento das colônias puras ou por uma microbiota acompanhante (BOYE et al., 1998; RÅSBÄCK et al., 2006; ILLANES et al., 2016). Assim a cultura destas bactérias não é comumente realizada na rotina de diagnóstico, acarretando a falta de informações sobre a ocorrência deste agente.

Entre as duas espécies patogênicas que se realizou a identificação através da técnica de qPCR, nenhuma amostra foi caracterizada como *B. pilosicoli*, espécie de especial importância por ser zoonótica e

⁴ Vancomycin, Sigma-Aldrich, cat n° V2002, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁵ Colistin, Sigma-Aldrich, cat n° C1511, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

⁶ PROBAC do Brasil, Anaerobac, Higienópolis, SP, Brasil.

⁷ Oxoid Anaerobic Indicator, Thermo Fisher, cat n° BR0055, Waltham, MA, USA.

⁸ QIAamp cador Pathogen Mini Kit, cat n° 51504, Qiagen, New York, USA.

que já foi detectada em aves na Argentina (Illanes *et al.* 2016), cinco amostras foram identificadas como *B. intermedia* sendo que todas elas foram provenientes da mesma granja de poedeiras comerciais, o que correspondeu a 10,5% dos isolamentos de *Brachyspira*, porcentagem está também inferior ao encontrado na Itália por Bano *et al.* (2008), demonstrando uma menor incidência dos agentes da EIA no Brasil. Resultados sumarizados no quadro 1.

Entre as granjas analisadas apenas uma, de postura comercial, não aprestou nenhuma amostra positiva a *Brachyspira* sp. através da cultura, as aves desta granja possuíam idade de 82 semanas. A colonização por *Brachyspira* sp. é significativamente maior em aves mais velhas, sugerindo que após uma infecção inicial a população bacteriana aumenta com o passar do tempo (Phillips e Hampson. 2005, Medhanie *et al.* 2013). Mesmo a granja livre sendo a com as aves mais velhas analisadas, isto pode estar associada às boas medidas de controle sanitário adotados na granja, o que evitou a entrada e disseminação do agente.

Porém em outra granja de postura comercial com aves de 35 e 40 semanas apenas uma de 20 aves não foi positiva com a idade de 35 semanas. No estudo realizado por Medhanie *et al.* (2013) que avaliaram fatores de risco para colonização de *Brachyspira* sp. em galinhas, a presença de aves de idades diferentes na mesma granja indica uma maior probabilidade de se encontrar aves positivas para *B. sp.* fator este, presente nesta granja.

Vinte e oito amostras (58,4%) positivas no isolamento não se caracterizarão entre as três espécies pesquisadas, uma possível causa se deve ao grande número de espécies apatogênicas de *Brachyspira* que já foram identificadas no intestino de aves, entre elas a *B. innocens*, *B. murdochii* e a *B. pulli* (Feberwee *et al.*, 2008). Entre 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.

Neste estudo assim como o encontrado por Phillips *et al.* (2005) e Illanes *et al.* (2016), houve a ocorrência de aves positivas criadas no sistema de gaiolas. Devido ao fato da via de transmissão da *Brachyspira* sp. ser pelo contato fecal-oral, neste tipo de sistema as aves possuem menor exposição a excretas o que poderia reduzir a contaminação, porém as aves também podem ser expostas a fezes através de moscas e roedores (Medhanie *et al.* 2013). Entre as 48 amostras submetidas a qPCR, duas (4,1%); ambas oriundas de uma granja de postura comercial; apresentaram infecções mistas para *B. hyodysenteriae* e *B. intermedia*. Nessa propriedade o aviário, do tipo californiano, não possuía barreiras para a entrada de animais domésticos e silvestres, e o local contava com uma criação de suínos.

A infecção por *B. hyodysenteriae* foi verificada em 15,7% das amostras positivas de poedeiras comerciais e em 35% das matrizes, a infecção natural em galinhas por esta espécie já havia sido verificada por Feberwee *et al.*, (2008). Apesar desta espécie não ser associada a ocorrência de EIA, a colonização intestinal por *B. hyodysenteriae* em suínos pode causar diarreia muco-hemorrágica grave de alto impacto econômico, denominada disenteria suína (Boye *et al.* 1998), doença a qual já foi evidenciada na região deste estudo (Garcia 2015). Dessa forma a positividade de amostras para a *B. hyodysenteriae*, 13% do total das aves analisadas, deve servir de alerta devido à proximidade de granjas de suínos e aves nas regiões aonde a agroindústria é prevalente, pois como foi verificado por Backhans *et al.* (2011) suínos, aves e roedores podem ser portadores das mesmas espécies de *Brachyspira*, e servir como fonte de disseminação.

Não foram visualizadas alterações histológicas compatíveis com *Brachyspira* sp., assim como foi verificado por Stephens & Hampson (2002) que avaliaram galinhas infectadas experimentalmente e a falta de lesões foi associada por eles ao fato ter sido realizada várias semanas após a inoculação havendo tempo para a resolução de possíveis lesões. Mesmo após a recuperação do quadro clínico e restabelecimento das lesões as aves podem eliminar *Brachyspira* por longos períodos, a *B. intermedia* espécie patogênica que foi isolado no presente estudo, já foi detectada nas excretas de galinhas nove meses após o desafio. No estudo de Feberwee *et al.* (2008) avaliando animais naturalmente infectados, foram encontradas alterações inflamatórias leves, porém os animais analisados por eles eram oriundos de granjas as quais já apresentavam sinais compatíveis com EIA, além disto os animais avaliados possuíam enterite preexistentes por outros agentes o que pode ser um fator predisponente para a patogenicidade da *Brachyspira* sp.. Estas condições não forma evidenciadas nas aves deste trabalho o que pode ter motivado a falta de lesões histológicas.

O aumento do número de células caliciformes é uma alteração comumente observada em animais infectados por *Brachyspira* sp (Feberwee *et al.* 2008, Shivaprasad & Duhamel, 2005, Jensen *et al.* 1996), porém tal alteração não foi observada. As aves negativas no isolamento foram comparadas com três grupos: aves positivas no isolamento, positivas no isolamento com confirmação da espécie através de qPCR para *B. hyodysenteriae* ou para *B. intermedia*, em todas as comparações o número de células

caliciformes não apresentaram alterações significativas estatisticamente. Tal fato pode ser explicado pela falta de lesão histológica no intestino.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as bactérias do gênero *Brachyspira* são frequentes em granjas de matrizes e de poedeiras comerciais e na região Oeste do Paraná, Brasil. E que cepas de potencial patogênico para aves como a *B. intermedia* e para suínos como a *B. hyodysenteriae* podem ser isoladas das excretas de aves saudáveis, servindo essas como fonte de contaminação e disseminação desses agentes.

REFERÊNCIAS

- 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., Meriardi G., Bonilauri P., Dall'anese G., Capello K., Comin D., Cattoli G., Sanguinetti V., Hampson D. J. & Agnoletti, F. 2008. Prevalence, disease associations and 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.
- Burch D. G. S., Hardin C., Alvarez R. & &alks M. 2006. Treatment of a field case of avian intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* with tiamulin. *Avian Pathol.* 35(3):211-216,
- Dwars R.M., Smit H.F. & Davelaar, F.G. 1990. Observations on avian intestinal spirochaetosis. *Vet. Q.* 12:51-55.
- 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.
- Garcia, E. C. Frequência de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos de terminação na mesorregião oeste do estado do Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado. Disponível em <<http://www.ppgca.ufpr.br/wp-content/uploads/2015/09/edismair-carvalho-garcia.pdf>> Acesso em 20 abr. 2017.
- 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 especies de *Brachyspira* en granjas avícolas argentinas. *Ver. Argent. Microbiol.* 48(1):67-70.
- Jensen, N. S., Stanton, T. B. & Swayne, D. E. 1996. Identification of the swine pathogen *Serpulina hyodysenteriae* in rheas (*Rhea americana*). *Vet. Microbiol.* 52:259-269.
- 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 complement 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.

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/BUOS7XF8W/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.

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.

TABELA 1 - NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS EM CULTURA PARA *BRACHYSPIRA* SP. DE AVES DE POSTURA E MATRIZES COMERCIAIS E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES *B. HYODYSENTERIAE*, *B. PILOSICOLI* E *B. INTERMEDIA* ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE QPCR:

	Positivas por isolamento	qPCR ^{B.} <i>hyodysenteriae</i>	qPCR ^{B.} <i>pilosicoli</i>	qPCR ^{B.} <i>intermedia</i>	qPCR ^{B.} <i>intermedia+B. hyodysenteriae</i>	Não caracterizadas através do qPCR [*]
Poedeiras comerciais	19/40 (47,5%)	3/19 (15,7%)	0/19 (0%)	5/19 (26,3%)	2/19 (10,5%)	9/19 (47,5%)
Matrizes	29/70 (41%)	10/29 (35%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	19/29 (65%)
Poedeiras comerciais +Matrizes		13/48 (27%)	0/48 (0%)	5/48 (10,5%)	2/48 (4,1%)	28/48 (58,4%)
Total	48/110 43,6%	13/110 (11,8%)	0/110 (0%)	5/110 (4,5%)	2/110 (1,8%)	28/110 (25,5%)

* qPCR reação em cadeia da Polimerase em tempo real
Fonte: O autor (2018)

FIGURA 01 – CRESCIMENTO POSITIVO PARA *BRACHYSPIRA SP.* EM MEIO SELETIVO. NOTAR A FORTE HEMÓLISE PRODUZIDA EM AGAR SANGUE POR UMA CEPA DE *B. HYODYSENTERIAE* (ESQUERDA) EM COMPARAÇÃO COM A FRACA HEMÓLISE OBTIDA EM UMA CEPA DE *BRACHYSPIRA SP* NÃO TIPIFICADA NA QPCR (DIREITA).



Fonte: O autor (2016).

REFERÊNCIAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual ABPA 2017**. Disponível em: < [http:// http://abpa-r.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf](http://http://abpa-r.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf)>. Acesso em: 19 jan. 2018.
- ANDREATTI FILHO, R.L. E CROCCI, A.J. (2002). Efeito protetor da microbiota cecal congelada e liofilizada sobre a infecção experimental de frangos de corte por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 54, 1 – 8.
- ÁLVAREZ MIRA D. Valoración de la presencia de *Brachyspira* intermedia y *Brachyspira pilosicoli* en ponedoras comerciales de granjas avícolas colombianas. **Tesis de Magister en Ciencias y Salud Animal**. 2009. Universidad Nacional de Colombia.
- BAILEY, J.S., COX, N.A. Detecting specific *Salmonella* strains. **World Poultry, Special for Salmonella**, Netherlands, May, p.18-19, 1996.
- 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.; BONILAUDI, P.; DALL'ANESE, G.; CAPELLO, K.; COMIN, D.; CATTOLI, G.; SANGUINETTI, V.; HAMPSON, D. J.; AGNOLETTI, F. Prevalence, disease associations and 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.
- CARVALHO, A.C.F.B., FLORIOTO, J.F. E SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. (2001). *Campylobacter* e *Salmonella* nas fezes e em diferentes tipos de cama de frango. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, 17, 201 – 206.
- DÖLKEN, L.; SCHÜLER, F.; DÖLKEN, G. Quantitative detection of t(14;18)-positive cell by realtime quantitative PCR using fluorogenic probes. **Biotechniques**, Natick, v. 6, p. 1058-1064, 1998.
- FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, Natick, v. 26, p. 112-125, 1999.
- 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.
- GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RTPCR. **Genome Research**, Woodbury, v. 6, p. 995-1001, 1996.

- HEID, C. A. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, Woodbury, v. 6, p. 986-994, 1996.
- HIGGINS, J. A. 5' nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 2284-2288, 1998.
- HIGUCHI, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.
- 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 especies de *Brachyspira* en granjas avícolas argentinas. **Ver. Argent. Microbiol.**, 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.
- 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.
- NAZARENKO, I. et al. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, e37, 2002. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/30/9/e37>>. Acesso em: 30 Jan. 2018.
- OYARZÁBAL, O.A. Técnicas moleculares para o diagnóstico de patógenos aviários. **Avicultura Professional**, v.14, n.16, p.19-21, 1996.
- PAHL, A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1958-1963, 1999.
- 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.
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, e36, 2002. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/30/9/e36>>. Acesso em: 31 Jan. 2018.

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

NEVES, S. M. N. Avaliação das técnicas de isolamento, reação em cadeia de polimerase e hibridização fluorescente in situ para diagnóstico de *Brachyspira* sp. em suínos. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Escola de Veterinária. 2012.

SILVA, E. D. (2000). Probióticos e prebióticos na alimentação das aves. **Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Campinas: FACTA, 241 - 251.

STALS,A., WERBROUCK,H., BAERT,L., BOTTELDOORN,N., HERMAN,L., UYTENDAELE,M. AND VAN COILLIE,E. (2009) Laboratory efforts to eliminate contamination problems in the real-time RT-PCR detection of noroviruses. **J. Microbiol. Methods** 2009; 77: 72-76.

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.

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.

VARKONYI, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.F.; HELLENS, R.P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. **Biomed Central Ltd**. 2007.

VENOSA, J.. Aspectos Relevantes de la Infección em Gallinas de Postura y Reproductora. Novartis Salud Animal SA. 2014. **SAGARPA – Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo rural, Pesca y Alimentacion**. Disponível em: < http://sistemaproductoaves.org.mx/aves/articulos/Aspectos_Relevantes_Infeccion_Gallinas_Postura_Reproductora.html > . Acesso em: 02 fev. 2018.

APÊNDICE A – PROTOCOLO PARA CONFEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA ISOLAMENTO DE *BRACHYSPIRA* spp.

Passo 1:

- Colher 50 ml de sangue equino desfibrinado;
- Material: 1 pipeta de 10 ml (autoclavada), 1 pipeta de 2 ml (autoclavada), 1 espátula (ATB) (autoclavada), 1 baqueta, 1 proveta de 500 ml, 1 Erlenmeyer de 1 litro (autoclavado), 1 proveta de 50 ml (autoclavada).

Passo 2:

- Agar base levedura⁹ 11,11 gr, TSA¹⁰ 35,55 gr, 1 litro de água destilada, aquecer no micro-ondas mexer até total dissolução e autoclavar a 120 °C por 15 minutos.

Passo 3:

- Pesar Antibióticos (ATB): Rifampicina¹¹ 0,0125 gr diluir em 5 ml de álcool absoluto 99,5%, Spectinomomicina¹² 0,2 gr, Vancomicina¹³ 0,05 gr, Colistina¹⁴ 21,79 mg (solução, misturar 10 ml de água destilada, filtrar com filtro 0,22 µm e retirar 1 ml para o meio de cultivo), 50 ml de água destilada.

Passo 4:

- Esfriar o meio base e providenciar placas de Petry aproximadamente 50.

Passo 5:

- Misturar *mix* de ATB, 50 ml de água destilada, 1 ml da solução de colistina, 5 ml de álcool absoluto com a Rifampicina.

Passo 6:

- Incorporar ao agar base esfriado a uma temperatura de 60 °C o mix de ATB, 50 ml de sangue equino e homogeneizar com cuidado para não formar bolhas de ar.

Passo 7:

- Distribuir a solução total nas placas de Petry, dentro de uma câmara de fluxo laminar para evitar contaminações.

⁹ Agar extracto de levedura, Merck, cat n° 103750, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha

¹⁰ Agar Triptona de soja (TSA), cat n° 105458, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha.

¹¹ Rifampicin, Sigma-Aldrich, cat n° R3501, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

¹² Spectinomycin, Sigma-Aldrich, , cat n° S9007, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

¹³ Vancomycin, Sigma-Aldrich, , cat n° V2002, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

¹⁴ Colistin, Sigma-Aldrich, , cat n° C1511, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.

Passo 8:

- Fazer teste de esterilidade com uma placa pronta e o restante pode ser conservado em geladeira á temperatura de 6 á 12 °C até a utilização.

APÊNDICE B – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA

1. Pipetar 20 µl de proteinase K em um tubo de microcentrifuga de 2 ml .

2. Adicionar 200 µl de amostra de fluido à proteinase K.

Nota: Se processar volumes de amostra menores, ajuste o volume para 200 µl com PBS ou NaCl a 0,9%.

3. Adicionar 100 µl de tampão VXL. Feche a tampa e misture por pulso vortex. Para garantir uma lise suficiente, misture bem a amostra e o Buffer VXL para produzir uma solução homogênea. Se estiver usando o fluido da amostra contendo tampão ATL, por exemplo, após a digestão enzimática do tecido, podem formar-se precipitados. Os precipitados podem ser dissolvidos por incubação breve a 56 ° C. No entanto, eles não têm influência nas etapas subsequentes do protocolo.

Nota: Se processar amostras sem células, assegure-se de que 1 µg de RNA portador seja adicionado por 100 µl de Buffer VXL antes da utilização. Não adicione RNA portador se estiver processando amostras ricas em células, como sangue total e tecido.

4. Incubar a 20-25 ° C durante 15 min.

5. Centrifugue brevemente o tubo de 2 ml para remover as gotas do interior da tampa.

6. Adicione 350 µl de tampão ACB à amostra, feche a tampa e misture bem por meio de pulso vortex.

Certifique-se de que o isopropanol foi adicionado ao concentrado Buffer ACB antes da utilização.

7. Centrifugue brevemente o tubo de 2 ml para remover gotas do interior da tampa.

8. Transfira o lisado do passo 7 para a coluna QIAamp Mini colocada em um tubo de coleta de 2 ml sem molhar a jante. Feche a tampa e centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Coloque a coluna QIAamp Mini em um tubo de coleta limpo de 2 ml e descarte o tubo de coleta contendo o filtrado.

Se o lisado não tiver passado completamente pela coluna após centrifugação, centrifugue novamente a uma velocidade maior (até 20.000 x g; 14.000 rpm) até a coluna QIAamp Mini estar vazia.

9. Abra a coluna QIAamp Mini e adicione 600 µl de tampão AW1 sem molhar a jante. Feche a tampa e centrifugue a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 min. Coloque

a coluna QIAamp Mini em um tubo de coleta limpo de 2 ml e descarte o tubo que contém o filtrado.

10. Abra a coluna QIAamp Mini e adicione 600 µl de tampão AW2. Feche a tampa e centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Coloque a coluna QIAamp Mini em um tubo de coleta limpo de 2 ml e descarte o tubo que contém o filtrado.

11. Centrifugar a velocidade máxima (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 2 min para secar a membrana. (*QIAamp cadór Pathogen Mini Handbook 12/2014*)

12. Coloque a coluna QIAamp Mini em um tubo de microcentrifuga limpo de 1,5 ml (não fornecido) e descarte o tubo de recolha contendo o filtrado. Abra a coluna QIAamp Mini e adicione 50-150 µl de Buffer AVE ao centro da membrana. Feche a tampa e incube à temperatura ambiente (15-25 ° C) durante 1 min. Centrifuga a toda velocidade (20.000 x g; 14.000 rpm) por 1 min.

Importante: Certifique-se de que o tampão de diluição esteja equilibrado para a temperatura ambiente. Se a diluição for realizada com um pequeno volume (<75 µl), o tampão de diluição deve ser dispensado no centro da membrana para a diluição completa de RNA e DNA unidos. O volume de diluição é flexível e pode ser adaptado de acordo com os requisitos da aplicação a jusante.

Para reduzir o ruído, a velocidade de centrifugação para diluição pode ser ajustada para 6.000 x g. Se isso for feito, o volume recuperado será aproximadamente 5 µl menos do que o volume de tampão de diluição aplicado na coluna.

APÊNDICE C – 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 communications) 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 alfabética 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 autoexplicativas, 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, recomeçando, 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.