

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONICA REGINA DE MATOS



IDENTIFICAÇÃO DE *Brachyspira* SPP. EM CECOS DE FRANGOS DE CORTE POR MEIO DE HISTOLOGIA E MARCAÇÃO *IN SITU*

PALOTINA

2019

MONICA REGINA DE MATOS

IDENTIFICAÇÃO DE *Brachyspira* SPP. EM CECOS DE FRANGOS DE CORTE POR
MEIO DE HISTOLOGIA E MARCAÇÃO *IN SITU*

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

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M425 Matos, Monica Regina de
Identificação de *Brashtyspira SPP.* em cecos de frangos de corte por meio de histologia e marcação in situ / Monica Regina de Matos. – Palotina, 2019.
37f.

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

1. Espiroquese intestinal. 2. Imuno - histoquímica. 3. Hibridização fluorescente in situ. I. Viott, Aline de Marco. II. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

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 **MONICA REGINA DE MATOS** intitulada: **Identificação de *Brachyspira* spp. em cecos de frango de corte por meio de histologia e marcação *in situ***, após terem inquirido a aluna 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, 25 de Fevereiro de 2019.

ALINE DE MARCO VIOTT

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

EDNA TEREZA DE LIMA

Avaliador Interno (UFPR)

ROSELENE ECCO

Avaliador Externo (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder saúde e discernimento nesta jornada, guiando meus passos e permitindo que nada de mal ocorresse, mesmo percorrendo mais de 100 km por dia no trajeto Toledo- Palotina durante o período do mestrado.

À minha família que sempre me apoiou e me estimulou a estudar e buscar a me aprimorar, em especial ao meu marido Felipe que não mediu esforços, aguentou a distância e até me ajudou no projeto. Aos meus pais Célio e Tereza, a minha irmã Simone que são minha base e fortaleza e aos meus sogros Nilson e Sandra pela paciência e por todo auxílio neste período.

Agradeço a minha orientadora, profa. Dra. Aline de Marco Viott pelos longos anos de amizade desde a graduação e por ser uma inspiração como profissional e como pessoa. Ao prof. Dr. Nelson Massaru Fukumoto pela ajuda com os dados estatísticos. Agradeço ao MSc. Thiago Goulart por me auxiliar nas coletas e ao MSc. Leonardo Gruchouskei pelo auxílio laboratorial.

À todos os alunos de iniciação científica: Cheng, Ingridy, Elen, Aline, Alessandra, Amanda e Carla, que sempre fizeram presentes e me auxiliaram durante o processo.

Agradeço imensamente aos amigos do laboratório de patologia veterinária da UFPR-Setor Palotina em especial aos residentes e mestrandos precedentes e procedentes a mim (Filipe, Mayane, Gefferson, Marina, Ronaldo e Karim), nos quais tenho um carinho imenso, são muito mais que colegas de trabalho, são pessoas que sempre posso contar. Obrigada por todos os momentos maravilhosos concedidos nesses dois anos de residência e dois anos de mestrado que ficaram sempre guardados na minha memória e no meu coração.

À Marina e seus pais por me receberem tão bem em sua casa em um período do projeto.

À todos os professores nos quais recebi apoio durante o período o mestrado.

À Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação da UFPR, pelo oferecimento de bolsa que financiou e permitiu que eu mantivesse dedicação exclusiva por um ano, ao programa de mestrado. À UFPR que possibilitou grande parte da minha formação acadêmica até o momento.

RESUMO

O gênero *Brachyspira* corresponde ao grupo de bactérias anteriormente classificadas no gênero *Serpulina* e inclui várias espiroquetas intestinais comensais e patogênicas para suínos, aves, outras espécies animais e para o homem. Em aves, algumas espécies patogênicas desse gênero causam uma condição conhecida como espiroquetose intestinal aviária, causando sérias perdas econômicas atualmente ainda sub diagnosticadas. A *Brachyspira* possui característica de ser fastidiosa ao crescimento. Devido a isso o emprego de técnicas de identificação rápidas e eficazes se fazem necessárias. O objetivo deste estudo foi identificar *Brachyspira* spp. através das técnicas de histologia, imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em amostras de ceco de aves de corte comercial fixadas em formol. Foram coletadas amostras de 129 aves com idade entre 35 e 45 dias de vida oriundas de granjas de frango de corte comercial. Para avaliação, fragmentos de ceco fixadas em formol a 10% foram incluídas em parafina cortadas a cinco micrômetros de espessura em lâminas silanizadas para técnicas de FISH e IHQ e lâminas de vidro comum para processamento da histologia de rotina (H&E) e coloração de PAS (ácido periódico de Schiff). Na H&E as lesões histológicas foram analisadas e graduadas. Na PAS, foram contabilizadas as células calciformes e comparadas entre amostras positivas e negativas para FISH e IHQ. Para técnica de FISH foram utilizadas sondas marcadas de, *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* e *B. intermedia* e para IHQ anticorpo policlonal de coelho específico para o gênero *Brachyspira*. Das 129 amostras, 82 obtiveram marcação positiva para IHQ e 86 foram positivas para técnica de FISH. As amostras positivas para o gênero *Brachyspira* na técnica de FISH foram testadas para as espécies *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* e *B. intermedia*, nos quais 56 foram positivas para *B. pilosicoli*, 75 para *B. hyodysenteriae* e 80 para *B. intermedia*. Em 82 amostras houve infecção mista por mais de uma espécie testada. Houve aumento de células calciformes nas amostras positivas para FISH e IHQ. As técnicas utilizadas se apresentaram eficazes e Inter correspondentes na identificação das *Brachyspiras* avaliadas servindo assim como uma ferramenta rápida e eficiente para o diagnóstico.

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

ABSTRACT

Genus *Brachyspira* corresponds to a group of bacteria previously classified into genus *Serpulina* and includes several commensal and pathogenic intestinal spirochetes that affects swine, poultry, and other animal species including humans. In poultry, some pathogenic species of this genus cause a disease known as avian intestinal spirochetosis, leading to severe losses that are still sub-diagnosed. *Brachyspira* has the characteristic of fastidious growth. Because of that, application of fast and efficient identification techniques are necessary. The objective of this study was to identify *Brachyspira* spp. using histology, immunohistochemistry (IHC) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) techniques in formalin-fixed samples of cecum from broiler chickens. Samples were collected from 129 broiler chickens aged between 35 and 45 days old. To evaluate, 10% formalin fixed fragments of cecum were included in paraffin and sectioned in five microns on previously silanized slides for FISH and IHC techniques and common glass slides for routine histology processing and PAS staining (periodic acid of Schiff). In H&E the histological lesions were analyzed and graded (in 5 hpf). In PAS, the goblet cells were counted (in 10 hpf) and compared with positive and negative samples in FISH and IHC. Were used labeled probes to *B. spp*, *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae*, and *B. intermedia* for the FISH technique and specific *B. spp.* polyclonal rabbit antibody for IHC. Of the 129 samples, 82 were positive in IHC and 86 were positive in FISH. Samples with positive *Brachyspira* specimens in the FISH technique were tested for *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* and *B. intermedia*, in which 56 samples were *B. pilosicoli* positive, 75 were *B. hyodysenteriae* positive, and 80 were *B. intermedia* positive. In 82 samples there was mixed infection by more than one species tested. The used techniques were effective and inter-corresponding to identify these *Brachyspiras* species, thus serving as a fast and efficient tool for diagnosis.

Key words: Avian intestinal spirochetosis. immunohistochemistry. Fluorescent *in situ* hybridization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Lesões Macroscópicas, histológicas e marcação IHQ do ceco das aves necropsiadas. (A) Ceco com lesões multifocais proliferativas com discreta ulceração central em mucosa (setas). (B) Criptas intestinais distendidas por células inflamatórias (seta), restos celulares e delicadas espiroquetas H&E obj. 40x. (C) Hiperplasia de células caliciformes na mucosa intestinal (setas) PAS obj. 20x. (D) Imunomarcação positiva para *Brachyspira* spp com íntima associação a mucosa intestinal (setas) IHQ obj. 40x. (E) Imunomarcação positiva para *Brachyspira* spp formando “falso bordo em escova” (seta) IHQ obj. 20x. (F) Imunomarcação acentuada em criptas intestinais e topo de vilosidades IHQ obj. 4x. No detalhe em maior aumento evidencia-se *Brachyspiras* marcadas no lúmen da cripta intestinal IHQ obj. 40x.....24

FIGURA 2- Fotomicrografias com marcação positiva para *Brachyspira* em ceco de frangos de corte pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). (A) Marcação positiva para *Brachyspira hyodysenteriae* em mucosa (seta) e no tecido linfoide na submucosa (GALT) (seta) 4x. (B) Marcação positiva para *Brachyspira* spp em mucosa intestinal (setas) 20x. (C) Marcação positiva para *B. pilosicoli* na mucosa intestinal 10x. (D) Marcação positiva para *B. intermedia* associado à cripta intestinal 40x.....25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Graduação das lesões histológicas nas 86 amostras positivas detecção de <i>Brachyspira</i> spp pela técnica de FISH (média de 5 campos por cga).....	26
TABELA 2. Contagem de células calciformes (média de 10 campos por cga) nas amostras positivas/negativas para as técnicas de FISH e IHQ.....	26
TABELA 3. Comparação entre técnicas de FISH e IHQ para identificação do gênero de <i>Brachyspira</i> spp.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®- Marca registrada

µl-Microlitro

µm- Micrômetro

Cga- Campo de grande aumento

EIA- Espiroquetose intestinal aviária

FISH- Hibridização Fluorescente *in situ*

GALT- *Gut-associated lymphoid tissue*

IHQ- Imuno-histoquímica

PAS- Ácido periódico de Schiff

PBS- *Phosphate-Buffered Saline*

TBS- *Tris-Buffered Saline*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. CAPÍTULO 1.....	16
3. INTRODUÇÃO.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Amostras	19
4.2 Histologia e graduação de lesões.....	19
4.3 PAS e contagem de células calciformes.....	19
4.4 Imuno-histoquímica (IHQ).....	19
4.5 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	19
4.6 Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	20
6.DISSCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÕES.....	22
8. REFERÊNCIAS	22
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
9.1 Recomendações para trabalhos futuros.....	27
10. REFERÊNCIAS.....	28
APÊNDICE A – PROTOCOLO IHQ	33
APÊNDICE B – PROTOCOLO TBS.....	34
APÊNDICE C- PROTOCOLO PBS.....	35
APÊNDICE D- PROTOCOLO FISH.....	36
APÊNDICE E- PROTOCOLO TAMPÃO DE HIBRIDIZAÇÃO.....	37
APÊNDICE F- PROTOCOLO TAMPÃO DE LAVAGEM.....	38

1. INTRODUÇÃO

Na avicultura moderna, há um crescente interesse em melhorar os métodos de produção, bem-estar animal, reduzir os custos e garantir maior segurança e melhor qualidade para os consumidores. Neste contexto, é particularmente relevante reduzir as doenças na produção animal, especialmente àquelas que têm potencial zoonótico (ROY et al, 2015). Doenças gastrointestinais são comuns em animais de produção, e sua incidência aumentou em grande escala devido ao sistema intensivo e a práticas que facilitam a rápida disseminação de infecção entre os animais (HAMPSON et al, 2013).

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, alguns dos quais potencialmente patogênicos para o homem, aves ou ambos (CARVALHO, FLORIOTO & SCHOCKEN-ITURRINO, 2001).

O controle sanitário é peça fundamental na produção, assim se faz necessário o controle de agentes com potencial patogênico como a *Brachyspira* spp. que estão associadas a uma condição clínica conhecida como espiroquetose intestinal aviária (EIA) (MEDHANIEA et al., 2013).

A EIA afeta o ceco e colón de frangos de corte e matrizes resultando em diarreia que varia de leve à severa. Em consequência disso, há atraso e/ou redução da produção de ovos e aumento do teor de água fecal, além de perda no desempenho geral das aves. As espécies mais conhecidas atualmente de *Brachyspira* envolvidas em EIA são *B. pilosicoli* e *B. intermedia*, *B. alvinipulli* e *B. hyodysenteriae* (PHILLIPS, 2006; ILLANES, 2016).

As lesões histológicas não são bem descritas em aves, contudo nas outras espécies de mamíferos afetadas, as lesões geralmente estão limitadas ao cólon e ceco e incluem infiltrados de neutrófilos, plasmócitos e linfócitos na lâmina própria, hemorragia luminal e intersticial variável. Pode haver necrose superficial da mucosa e acúmulo de neutrófilos e muco no topo das vilosidades, bem como hiperplasia e abscessos de cripta. Grandes e delicadas espiroquetas com características típicas de *Brachyspira* spp. podem ser observadas no topo das vilosidades (BURROGH et al, 2012; ROJAS,2017)

A capacidade de transmissão de *Brachyspira* spp. entre espécie 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*, sendo estas espécies de interesse na avicultura, pois podem

ocasionar a EIA, tal informação deve ser levada em conta nos programas de controle de roedores em granjas (BACKHANS et al., 2011).

A prevalência de *Brachyspira* spp. em aves não é bem estabelecida. Em um estudo 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). No Brasil, ainda são escassas as informações sobre a presença das espiroquetas patogênicas na produção avícola comercial. Neste sentido, laboratórios particulares iniciaram uma pesquisa de *Brachyspiras* patogênicas em lotes de postura comercial e matrizes de corte no estado do Rio Grande do Sul. Foram analisadas com a técnica de Nested PCR 37 amostras oriundas de cinco granjas de postura comercial e destas, 56,76% das amostras eram positivas (RIBEIRO, 2009).

Dados recentes levantados pelo nosso grupo de pesquisa revelaram frequência de 43% para cultura bacteriana em 110 swabs de ceco de matrizes de corte e postura de 35 a 82 semanas de idade, coletadas aleatoriamente de granjas com ou sem histórico de diarreia. Este estudo revelou alta prevalência de *Brachyspira* spp. entres os diferentes tipos de granjas avaliadas (poedeiras comerciais e matrizes) e a presença de *B. intermedia*, potencialmente patogênica (GOULART, 2018).

As espécies de *Brachyspira* são resistentes a vários antimicrobianos: estes incluem a espectinomicina, a colistina, a vancomicina, a rifampicina, a espiramicina e a flavomicina, (LUGSOMYA et al., 2012; HAMPSON et al, 2019). Os antimicrobianos as quais espécies patogênicas de *Brachyspira* de animais que foram relatados como suscetíveis incluem dimetridazol e metronidazol (imidazóis), lincomicina (lincosamidas), tilosina e tilvalosina (macrolídeos), tiamulina e valnemulina (pleuromutilinas), carbadox e olaquinox (quinoxalinas), virginiamicina (estreptograminas) e salinomicina e monensina (ionóforos) (HAMPSON et al, 2019). Segundo Woodward e colaboradores (2015) o tratamento de EIA é atualmente realizado principalmente com antibióticos derivados da pleuromutilina como, por exemplo, Tiamulina.

Em humanos a *Brachyspira* spp. causa doença chamada de espiroquetose intestinal humana e é caracterizada pelo crescimento excessivo de espiroquetas do gênero *Brachyspira* na superfície luminal da mucosa do cólon e ceco. Ela tem distribuição mundial e está presente em seres humanos de diferentes origens étnicas, sendo mais prevalente em homossexuais e em pessoas com imunodeficiência adquirida. Indivíduos infectados apresentam dor abdominal, diarreia duradoura e sangramento retal, que melhoram o tratamento com antibióticos (como por exemplo, Metronidazol) (ROJAS, 2017).

A prevenção de EIA pode ser realizada através de vacina, entretanto ainda são escassos os estudos baseados na vacinação em aves. Em estudo realizado recente por La, Phillips e Hampson (2018), foi testada uma vacina para *B. pilosicoli* em aves comerciais de postura com infecção experimental. Neste estudo, o terminal carboxi de 34 kD proteína de membrana Bmp72 de *B. pilosicoli* foi expressa como recombinante marcado com proteína histidina e utilizado para imunizar dois grupos de 15 galinhas poedeiras individualmente alojadas. A vacina foi considerada eficiente para inibição do crescimento da espécie testada.

O diagnóstico presuntivo das espiroquetoses intestinais pode ser feito por microscopia de esfregaço das fezes (VIOTT, 2013). No entanto, para um diagnóstico efetivo é necessário reunir dados clínicos, lesões macroscópicas e histopatológicas exames laboratoriais específicos, como o isolamento bacteriano e ensaios moleculares (GARCIA, 2015). O método diagnóstico da EIA é usualmente o cultivo bacteriano seguido por provas bioquímicas. A *Brachyspira* spp. é uma bactéria anaeróbica e requer muitas passagens em meios de cultura e vários dias para a purificação das estirpes, sendo dessa forma considerada como uma bactéria fastidiosa por causa de sua dificuldade em cultivo.

Além disso, na cultura bacteriana, há poucas diferenças fenotípicas entre espécies de *Brachyspira* (ILLANES, 2016) sendo este um fator limitante, visto que há várias espécies de *Brachyspira* que podem causar EIA. Em relação à virulência da bactéria, um estudo realizado por Burrough et al (2012), isolados fortemente beta-hemolíticos em ágar sangue, foram associados com maior virulência, onde os animais apresentaram maior índice de diarreia, sangue e muco fecal.

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é rápida, sensível e possibilita a identificação e localização do agente. A FISH ainda permite que se avalie o número e morfologia das células bacterianas e identifica as espécies, utilizando tecidos fixados em formol. Embora a sua aplicação seja rápida e barata, controles minuciosos são fundamentais para garantir a qualidade dos resultados (BOYE et al., 1998; MOTER & GÖBEL, 2000).

A 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 são a porção 16S rRNA devido a sua preservação e estabilidade genética. As sondas utilizadas são produzidas

utilizando-se sequências exclusivas da espécie a qual se pretende localizar (MOTER & GÖBEL, 2000).

A imuno-histoquímica (IHQ) se refere ao processo de localizar antígenos em tecidos, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico. Esta técnica é amplamente utilizada no diagnóstico de neoplasias e agentes infecciosos. A visualização de uma interação antígeno anticorpo pode ser obtida de diversas formas. O anticorpo é conjugado a uma enzima, como uma peroxidase, que pode catalisar uma reação que produzirá coloração e dessa forma poderá ser visualizada com auxílio de microscópicos. Na microbiologia, essa técnica é utilizada para marcar os agentes infecciosos através de anticorpo específico para o antígeno presente na lâmina (COOPER & LUMMAS, 2017).

O objetivo desse trabalho foi identificar bactérias do gênero *Brachyspira* spp. em frangos de corte através de amostras de intestino (ceco) por meio de histologia, imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e descrever as alterações intestinais provocadas por estes agentes.

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

2. CAPÍTULO 1

Artigo intitulado: Identificação de *Brachyspira* spp. em cecos de frangos de corte por meio de histologia e marcação *in situ*.

Identificação de *Brachyspira* spp. em cecos de frangos de corte por meio de histologia e marcação *in situ*¹

Monica Regina de Matos^{2*}, Leonardo Gruchouskei³, Aline Grzegezovski², Amanda Gerelli², Arthur Colombari Cheng², Carla Fusco², Alessandra da Cruz² e Aline de Marco Viott²

ABSTRACT.- Matos, M. R.; Gruchouskei L.; Grzegezovski, A.; Gerelli, A.; Cheng, A. C.; Fusco, C.; da Cruz, A. & Viott A.M. 2019. [Identification of *brachyspira* spp. in cecum of broiler by histology and *in situ* marking]. Identificação de *Brachyspira* spp. em cecos de frangos de corte por meio de histologia e marcação *in situ*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório Patologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná- Setor Palotina (UFPR), Rua Pioneiro, 2153, Palotina, PR, 8550-000, Brazil. E-mail: monicareginadematos@gmail.com.

Genus *Brachyspira* corresponds to a group of bacteria previously classified into genus *Serpulina* and includes several commensal and pathogenic intestinal spirochetes that affects swine, poultry, and other animal species including humans. In poultry, some pathogenic species of this genus cause a disease known as avian intestinal spirochetosis, leading to severe losses that are still sub-diagnosed. *Brachyspira* has the characteristic of fastidious growth. Because of that, application of fast and efficient identification techniques are necessary. The objective of this study was to identify *Brachyspira* spp. using histology, immunohistochemistry (IHC) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) techniques in formalin-fixed samples of cecum from broiler chickens. Samples were collected from 129 broiler chickens aged between 35 and 45 days old. To evaluate, 10% formalin fixed fragments of cecum were included in paraffin and sectioned in five microns on previously silanized slides for FISH and IHC techniques and common glass slides for routine histology processing (H&E) and PAS staining (periodic acid of Schiff). In H&E the histological lesions were analyzed and graded. In PAS, the goblet cells were counted and compared with positive and negative samples in FISH and IHC. Were used labeled probes to *Brachyspira* spp, *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae*, and *B. intermedia* for the FISH technique and specific *Brachyspira* spp. polyclonal rabbit antibody for IHC. Of the 129 samples, 82 were positive in IHC and 86 were positive in FISH. Samples with positive *Brachyspira* specimens in the FISH technique were tested for *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* and *B. intermedia*, in which 56 samples were *B. pilosicoli* positive, 75 were *B. hyodysenteriae* positive, and 80 were *B. intermedia* positive. In 82 samples there was mixed infection by more than one species tested. There was an increasing of goblet cells in FISH and IHC positive samples. The used techniques were effective and inter-corresponding to identify these *Brachyspiras* species, thus serving as a fast and efficient tool for diagnosis.

INDEX TERMS: Avian intestinal spirochetosis, enteritis, diagnosis, histology, immunohistochemistry, fluorescence *in situ* hybridization, *Brachyspira* spp., broiler

RESUMO: O gênero *Brachyspira* corresponde ao grupo de bactérias anteriormente classificadas no gênero *Serpulina* e incluindo várias espiroquetas intestinais comensais e patogênicas para suínos, aves, outras espécies animais e para o homem. Em aves, algumas espécies patogênicas desse gênero causam uma condição conhecida como espiroquetose intestinal aviária, causando sérias perdas econômicas atualmente ainda sub diagnosticadas. A *Brachyspira* possui característica de ser fastidiosa ao crescimento. Devido a isso o emprego de técnicas de identificação rápidas e eficazes se fazem necessárias. O objetivo deste estudo foi identificar *Brachyspira* spp através das técnicas de histologia, imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em amostras de ceco de aves de corte comercial fixadas em formol. Foram coletadas amostras de 129 aves com idade entre 35 e 45 dias de vida oriundas de granjas de frango de corte comercial. Para avaliação, fragmentos de ceco fixadas em formol a 10% foram incluídas em parafina cortadas a cinco micrômetros de espessura em lâminas silanizadas para técnicas de FISH e IHQ e lâminas de vidro comum para processamento da histologia de rotina (H&E) e coloração de PAS (ácido periódico de Schiff). Na H&E as lesões histológicas foram analisadas e graduadas.

¹Recebido em

Aceito para publicação em

²Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR)- Setor Palotina, Rua Pioneiro 2153, Palotina, PR 85950-000. Brasil. * Autor para correspondência: monicareginadematos@gmail.com

³Laboratório de Anatomia e Patologia Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, Av. Edmundo Gaievski 1000, Realeza, PR 85770-000, Brazil.

Na PAS, foram contadas as células caliciformes e comparadas entre amostras positivas e negativas para FISH e IHQ. Para técnica de FISH foram utilizadas sondas marcadas de *Brachyspira* spp, *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* e *B. intermedia* e para IHQ anticorpo policlonal de coelho específico para o gênero *Brachyspira* spp. Das 129 amostras, 82 obtiveram marcação positiva para IHQ e 86 foram positivas para técnica de FISH. As amostras positivas para o gênero *Brachyspira* na técnica de FISH foram testadas para as espécies *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* e *B. intermedia*, nos quais 56 foram positivas para *B. pilosicoli*, 75 para *B. hyodysenteriae* e 80 para *B. intermedia*. Em 82 amostras houve infecção mista por mais de uma espécie testada. Houve aumento de células caliciformes nas amostras positivas para FISH e IHQ. As técnicas utilizadas se apresentaram eficazes e inter correspondentes na identificação das *Brachyspiras* avaliadas servindo assim como uma ferramenta rápida e eficiente para o diagnóstico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Espiroquetose intestinal aviária, enterite, diagnóstico, histologia, imuno-histoquímica, hibridização fluorescente *in situ*, *Brachyspira* spp, frango de corte.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Brachyspira* podem causar doença entérica em diversas espécies, entretanto são mais bem descritas em suínos onde, *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira hyodysenteriae*, são agentes causadores primários da colite espiroquetel e disenteria suína respectivamente (Hampson, 2006). Em aves a *Brachyspira* causa uma condição conhecida como espiroquetose intestinal aviária (EIA) (Medhaniea et al., 2013). Quatro espécies de *Brachyspira* são consideradas patogênicas para aves sendo elas a *Brachyspira intermedia*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira alvinipulli* e a *Brachyspira hyodysenteriae* onde uma ou mais espécies podem estar envolvidas concomitantemente (Song & Hampson 2009; Mappley et al. 2014).

A capacidade de transmissão de *Brachyspira* spp. entre espécie foi verificada em 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).

A EIA afeta o ceco e cólon de frangos de corte resultando em diarreia que varia de leve à severa. Em consequência disso há perda no desempenho geral das aves (Phillips, 2006; Illanes, 2015). Ainda há poucos relatos na literatura acerca do real impacto que as espécies de *Brachyspira* podem causar em frangos de corte, como taxa de morbidade e mortalidade relacionadas a esse agente. As lesões histológicas não são bem descritas em aves, contudo nas espécies de mamíferos afetadas, as lesões geralmente estão limitadas ao cólon e ceco e incluem infiltrados de neutrófilos, plasmócitos e linfócitos na lâmina própria, hemorragia luminal e intersticial variável. Pode haver necrose superficial da mucosa e acúmulo de neutrófilos e muco no topo das vilosidades, bem como hiperplasia e abscessos de cripta. Grandes e delicadas espiroquetas com características típicas de *Brachyspira* spp. podem ser observadas no topo das vilosidades (Burrough et al 2012; Rojas, 2017).

O método de diagnóstico da EIA é usualmente o cultivo bacteriano seguido por provas bioquímicas. A *Brachyspira* spp. é uma bactéria anaeróbica e requer muitas passagens em meios de cultura e vários dias para a purificação das estirpes, sendo dessa forma considerada como uma bactéria fastidiosa por causa de sua dificuldade em cultivo. Além disso, há poucas diferenças fenotípicas entre espécies, o que torna a identificação mais complexa (Illanes, 2015). Em relação à virulência da bactéria, em um estudo realizado por Burrough et al (2012), isolados fortemente beta-hemolíticos em ágar sangue, foram associados com maior virulência, onde os animais apresentaram maior índice de diarreia, sangue e muco fecal.

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é rápida, sensível e possibilita a identificação e localização do agente. O FISH ainda permite que se avalie o número e morfologia das células bacterianas e identifica as espécies, utilizando tecidos fixados em formol. Embora a sua aplicação seja rápida e barata, controles minuciosos são fundamentais para garantir a qualidade dos resultados (Boye et al., 1998; Moter & 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 são a porção 16S rRNA devido a sua preservação e estabilidade genética. As sondas utilizadas são produzidas utilizando-se sequências exclusivas da espécie a qual se pretende localizar (Moter & Göbel, 2000).

A Imuno-histoquímica (IHQ) se refere ao processo de localizar antígenos em tecidos, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico. Esta técnica é amplamente utilizada no diagnóstico de neoplasias e agentes infecciosos. A visualização de uma interação antígeno anticorpo pode ser obtida de diversas formas. O anticorpo é conjugado a uma enzima, como uma peroxidase, que catalisa uma reação produzindo coloração e, dessa forma poderá ser visualizada com auxílio de microscópicos. Na microbiologia, essa

técnica é utilizada para marcar os agentes infecciosos através de anticorpo específico para o antígeno presente na lâmina (Cooper & Lummas, 2017).

O objetivo desse trabalho foi identificar bactérias do gênero *Brachyspira* spp. em frangos de corte através de amostras de intestino por meio de histologia, imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e descrever as alterações intestinais provocadas por estes agentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética de uso de animais Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) através do protocolo número 09/2018 e está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Amostras

Ao total foram utilizadas 129 amostras de ceco coletados de frangos de corte com idade que variava entre 35 a 45 dias de idade, oriundas de nove granjas localizadas em dois municípios do oeste do Paraná (24° 25' 4" S, 53° 49' 48" W e 24° 17' 2" S, 53° 50' 24" W). As aves foram escolhidas aleatoriamente pelo galpão (com ou sem histórico de diarreia). Fragmentos de ceco foram coletados, analisados macroscopicamente, e fixados em formol tamponado a 10%.

Histologia e graduação das lesões

Para o exame histopatológico, após fixação as amostras foram processadas pela técnica histológica rotineira de desidratação e inclusão em parafina. Os tecidos parafinizados foram seccionados em 5 µm de espessura e corados pela técnica de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) (Tolosa, 2003).

As amostras positivas para detecção *in situ* de *Brachyspira* spp. foram graduadas na histologia conforme as seguintes lesões: (1) granulócitos na lâmina própria do intestino; (2) criptas intestinais distendidas por células inflamatórias e restos celulares e; (3) presença de espiroquetas. Foram avaliados cinco campos de grande aumento por lâmina e obtido uma média. Para granulócitos na lâmina própria do intestino as amostras foram classificadas como: ausente (0-1 granulócito); discreta (2-4); leve (5-7); moderada (7-9) e acentuada (acima de 10). Para a lesão distensão das glândulas de Liebertkuhn por células inflamatórias e restos celulares, as lâminas foram classificadas conforme a porcentagem de criptas afetadas da seguinte forma: ausente, discreto (abaixo de criptas afetadas 25%), leve (26-50%), moderado (51-75%) e acentuado (acima de 76%). A presença das espiroquetas foi classificada conforme a distribuição no tecido da seguinte forma: ausente, rara (abaixo de 5%), multifocal (6-40%), coalescente (41-80%) e difusa (acima de 80%).

PAS e contagem de células caliciformes

Cortes de 5 µm de espessura de fragmentos de ceco foram submetidos a coloração de ácido periódico-Schiff (PAS) para evidenciar as células caliciformes de acordo com Culling et al., (1985).

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

Imuno-histoquímica (IHQ)

Para a marcação por IHQ, fragmentos de intestino grosso foram fixados em formol tamponado 10% e processados para inclusão em parafina. Após esse procedimento foram obtidas seções histológicas em lâminas silanizadas de 5 µm de espessura. As seções de tecido foram desparafinadas utilizando xilol em três passagens de dez minutos cada, etanol 100% em duas passagens de cinco minutos cada, etanol 95%, uma passagem de cinco minutos, e etanol 70%, uma passagem de cinco minutos. As lâminas foram tratadas com Peróxido de hidrogênio e em seguida lavadas com solução 100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (TBS). A recuperação antigênica foi realizada com auxílio de enzimas à base de tripsina e colocadas no micro-ondas. Para o bloqueio de reações inespecíficas as lâminas foram tratadas com leite em pó desnatado a 5%. Foi adicionada a lâmina o anticorpo policlonal de coelho específico para o gênero *Brachyspira* spp. Após esse procedimento foi adicionado o anticorpo secundário à base de Streptavidina seu ligante biotinado. O composto Streptavidina-Biotina foi adquirido através de kit- DAKO LSAB (Dako EnVision + Dual Link System-HRP). Para a imunomarcação foi utilizado o cromógeno AEC (3- Amino-9-ethylcarbazole) que confere coloração vermelha na presença das bactérias do gênero *Brachyspira* spp. O tecido adjacente foi contra-corado com Hematoxilina de Mayer. As lâminas foram montadas com meio aquoso (Faramount).

Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Para a realização da técnica de FISH, utilizaram-se quatro sondas, sendo uma sonda para o gênero *Brachyspira* e outras três espécies específicas sintetizadas comercialmente (Invitrogen), 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: GTCATCGTGAAGCGAAA; e a descrita por Phillips et al. (2006) para *B. intermedia* porção do gene *nox*: ATAAACATCAGGATCTTTGC. Todas foram marcadas com o fluorocromo Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher) e com purificação HPLC.

Cortes histológicos de 5 µm em lâminas silanizadas foram desparafinados em duas baterias de xilol por 10 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 99 µl de tampão de hibridização (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio) adicionada de 1 µl 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 foram 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 fluorocromo, em aumento de 40x.

Análise estatística

As médias de células caliciformes foram avaliadas em todos os animais do estudo (129) e comparadas isoladamente com as amostras positivas para IHQ e FISH. O teste realizado foi o de qui-quadrado, considerando $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

Os resultados também foram comparados entre as técnicas de FISH e IHQ visando sua intercorrespondência (se amostras positivas para IHQ também foram positivas para FISH). O teste realizado foi o de qui-quadrado, considerando $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Em 25 das 129 amostras analisadas foram encontradas lesões na mucosa do ceco caracterizadas macroscopicamente por elevações arredondadas com cerca de 0,5 cm de diâmetro, amareladas, macias e que apresentavam variavelmente ulceração central (Figura 1A). Microscopicamente essa lesão era caracterizada por hiperplasia de GALT associado à necrose central com infiltrado inflamatório granulocítico composto por grande quantidade de heterófilos degenerados e íntegros. A ulceração da mucosa, quando presente, caracterizava-se por ausência da lâmina basal, lâmina própria e mucosa e estava comumente associada ao tecido linfóide intestinal (GALT). Das 25 amostras que apresentavam essa lesão, apenas duas foram negativas para *Brachyspira* pela FISH. As marcações fluorescentes foram observadas na mucosa e associadas ao GALT (Figura 2A)

Na histologia foram observadas as seguintes lesões: infiltrado inflamatório granulocítico na lâmina própria; criptas intestinais distendidas por células inflamatórias e restos celulares (Figura 1B) e presença de delicadas espiroquetas basofílicas dispostas no lúmen das criptas, entre as vilosidades e no ápice das vilosidades intestinais. As amostras foram classificadas conforme grau de lesão como demonstrado na tabela 1.

Através da coloração de PAS, as células caliciformes foram coradas intensamente de magenta (Figura 1C). A contagem das células caliciformes revelou aumento destas células para as amostras positivas para IHQ e FISH quando comparada com as amostras negativas (Tabela 2).

A IHQ revelou marcação positiva para 82 das 129 amostras testadas. A imunomarcação foi classificada como fraca (25/82), moderada (27/82) e acentuada (30/82). Houve frequente imunomarcação no lúmen das criptas intestinais (Figura 1F) e em íntima associação com a mucosa intestinal (Figura 1D). Também houve marcação no topo das vilosidades formando “falso bordo em escova” (Figura 1E) e espiroquetas livres na luz intestinal. Por vezes notou-se marcação na submucosa em associação com o GALT.

Para FISH a sonda do gênero da bactéria *Brachyspira spp* foi testada individualmente nas 129 amostras onde foram encontradas 86 amostras positivas. Foi realizado um delineamento experimental onde somente as amostras positivas do gênero *Brachyspira* foram testadas para as espécies: *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia* e *B. pilosicoli*. Os resultados encontrados foram respectivamente 80 amostras positivas para *Brachyspira intermedia*, 75 amostras positivas para *Brachyspira hyodysenteriae* e 56 amostras positivas para a sonda *Brachyspira pilosicoli*. Os padrões de marcação fluorescente foram semelhantes aos encontrados na imuno-histoquímica (Figura 2).

Houve compatibilidade entre as técnicas de IHQ e FISH (Tabela 3). Todas as amostras positivas na IHQ também se demonstraram positivas na técnica de FISH. O número de amostras positivas para FISH foi ligeiramente superior ao de IHQ (86 amostras positivas para FISH e 82 amostras positivas para IHQ).

DISCUSSÃO

A lesão proliferativa e ulcerativa da mucosa do ceco de algumas aves do estudo, caracterizada microscopicamente como proliferação de GALT e ulceração da mucosa, não está relacionada a quaisquer agentes etiológicos descritos na literatura até a atualidade. Destaca-se a alta frequência desse tipo de lesão em frangos de corte da região oeste do Paraná (19,37%) em animais que iriam para abate e consumo. *Clostridium colinum* é causador de enterite ulcerativa em aves, entretanto a lesão ocorre principalmente em intestino delgado, onde a mucosa é intensamente afetada e há pouca relação com o tecido linfóide da submucosa, como observado neste estudo. Demais clostridioses que afetam aves (*C. perfringens*, *C. fallax*, *C. difficile*) causam enterite necro-hemorrágica severa diferindo das lesões observadas (Cooper, 2013) e não foram observadas estruturas compatíveis com *Eimeria tenella* nas amostras acometidas.

Houve marcação *in situ* de bactérias espiroquetais nas amostras que tinham a lesão proliferativa e ulcerativa da mucosa. A marcação estava presente no GALT e na mucosa associada. Apenas dois animais que tinham essa lesão foram negativos para FISH (2/25). Outro fator pertinente é que 20 das 23 amostras positivas para FISH gênero foram positivas para *B. hyodysenteriae*, o que sugere o envolvimento dessa espécie no desenvolvimento da lesão. É importante ressaltar a relevância de realizar novos estudos para desvendar a patogenia dessa lesão e estabelecer possíveis diagnósticos diferenciais.

Em relação as demais lesões histológicas observadas neste estudo ressalta-se tiflíte, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório granulocítico na lâmina própria do intestino; criptas intestinais distendidas por células inflamatórias e restos celulares e; presença de bactérias espiroquetais. Segundo Porter e colaboradores (1998), as lesões por espiroquetose em aves consistem em infiltrado misto de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria, graus variáveis de necrose e hiperplasia de células caliciformes, criptas distendidas com células epiteliais descamadas e espiroquetas, e infiltrados de uma população mista de células inflamatórias, o que corrobora com as lesões encontradas através da histologia neste estudo. A graduação dessas lesões permitiu concluir que as alterações histológicas são, em sua maior parte, brandas, o que acarreta em baixa mortalidade, porém com significativa perda do desempenho geral das aves afetadas.

Neste estudo as amostras positivas para IHQ e FISH tiveram aumento de células caliciformes. O aumento do número de células caliciformes é uma alteração comumente observada em animais infectados por *Brachyspira* spp (Feberwee et al 2008; Shivaprasad & Duhamel; 2005, Jensen et al 1996). A presença da bactéria propicia maior produção de muco como forma de defesa do organismo frente ao microrganismo invasor. Além disso, o muco propicia ambiente de anaerobiose favorecendo a multiplicação da *Brachyspira*.

A imunomarcação estava presente principalmente no lúmen das criptas semelhante ao observado por Venkatakrisnan (2017), que visualizou *B. hyodysenteriae* no cólon de suínos através de imunofluorescência e teve como resultado forte marcação da bactéria no lúmen das criptas intestinais em íntima associação ao epitélio e em células caliciformes. Paulovich et al (2004), em infecção experimental com *B. pilosicoli*, de pintos de um dia de idade, observou imunomarcação positiva no epitélio intestinal em direção ao lúmen, formando bordo escuro composto pelas espiroquetas (falso bordo em escova). Este padrão de colonização também foi observado nas amostras deste estudo.

Outro padrão encontrado nas amostras de IHQ foi a presença de espiroquetas livres na luz intestinal. Segundo Paulovich e colaboradores (2004) pode-se especular que o processamento histopatológico poderia ter causado a presença da bactéria na luz intestinal. Entre os fatores que poderiam explicar essa "descamação" das bactérias aderidas, poderiam ser citados artefatos de processamento das amostras.

Os resultados demonstraram grande número de infecções mistas para mais de uma espécie testada na FISH (82/86). Hess e colaboradores (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.

Muitas espécies apatogênicas de *Brachyspira* já foram identificadas em aves, entre elas a *B. innocens*, *B. murdochii* e a *B. pulli* (Feberwee et al., 2008). Em estudo realizado por Prapasarakul e colaboradores (2011), demonstrou que cães urbanos apresentavam positividade para *B. pulli*, *B. canis*, *B. intermedia* e *B. pilosicoli* e infecções experimentais em pintos de um dia demonstram infecção por essas espécies. 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. Dessa forma, podemos concluir que outras espécies não testadas, podem também infectar aves.

O número de amostras positivas para a técnica de FISH foi ligeiramente superior a de IHQ (86 amostras positivas para FISH e 82 positivas para IHQ). A técnica de FISH é capaz de detectar até mesmo apenas uma única célula bacteriana desde que esteja presente no corte histológico visualizado, o que explica os resultados obtidos (Boye et al, 1998).

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram a alta frequência de bactéria do gênero *Brachyspira* spp nas granjas comerciais de frango de corte da região oeste do Paraná. Tanto a técnica de FISH e de IHQ aplicada em ceco de galinhas fixados em formol foram eficientes para a identificação de *Brachyspira* spp., servindo como uma ferramenta rápida para o diagnóstico reduzindo o tempo entre o envio de amostras e o diagnóstico, possibilitando assim o início da intervenção terapêutica.

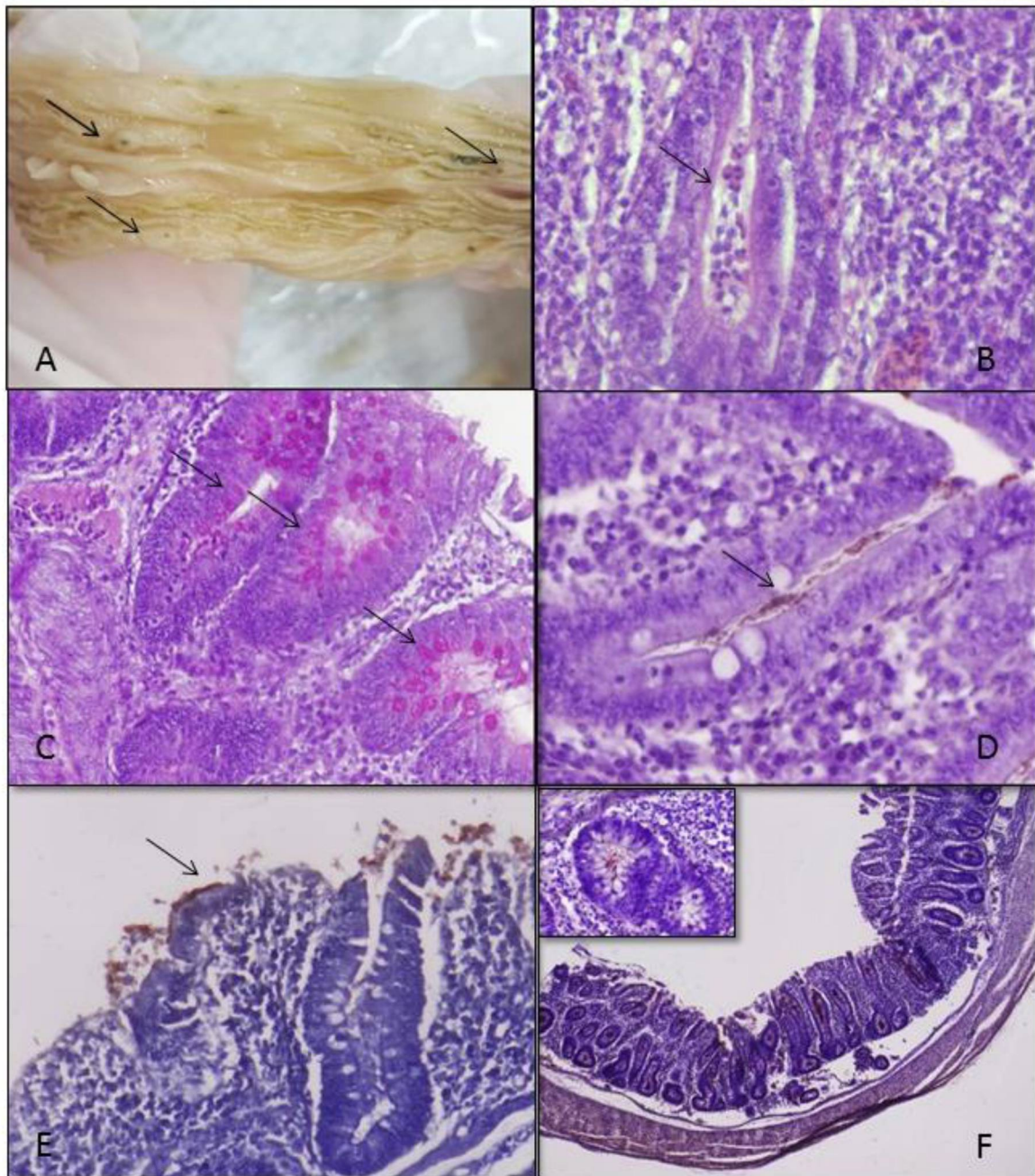
Agradecimentos- À Fundação Araucária/UFPR pela concessão de bolsa de estudo. Ao professor Dr. David Barcellos e Dr. Roberto Mauricio Carvalho Guedes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil por ceder o anticorpo para *Brachyspira* spp utilizado na IHQ.

REFERÊNCIAS

- BACKHANS, A.; JANSSON, D.S.; ASPA'N, A.; FELLSTRO, C. Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Veterinary Microbiology*, n. 153, p. 156-162, 2011.
- 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. et al. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation*, [s.l.], v. 24, n. 6, p.1025-1034, 5 set. 2012. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638712457927>
- COOPER, KERRY K.; SONGER, J. GLENN; UZAL, FRANCISCO A. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation*, [s.l.], v. 25, n. 3, p.314-327, 9 abr. 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638713483468>.
- COOPER; M. & LUMMAS, S. *Antibodies for Immunohistochemistry in Immunohistochemistry and Immunocytochemistry Essential Methods*. Wiley Blackwell. Second ed., sPI Global, 2017.
- CULLING, C.F.A., R.T. ALLISON AND W.T. BARR. 1985 *Cellular Pathology Technique*. fourth edition. Vancouver, Canada: Butterworth & Co. Ltd., p. 219-222
- FEWERWEE 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.
- HAMPSON, D. J., FELLSTRON, M. C. & THOMSON, J. R. Swine dysentery. In: *Diseases of Swine*. 9 ed., Edited by: STRAW, B. E., ZIMMERMAN, J. J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, cap. 48, p. 785-805, 2006.
- 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. V. et al. Detección de *Brachyspira pilosicoli* y otras especies de *Brachyspira* en granjas avícolas argentinas. *Revista Argentina de Microbiología*, Córdoba, v. 48, n. 1, p.67-70, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.12.002>.
- 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.
- MAPPLEY L.J., LA RAGIONE R.M. & WOODWARD M.J. 2014. *Brachyspira* and its role in avian intestinal spirochaetosis. *Vet. Microbiol.* 168:245-260.

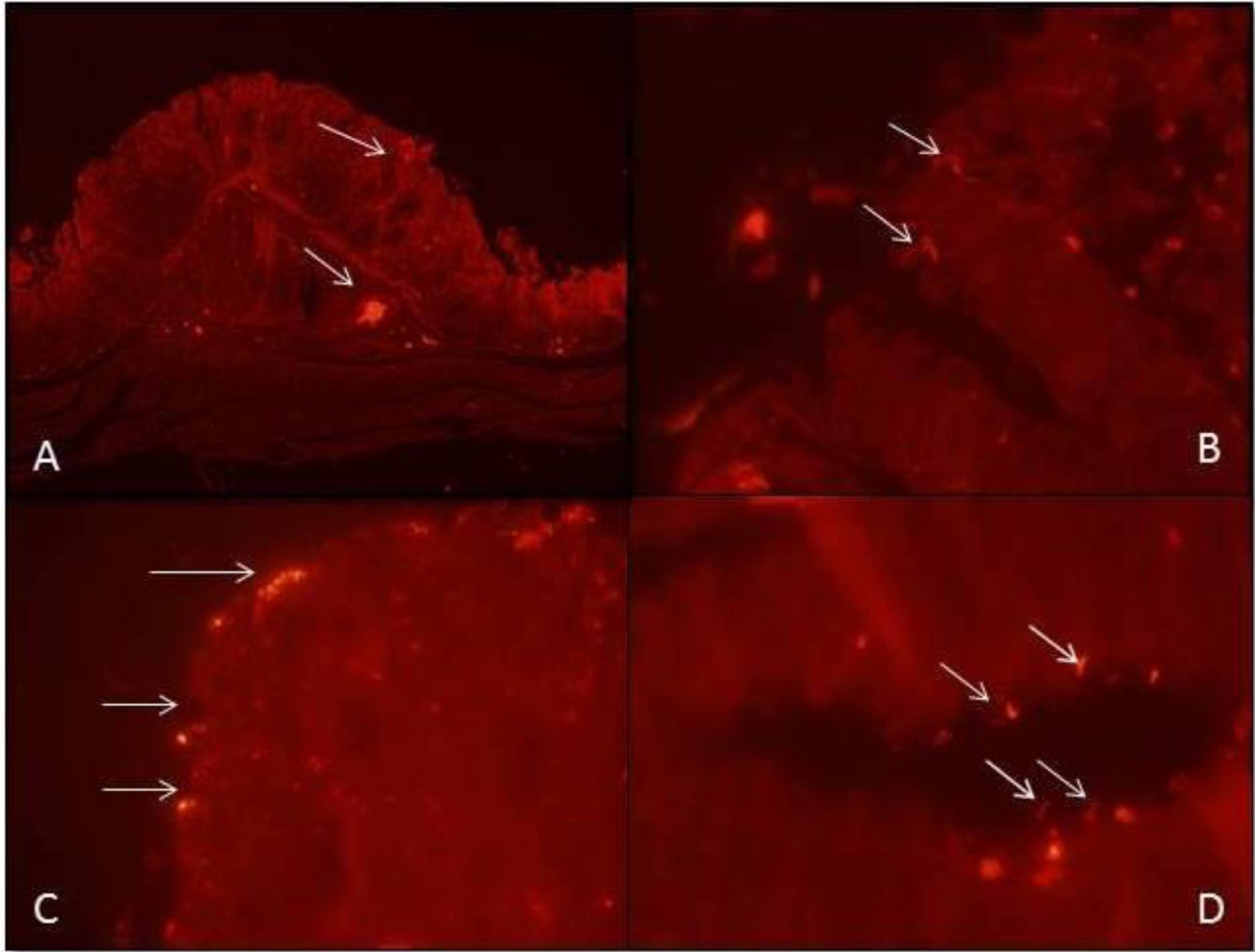
- MEDHANIE, G. A.; MCEWEN, S. A.; WEBER, L.; SANEI, B.; COOLEY, L.; HOUGHTON, S.; SLAVIC, D.; GUERIN, M. T. Risk factors associated with the colonization of Ontario layer chicken flocks with *Brachyspira* species. *Preventive Veterinary Medicine*, n. 109, p. 304- 311, 2013.
- MOTER, A.; GÖBEL, U.B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods.*, v. 41, p. 85-112, 2000.
- PAULOVICH, Fabiana Beatriz et al. Avaliação da patogenicidade de amostras de *Brachyspira pilosicoli* através de técnicas histopatológicas convencionais e por imuno-histoquímica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, [s.l.], v. 24, n. 3, p.144-148, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2004000300005>.
- 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. 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.
- PORTER, R. E.. Bacterial enteritides of poultry. *Poultry Science*, [s.l.], v. 77, n. 8, p.1159-1165, 1 ago. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ps/77.8.1159>.
- PRAPASARAKUL, Nuvee et al. Faecal excretion of intestinal spirochaetes by urban dogs, and their pathogenicity in a chick model of intestinal spirochaetosis, *Research in Veterinary Science* 91 (2011) e38–e43. Elsevier BV. doi:10.1016/j.rvsc.2011.01.015
- ROJAS, Pablo et al. Distribution and phylogeny of *Brachyspira* spp. in human intestinal spirochetosis revealed by FISH and 16S rRNA -gene analysis. *Anaerobe*, 2017, v. 47, p.25-32, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.012>.
- 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.
- 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.
- VENKATAKRISHNAN, Vignesh et al. *Brachyspira hyodysenteriae* Infection Regulates Mucin Glycosylation Synthesis Inducing an Increased Expression of Core-2 O-Glycans in Porcine Colon. *Journal Of Proteome Research*, [s.l.], v. 16, n. 4, p.1728-1742, 30 mar. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00002>.

FIGURA 1 – Lesões Macroscópicas, histológicas e marcação IHQ do ceco das aves necropsiadas. (A) Ceco com lesões multifocais proliferativas com discreta ulceração central em mucosa (seta). (B) Cripta intestinal distendida por células inflamatórias (seta), restos celulares e delicadas espiroquetas H&E obj. 40x. (C) Hiperplasia de células caliciformes na mucosa intestinal (setas) PAS obj. 20x. (D) Imunomarcação positiva para *Brachyspira* spp com íntima associação a mucosa intestinal (setas) IHQ obj. 40x. (E) Imunomarcação positiva para *Brachyspira* spp formando “falso bordo em escova” (seta) IHQ obj. 20x. (F) Imunomarcação acentuada em criptas intestinais e topo de vilosidades IHQ obj. 4x. No detalhe em maior aumento evidencia-se *Brachyspiras* marcadas no lúmen da cripta intestinal IHQ obj. 40x.



Fonte; A autora (2019)

FIGURA 2- Fotomicrografias com marcação positiva para *Brachyspira* em ceco de frangos de corte pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). (A) Marcação positiva para *Brachyspira hyodysenteriae* em mucosa (seta) e no tecido linfoide na submucosa (GALT) (seta) obj. 4x. (B) Marcação positiva para *Brachyspira* spp em mucosa intestinal (setas) obj. 20x. (C) Marcação positiva para *B. pilosicoli* no ápice da mucosa intestinal obj. 10x. (D) Marcação positiva para *B. intermedia* associado à cripta intestinal obj. 40x.



Fonte; A autora (2019)

Tabela 1. Graduação das lesões histológicas observadas nas 86 amostras de ceco de frangos de corte positivas para FISH (média de contagem de 5 campos por grande aumento)

	Sem Alteração/ ausente	Discreto/ rara	Leve/ multifocal	Moderado/ coalescente	Acentuado/ difusa
Dilatação de criptas intestinais por restos celulares e células inflamatórias	75	10	0	1	0
Bactérias com formato espiroquetal	6	48	26	6	0
Infiltrado inflamatório granulocítico	1	8	22	35	20

Fonte: A autora (2019)

Tabela 2. Contagem de células caliciformes (média de contagem de 10 campos por grande aumento) na técnica de ácido periódico de Schiff comparado técnicas de FISH e IHQ

	Contagem de células caliciformes em FISH*	Contagem de células caliciformes em IHQ**	Total
Negativo	2214a	2399a	4613
Positivo	3984b	3799b	7783
Total	6198	6198	12396

*Hibridização fluorescente *in situ*; **Imuno-histoquímica. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste Qui- quadrado ($P < 0,05$); $n = 129$

Fonte: A autora (2019).

Tabela 3. Comparação das técnicas de IHQ e FISH para identificação de *Brachyspira* spp.

	IHQ*	FISH**	Total
Negativo	47a	43a	90
Positivo	82b	86b	168
Total	129	129	258

*Imuno-histoquímica; ** Hibridização fluorescente *in situ*. Letras minúsculas nas colunas indicam igualdade estatística pelo teste Qui-quadrado ($P < 0,05$) em relação às técnicas testadas; $n = 129$

Fonte: A autora (2019)

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa tem o mérito de identificar da bactéria *Brachypira* spp. em aves comerciais através da análise das lesões macro e microscópicas e uso de ferramentas diagnósticas IHQ de FISH, contribuindo dessa forma para o conhecimento da epidemiologia desse patógeno na região do oeste do estado do Paraná, bem como os danos que esse patógeno causa e conseqüentemente reduzindo das perdas econômicas provocadas por esse microrganismo ainda pouco estudado na avicultura.

Com este estudo foi possível analisar a viabilidade de uma forma alternativa para diagnóstico de *Brachypira* spp. alternativa esta que possibilitará a utilização de amostras fixadas em formol, não necessitando que a amostra chegue ao laboratório refrigerada e em um curto período de tempo (como nas técnicas de isolamento bacteriano e amostras para o PCR). Esta característica é de interesse, pois as regiões produtoras muitas vezes ficam afastadas de instituições que realizam o diagnóstico o que dificulta a envio de material fresco, ou em casos aonde não tenha ocorrido à coleta de material fresco apenas fixado em formol o que é mais comum pela facilidade deste tipo de coleta.

Através da IHQ e FISH foi possível avaliar a especificidade e sensibilidade das técnicas e comparar as qualidades e pontos críticos. Com a FISH foi possível determinar as espécies de *Brachypira* que acometem as aves na região oeste do Paraná.

9.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

São necessários trabalhos subsequentes que visem o estabelecimento de diagnósticos diferenciais para as lesões encontradas no ceco dos frangos de corte e a real interação das bactérias do Gênero *Bachypira* no desenvolvimento e/ou progressão dessas lesões.

REFERÊNCIAS

- BACKHANS, A.; JANSSON, D.S.; ASPA'N, A.; FELLSTRO, C. Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Veterinary Microbiology*, n. 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, 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. et al. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation*, [s.l.], v. 24, n. 6, p.1025-1034, 5 set. 2012. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638712457927>
- 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.
- COOPER, KERRY K.; SONGER, J. GLENN; UZAL, FRANCISCO A.. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation*, [s.l.], v. 25, n. 3, p.314-327, 9 abr. 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638713483468>.
- COOPER; M. & LUMMAS, S. Antibodies for Immunohistochemistry in Immunohistochemistry and Immunocytochemistry Essential Methods. Wiley Blackwell. Second ed., sPI Global, 2017.
- CULLING, C.F.A., R.T. ALLISON AND W.T. BARR. 1985 Cellular Pathology Technique. fourth edition. Vancouver, Canada: Butterworth & Co. Ltd., p. 219-222

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. Palotina-PR, 2015. Disponível em <<http://www.ppgca.ufpr.br/wp-content/uploads/2015/09/edismair-carvalho-garcia.pdf>>

GOULART, T.. 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. Dissertação de Mestrado. Palotina-PR, 2018. Disponível em <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/55888/R%20-%20D%20-%20THIAGO%20GOULART.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

HAMPSON DJ, SWAYNE DE, GLISSON JR, MCDOUGLAD LR, NOLAN LK, SUAREZ DL, et al. *Disease of poultry*. Ames: Blackwell; 2013.

HAMPSON, D. J., FELLSTRON, M. C. & THOMSON, J. R. Swine dysentery. In: *Diseases of Swine*. 9 ed., Edited by: STRAW, B. E., ZIMMERMAN, J. J., D'ALLAIRE, S. et al. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, cap. 48, p. 785-805, 2006.

HAMPSON, David J. et al. Antimicrobial resistance in *Brachyspira* – An increasing problem for disease control. *Veterinary Microbiology*, [s.l.], v. 229, p.59-71, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.019>.

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, Natalia V. et al. Detección de *Brachyspira pilosicoli* y otras especies de *Brachyspira* en granjas avícolas argentinas. Revista Argentina de Microbiología, Córdoba, v. 48, n. 1, p.67-70, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.12.002>.

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.

LA, TOM; PHILLIPS, NYREE DALE; HAMPSON, DAVID JOHN. Vaccination of chickens with the 34 kDa carboxy-terminus of Bpmp72 reduces colonization with *Brachyspira pilosicoli* following experimental infection. Avian Pathology, [s.l.], v. 48, n. 1, p.80-85, 26 nov. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2018.1546377>.

LUGSOMYA, K., TUMMARUK, P., HAMPSON, D.J., PRAPASARAKUL, N., 2012. Development of a modified selective medium to enhance the recovery rate of *Brachyspira hyodysenteriae* and other intestinal spirochaetes from porcine faeces. Lett. Appl. Microbiol. 54, 330–335.

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. Risk factors associated with the colonization of Ontario layer chicken flocks with *Brachyspira* species. Preventive Veterinary Medicine, n. 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.

PAULOVICH, Fabiana Beatriz et al. Avaliação da patogenicidade de amostras de *Brachyspira pilosicoli* através de técnicas histopatológicas convencionais e por imunohistoquímica. Pesquisa Veterinária Brasileira, [s.l.], v. 24, n. 3, p.144-148, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2004000300005>.

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. 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.

PORTER, R. E.. Bacterial enteritides of poultry. *Poultry Science*, [s.l.], v. 77, n. 8, p.1159-1165, 1 ago. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ps/77.8.1159>.

RIBEIRO L. 2009 Estudo da Novartis comprova presença no Brasil de bactéria potencialmente causadora de diarreia e perdas econômicas em aves brasileiras. Disponível em: < http://www.ovoonline.com.br/?:=info_tecnico&tt=atd&c=13 >. Acesso em: 28.06.17

ROJAS, Pablo et al. Distribution and phylogeny of *Brachyspira* spp. in human intestinal spirochetosis revealed by FISH and 16S rRNA -gene analysis. *Anaerobe*, 2017, v. 47, p.25-32, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.012>.

ROY, Caroline I Le. et al. *Brachyspira pilosicoli*-induced avian intestinal spirochaetosis. *Microbial Ecology In Health & Disease*, [s.l.], v. 26, n. 1, p.1-9, 15 dez. 2015. Co-Action Publishing. <http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v26.28853>

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.

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.

Trampel, D. W., N. S. Jensen, and L. J. Hoffman, 1994. Cecal spirochetosis in commercial laying hens. *Avian Dis.* 38: 895–898

VENKATAKRISHNAN, Vignesh et al. *Brachyspira hyodysenteriae* Infection Regulates Mucin Glycosylation Synthesis Inducing an Increased Expression of Core-2 O-Glycans in Porcine Colon. *Journal Of Proteome Research*, [s.l.], v. 16, n. 4, p.1728-1742, 30 mar. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00002>.

VIOTT, A. M., LAGE, A. P., CRUZ JR. et al. The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. *Braz. J. Microbiol.*, v. 44,n. 1, p. 145-151, 2013.

WOODWARD, Martin J. et al. Drinking water application of Denagard® Tiamulin for control of *Brachyspira pilosicoli* infection of laying poultry. *Research In Veterinary Science*, [s.l.], v. 103, p.87-95, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.015>.

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA *BRACHYSPIRA* SPP.

1. Xilol I – 20 minutos
2. Xilol II – 20 minutos
3. Álcool 100% - 2 minutos
4. Álcool 96% - 2 minutos
5. Álcool 80% - 2 minutos
6. Álcool 70% - 2 minutos
7. Água destilada
8. Peróxido de hidrogênio 3% – 5 minutos
Diluir em água destilada até a concentração de 3%
9. Lavar com TBS
10. Recuperação antigênica: tripsina 0,1% por 10 minutos a 37 graus.
11. Escorrer e deixar a lamina em tampão citrato (PH 6) por 2 minutos em micro-ondas na potência máxima, evitando evaporar. Controlar pingando TBS quando ferver. Deixar esfriar.
12. Bloqueio de reação inespecífica: leite desnatado 5% (diluir em PBS, sendo 5g/L pó Molico® + 95 mL de PBS) por 15 minutos.
13. Lavar com TBS.
14. Anticorpo primário policlonal: 1/6000 diluído em PBS por 45 min em 37 graus
15. Lavar com TBS.
16. Anticorpo secundário KIT LSAB – DAKO® por 30 minutos em temperatura ambiente
17. Lavar com TBS.
18. Solução AEC, em câmara úmida por 10 minutos em temperatura ambiente.
19. Água destilada por 5 minutos.
20. Água da torneira por 5 minutos.
21. Hematoxilina de Mayer, por até um minuto.
22. Água corrente de 5 a 10 minutos.
23. Montagem da lamina em meio aquoso (Faramount)

APÊNDICE B- SOLUÇÃO DE TBS-TRIS-BUFFERED SALINE

Materiais

Tris

NaCl

1M HCl

Água destilada, deionizada ou ultrapura

Modo de preparo

1. Dissolver 6,05 g Tris e 8,76 g NaCl em 800 mL de H₂O.
2. Ajustar o pH para 7,6 com 1 M de HCl.
3. Coloque água destilada/deionizada ou ultrapura para completar 1 litro.
4. Uma vez preparado, o TBS é estável a 4 ° C durante 3 meses.

APÊNDICE C-SOLUÇÃO DE PBS (PHOSPHATE-BUFFERED SALINE) [10X]

Materiais:

NaCl	82 g
Na ₂ HPO ₄	10,5 g
NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O	3,55 g
Água destilada	1L

Modo de preparo:

Misturar todos os reagentes na água destilada e ajustar o pH para 7.2 com HCL 1M. Para utilizar diluir 100 ml de PBS 10x em 990 ml de água destilada.

APÊNDICE D- 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 E – 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 evitar excesso de bolhas).

O tampão de hibridização tem validade de dois meses.

APÊNDICE F – 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