

Investigação de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos com diarreia no Espírito Santo, Brasil*

Bruno Ramos Oliveira¹⁺, Lígia Fernandes Gundim¹, Anna Monteiro Correia Lima² e Alessandra Aparecida Medeiros³

ABSTRACT. Oliveira B.R., Gundim L.F., Lima A.M.C. & Medeiros A.A. [*Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* research in pigs with diarrhea in Espírito Santo, Brazil.] Investigação de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos com diarreia no Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(3):287-291, 2016. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 3, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902, Brasil. E-mail: brunoramos_vet@ymail.com

This study aimed investigate the presence of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pigs with clinical signs of diarrhea, by real time polymerase chain reaction - qPCR, and evaluate epidemiological conditions of the properties. Samples were obtained from 30 farms in 10 different Municipalities in the State of Espírito Santo (ES). With the aid of spatulas and rectal swabs collected up the feces and made pools of feces 3-5 animals. We apply an epidemiological survey on farms for identification of the risk factors. As samples were analyzed by qPCR (RT-PCR) in a commercial laboratory in triplicate for identification of *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. No positive samples were detected for *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. With regard to epidemiological data, 27 farms (90%) had veterinary medical assistance, two farms (6.67%) did not have complete cycle, 12 properties (40%) used for compost waste and 18 (60%) cesspools. Twenty-nine properties (96.7%) introduced animals from other properties to spare the squad. The use of antimicrobial and low density production units in the ES may have interfered in identifying the investigated etiologic agents.

KEY WORDS. qPCR swine dysentery Spirochetal colitis, diarrhea, pathogenic spirochetes.

RESUMO. Este estudo teve como objetivo investigar a presença de *Brachyspira hyodysenteriae* e *Brachyspira pilosicoli* em suínos com sinais clínicos de diarreia, pela técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real - qPCR, e avaliar as condições epidemiológicas das propriedades. Foram obtidas amostras provenientes de 30 granjas em 10 diferentes municípios do Estado do Espírito Santo. Com auxílio de espátulas e suabes retais coletou-se as fezes e pools de fezes 3 a 5 animais foram fei-

tos. Foi aplicado um questionário epidemiológico nas granjas para identificação dos fatores de risco. As amostras foram submetidas à análise por Qpccr (PCR em Tempo Real), em laboratório comercial, em triplicata para identificação de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. Não foram detectadas amostras positivas para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. Com relação aos dados epidemiológicos, 27 granjas (90%) possuíam assistência médico veterinária, duas granjas (6,67%) não possuíam ciclo completo, 12 proprie-

* Recebido em 29 de outubro de 2015.

Aceito para publicação em 29 de janeiro de 2016.

¹ Médico-veterinário. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 3, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902. E-mail: ligia_fg@hotmail.com; ⁺ Autor para correspondência, E-mail: brunoramos_vet@ymail.com

² Médica-veterinária, DSc. UFU, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902. E-mail: annalima@famev.ufu.br

³ Médica-veterinária, DSc. Laboratório de Patologia Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, Sala 3, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38400-902. E-mail: alessandra@famev.ufu.br

dades (40%) utilizavam composteira para dejetos e 18 (60%) fossa. Vinte e nove propriedades (96,7%) introduziam animais de outras propriedades para reposição do plantel. O uso de antimicrobianos e a baixa densidade de unidades produtoras no ES podem ter interferido na identificação dos agentes etiológicos investigados.

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

INTRODUÇÃO

A diarreia é frequente na criação comercial de suínos, especialmente nas fases de recria e terminação (Hampson 2010) e pode levar ao aumento no custo da produção, uma vez que causa menor ganho de peso dos animais, alto custo com medicamentos e alta mortalidade (McOrist 2005).

Nos últimos anos foi observada uma reemergência de doenças entéricas causadas pelo gênero *Brachyspira* spp., atribuída à resistência deste à antimicrobianos (Clothier et al. 2011). Além disso, novas espécies de *Brachyspira* foram descritas, como *Brachyspira hampsonii* (Chandler et al. 2012). Dentre as espécies que acometem suínos, as mais comuns são *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira hyodysenteriae*. Clinicamente, a colite, causada pela *B. pilosicoli*, é caracterizada por fezes pastosas acinzentadas, semelhantes a cimento fresco, e raramente há presença de sangue nas fezes. (Guedes & Barcelos 2012). Já, a disenteria suína, causada pela *B. hyodysenteriae*, apresenta-se como diarreia mucohemorrágica, levando a queda da condição corporal (Hampson & Trott 2006).

O padrão ouro para diagnóstico diferencial destas enteropatias é o isolamento bacteriano (Kennedy et al. 1988), entretanto La et al. (2009) demonstraram que a sensibilidade e especificidade altas foram observadas quando foi utilizando a PCR em amostras fecais.

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

Sendo assim, objetivou-se investigar a presença de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* em suínos com sinais clínicos de diarreia, na região Centro-Serrana do ES pela técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR, além de avaliar as condições epidemiológicas das propriedades da região.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em rebanhos com histórico de diarreia e com suspeita clínica de infecção por *Brachyspira* spp. patogênicas. Nas granjas estudadas, o número de suínos que apresentavam diarreia era menor ou igual a 10 animais. Foram obtidas amostras provenientes de 30 granjas em 10 diferentes municípios do Estado do Espírito Santo, sendo estes: Santa Maria de Jetibá (10/30), Colatina (6/30), Santa Teresa (3/30), Domingos Martins (2/30), Itaguaçu (2/30), Laranja da Terra (2/30), Marilândia (2/30), Baixo Guandu (1/30), Governador Lindenberg (1/30), e São Roque do Canaã (1/30) (Figura 1). A densidade média das granjas nas fases amostrais eram de 0,045m²/kg de peso vivo.

Amostras de fezes dos animais foram coletadas com auxílio de espátulas e suabes retais. Foram feitos pools de fezes de 3 a 5 animais em fase de crescimento/terminação (61 a 140 dias de vida) e estas acondicionadas em potes plásticos, limpos e desinfetados com álcool 70% p/p e mantidas em caixas isotérmicas para transporte. As amostras foram armazenadas em freezer (-21°C) até o momento do envio para o laboratório. O tempo máximo de espera para análise das amostras foi de três meses. O tempo de transporte ao laboratório foi inferior à 18h.

Foi aplicado questionário epidemiológico nas granjas para identificação dos fatores de risco, onde se obteve informações sobre: assistência médico veterinário, número de animais na granja, sistema de criação, finalidade da produção, fonte de água, destino dos dejetos,



Figura 1. Representação do mapa do Espírito Santo, com destaque aos municípios que possuíam suinoculturas amostradas na região Centro-Serrana.

destino dos cadáveres, reposição de animais, controle sanitário, tipo de alimentação e, controle e registro de entrada de pessoas e veículos.

A ração utilizada nas suinoculturas era à base de milho e farelo de soja e eram adicionados antimicrobianos na mistura da ração. Em 23 granjas (76,67%) era utilizado um produto comercial a base de tiamulina (100mg/kg) e em 7 granjas (23,33%) era utilizado outro produto comercial a base de doxiciclina (190mg/kg).

As amostras foram submetidas à análise por qPCR (PCR em Tempo Real), em laboratório comercial, em triplicata para identificação de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. Foram adicionados 4 controles negativos para monitorar exposição à falsos positivos no ensaio, e 2 controles positivos de amplificação obtidos de amostras positivas a campo.

As amostras passaram inicialmente por lise celular utilizando o reagente Prep(NewGene®), em seguida procedeu-se a extração de ácidos nucleicos utilizando os reagentes Preamp(NewGene®). Após extração, realizou-se as amplificações com reagentes específicos para *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* (BPamp e BHamp) (NewGene®), seguindo recomendações do fabricante, com metodologia in house.

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

Após centrifugação, foi obtido um pellet de sílica, que passou por lavagens sucessivas com Tris HCl (0,1 M) e solução de etanol 75%. Após as lavagens adicionou-se 50 µL de solução de eluição (Tris 10 mM e EDTA 1 mM), finalizando a extração com o vortex. Os microtubos foram mantidos em geladeira (2 à 5°C), até o momento para utilização na amplificação.

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

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

A placa foi acondicionada no termociclador Minicycler de qPCR, identificando as amostras, NTCs (controle negativo de amplificação) e Standards (controles positivos de amplificação). Utilizou-se os seguintes corantes: FAM como Reporter e IOWA BLACK FQ (None) como Quencher. Iniciou-se o programa com 1 ciclo (1 repetição) de desnaturação inicial de 95°C por

3 minutos. Depois, 40 ciclos (40 repetições) de desnaturação de 95°C por 20 segundos. Ocorreu o anelamento de primers a 55°C por 40 segundos e extensão de 72°C por 60 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 3 minutos.

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

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

RESULTADOS

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

Todas as granjas estudadas eram familiares, os suínos eram criados em galpões de alvenaria, não utilizavam água clorada e não possuíam controle de entrada de pessoas e veículos. Com relação à assistência médico-veterinária, 27 granjas (90%) possuíam assistência. Apenas duas granjas (6,67%) não possuíam ciclo completo, as quais eram somente unidade produtora de leitões. Com relação a manejo de resíduos, 12 propriedades (40%) utilizavam composteira para dejetos e 18 (60%) fossa. Vinte e

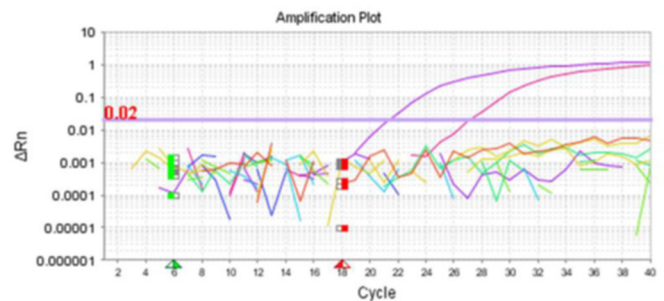


Figura 2. Curvas de amplificação obtidas na análise de *Brachyspira pilosicoli*, pela técnica de PCR em Tempo Real, a partir de fezes de suínos com diarreia.

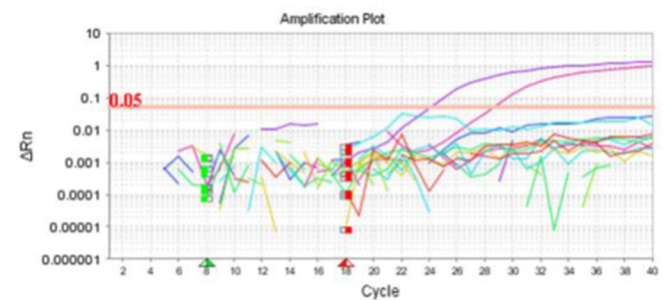


Figura 3. Curvas de amplificação obtidas na análise de *Brachyspira hyodysenteriae*, pela técnica de PCR em Tempo Real, a partir de fezes de suínos com diarreia.

nove propriedades (96,7%) introduziam animais de outras propriedades para reposição do plantel.

As granjas da Região Centro-Serrana do Espírito Santo se caracterizam por possuírem baixa densidade animal (0,045m²/kg de peso vivo), e por se enquadrarem como granjas de pequeno porte, já que em nenhuma a quantidade de matrizes ultrapassava o total de 50 fêmeas reprodutoras e o número total de suínos alojados por granja nunca era superior a 180 animais.

DISCUSSÃO

Em três estudos conduzidos no Brasil, por Baccaro et al. (2003), Viott et al. (2013) e Oliveira-filho et al. (2010), com uso da PCR, observou-se uma frequência baixa dos agentes *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*. Baccaro et al. 2003 analisaram granjas comerciais de vários estados brasileiros (São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás) e a frequência foi de 1,4% de amostras positivas para *B. hyodysenteriae*, e 1% para *B. pilosicoli*.

Do mesmo modo, Viott et al. 2013 em estudo conduzido em rebanhos de Minas Gerais, observaram positividade de 0,04 % para a *B. pilosicoli*, a qual foi diagnosticada em dois rebanhos dos 46 analisados, não sendo encontrado nenhum rebanho avaliado positivo para *B. hyodysenteriae*. Já Oliveira-Filho et al. (2010) no Mato Grosso, também observaram frequência relativamente baixa, sendo a *B. hyodysenteriae* observada em 3,40% das amostras.

Segundo Menin et al. (2008) a variação na prevalência dos enteropatógenos nos rebanhos suínos pode estar associada ao manejo, eficácia da infeciosidade dos agentes, capacitação gastrointestinal, ao sistema imunitário do rebanho, nutrição, planejamento de vacinação, uso de antibióticos e aos fatores que promovem o estresse.

No presente estudo, as granjas utilizavam antimicrobianos na ração e o uso de antimicrobianos preventivamente na ração pode mascarar a doença e dificultar seu diagnóstico (Stahl et al. 2011).

Barcellos et al. (2003), no Rio Grande do Sul, verificaram isolamentos de *B. hyodysenteriae* de 0% e de *B. pilosicoli*, 12,5%, em granjas que usavam antimicrobianos na alimentação dos leitões. Já nas granjas não medicadas o resultado foi superior, sendo 31,8% e 45,5% a frequência de isolamentos, respectivamente.

O tempo de espera para processamento das amostras (até 3 meses) pode ter influenciado na detecção do patógeno. No entanto, Zmudzki et al. (2012) recomendam kits comerciais para isolamento de DNA quando há necessidade de arma-

zenamento a longo. Outra justificativa para a não detecção dos microrganismos pela PCR seria danos causados ao genoma bacteriano ou quantidade insuficiente de DNA na amostra fecal (Boye et al. 2001). Komarek et al. (2009) afirmam que casos com pequena quantidade de bactérias são melhores diagnosticados em cultura.

As granjas estudadas não adotavam normas de biossegurança, deste modo esperava-se que o gênero *Brachyspira* fosse detectado nos leitões com diarreia, fato que não ocorreu. Por outro lado, estas condições sanitárias também favorecem a ocorrência de outros agentes infecciosos, como *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium*, circovírus suíno tipo 2 (PCV2), *Escherichia coli*, comuns na suinocultura comercial no Brasil e em outros países (Baccaro et al. 2003, Suh & Song 2005, Neef, 1993, Jacobson et al. 2003).

Um fator que também pode ter contribuído para a não detecção de *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* é a localização das granjas, uma vez que o estado do Espírito Santo não se encontra nas principais regiões criadoras de suínos do Brasil (IBGE 2015). Nas regiões com maior densidade de unidades produtoras de suínos as condições de transmissão das doenças são mais propícias, devido à proximidade das unidades produtoras, presença de rodovias com grande fluxo de caminhões, além da circulação de agentes patogênicos entre granjas próximas (Hampson & Trott 2006, Thomson et al. 1998).

CONCLUSÃO

Brachyspira hyodysenteriae e *Brachyspira pilosicoli* não foram identificadas em suínos com sinais clínicos de diarreia, na região Centro-Serrana do ES, através da técnica qPCR, mesmo com condições propícias de baixa biossegurança das suinoculturas, indicando que estes agentes não são importantes causadores de diarreia nesta região, no período avaliado. O pequeno porte dessas granjas e a baixa densidade de unidades produtoras no ES, aliados ao uso de antimicrobianos na ração podem ter interferido na identificação dos agentes investigados.

REFERÊNCIAS

- Baccaro M.R., Moreno A.M., Shinya L.T. & Dotto D.S. Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finishing pigs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:225-229, 2003.
- Barcellos D.E.S.N., Razia L.E. & Borowski S.M. Ocorrência e identificação de espiroquetas intestinais em suínos em granjas de porte industrial de duas regiões criatórias do estado do Rio Grande do Sul, em relação à medicação da ração. *Ciência Rural*, 33:725-729, 2003.
- Boye M., Baloda S.B., Leser T.D. & Moller K. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Veterinary Microbiology*, 81:33-40, 2001.

- Chandler Y., Pirmus A., Oliveira S. & Gebhart C.J. Phenotypic and molecular characterization of novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hamptonii*". *Journal of Veterinary, Diagnostic, Investigation*, 24:903-910, 2012.
- Clothier K.A., Kinyon J.M., Frana T.S., Naberhaus N., Bower L., Strait E.L. & Schwartz K. Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23:1140-1145, 2011.
- Guedes R.M.C. & Barcellos D.E.S.N. Disenteria Suína, p.128-134. In: Barcellos D.E.S.N. & Sobestiansky J. (Eds), *Doenças dos suínos*. Canone, Goiânia, 2012.
- Hampson D.J. Swine dysentery, p.680-689. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds), *Diseases of Swine*. 10th ed. Blackwell Publishing, Ames, 2010.
- Hampson D.J. & Trott D.J. Spirochetel Diarrhea/Porcine Intestinal Spirochetosis, p.553-562. In: Straw B.E. & Zimmerman J.J. (Eds), *D'allaires, S. Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Ames, 2006.
- IBGE. *Estatística da produção pecuária, março de 2015*. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Abate de Animais. Brasil, 2015, p.14-27.
- Jacobson M., Hård A.F., Segerstad C., Gunnarsson A., Fellström C., Klingenberg K.V., Wallgren P. & Jensen-Waern M. Diarrhea in the growing pig - a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Research in Veterinary Science*, 74:163-169, 2003.
- Kennedy M.J., Rosnick D.K. & Ulrich R.G. Association of *Treponema hyodysenteriae* with Porcine Intestinal Mucosa. *Journal of General Microbiology*, 134:1565-1576, 1988.
- Komarek V., Maderener A., Spargser J. & Weissenböck H. Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pigs with miscellaneous chronic diseases. *Veterinary Microbiology*, 134:311-317, 2009.
- La T., Collins A.M., Phillips N.D., Oksa A. & Hampson D.J. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 42:284-288, 2006.
- McOrist S. Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Journal*, 170:8-9, 2005.
- Menin A., Reck C., Souza D., Klein C. & Vaz E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. *Ciência Rural*, 38:1687-1693, 2008.
- Neef N. Non-specific colitis in the growing pig: literature review. *Revue Médicine Veterinaire*, 169:675-684, 1993.
- Oliveira-Filho J.X., Paula D.A.J., Oliveira J.T., Silva M.C., Silva G.F.R., Nakazato L. & Dutra V. Ocorrência de *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* e *Salmonella* sp. em suínos com diarreia na região norte do Estado do Mato Grosso. *Archives of Veterinary Science*, 15:218-223, 2010.
- Stahl M., Kokotovic B., Hjulstager C.K., Breum S.O. & Angen O. The use of quantitative PCR for identification and quantification of *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis* and *Escherichia coli* fimbrial types F4 and F18 in pig feces. *Veterinary Microbiology*, 151:307-314, 2011.
- Suh D.K. & Song J.C. Prevalence of *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae*, and *Salmonella* in swine Herds. *Journal of Veterinary Science*, 6:289-293, 2005.
- Thomson J.R., Smith W.J. & Murray B.P. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Veterinary Record*, 142:235-239, 1998.
- Viott A.M., Lage A.P., Cruz Junior E.C.C. & Guedes R.M.C. The prevalence of swine enteropathogens in Brazilian grower and finish herds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:145-151, 2013.
- Zmudzki J., Szczotka A., Podgórska K., Nowak A., Grzesiak A., Dors A. & Pejsak Z. Application of real-time PCR for detection of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira hyodysenteriae* in fecal samples from pigs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15:267-273, 2012.