

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE AMOSTRAS DE *BRACHYSPIRA
PILOSICOLI* ATRAVÉS DE TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS
CONVENCIONAIS E POR IMUNOHISTOQUÍMICA.**

FABIANA BEATRIZ PAULOVICH

**PORTO ALEGRE
2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE AMOSTRAS DE *BRACHYSPIRA*
***PILOSICOLI* ATRAVÉS DE TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS**
CONVENCIONAIS E POR IMUNOHISTOQUÍMICA.

Autor: Fabiana Beatriz Paulovich
Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Patologia
Orientador: Dr. David Emílio
Santos Neves de Barcellos.

Porto Alegre

2003

DEDICATÓRIA

Dedico a:

Jesus e a Agustina.

A meus pais, Juana e Ruben.

A meus irmãos, Ariel e Gisela,

AGRADECIMENTOS

Meu reconhecimento:

Às autoridades da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por me haver recebido e permitido a realização do presente trabalho de pesquisa em sua Unidade Acadêmica.

Às autoridades da Universidade Nacional de La Plata (UNLP), por haver me proporcionado a oportunidade de realizar esse estudo de pós-graduação no exterior.

Meus agradecimentos:

Ao Dr David Barcellos, pela sua dedicação e paciência.

Ao Dr. David Driemeier, por seu calor humano e seu tempo.

Ao Luis Eduardo Razia, meu companheiro de Mestrado, pela enorme colaboração e dedicação no trabalho experimental.

Ao pessoal do Instituto de Pesquisas Veterinárias “Desiderio Finamor”, em especial a Dra. Sandra Maria Borowski no laboratório de Patologia Suína e ao Dr. Augusto Cesar Cunha, Diretor do CPVDF, pelo apoio na realização dos trabalhos experimentais,

Aos docentes, técnicos e alunos do Setor de Patología Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pela ajuda prestada ao longo de todo esse tempo.

Aos docentes, técnicos e alunos do Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pelo apoio constante .

A Ana Ondina Wallwitz de Araújo, pelo seu apoio.

A Caroline Pescador por seu competente trabalho de laboratório.

A Soledad Gomar pelo apoio moral e espiritual durante o tempo que compartilhamos em Porto Alegre.

Aos Drs. Eduardo Juan Gimeno e Enrique Leo Portiansky, da disciplina de Patología Geral Veterinaria da UNLP, local onde trabalho, por propocionar-me a possibilidade de realizar esse trabalho.

A meus companheiros de trabalho na cadeira de Patología Geral Veterinária, por sua amizade e paciência.

A Laura Paoli, por sua vontade de ajudar e boa vontade.

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar diferenças na patogenicidade de 19 cepas de *B. pilosicoli* isoladas de casos de diarreia em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. Foi utilizado o modelo experimental em pintos de um dia, que possui boa eficiência quando usado para a infecção oral com a *B. pilosicoli*, pois permite a consistente colonização cecal dos animais inoculados. Através dessa infecção experimental, buscou-se estabelecer diferenças de patogenicidade entre cepas de referência da *B. pilosicoli* e cepas dessa espécie isoladas previamente de casos de diarreia em leitões no Rio Grande do Sul. Foram inoculadas 21 cepas de origem suína e duas cepas controle (uma a referência da espécie, P43/6/78 e um isolado humano, P16). Os animais foram inoculados por via oral com uma suspensão de bactérias vivas multiplicadas em meio líquido, num inóculo de 0,8 mL contendo 1×10^6 espiroquetas na fase logarítmica de crescimento. Decorridos 21 dias após a infecção experimental, os animais foram sacrificados e os cecos fixados em formalina 10% tamponada, processados para exame histológico e os cortes examinados através da coloração pela prata e com uma técnica imunohistoquímica. Com o uso da coloração pela prata, 65% dos animais mostraram colonização pela *B. pilosicoli* do epitélio do cecal. Houve diferenças no tipo de colonização, consistindo de aderência contínua, aderência focal ou presença de bactérias livres na luz intestinal. Com a técnica de imunohistoquímica, 76,2% das cepas mostraram colonização. Dessa forma, concluiu-se que a imunohistoquímica foi superior à coloração pela prata para a avaliação da colonização intestinal dos pintos, pois foi capaz de detectar 11,2% de cepas colonizadoras a mais do que a coloração pela prata. Um segundo experimento visou avaliar a transmissão horizontal da infecção por *B. pilosicoli*. Para tal, foram mantidos em contato na mesma gaiola, pintos inoculados com a bactéria e animais chamados “contatos”, não inoculados. Com o uso da coloração pela prata, 23,8 % apresentaram-se positivos e, pela imunohistoquímica, 54,2 % foram positivos. Aqui também a imunohistoquímica revelou-se mais eficiente do que a coloração pela prata. Como conclusão desse experimento, as cepas de campo analisadas mostraram alta capacidade de difusão horizontal. Um achado inesperado foi a presença de figuras alongadas dentro do citoplasma das células epiteliais cecais entre alguns animais inoculados. Essas estavam presentes em 33,3 % das cepas, quando analisadas através da coloração pela prata. Pelos dados obtidos, não foi possível concluir que as figuras fossem *Brachyspira pilosicoli*, pois poderia tratar-se de outra bactéria intracelular ou artefato. Entretanto, como recentemente (no ano de 2003) foi realizado o primeiro registro por microscopia eletrônica de um achado de *Brachyspira* spp. intracelular, esse achado poderia significar uma alta capacidade invasiva entre as cepas analisadas. Novos estudos serão realizados e, caso comprovado, esse fato poderia auxiliar em muito o entendimento da patogenia da infecção pela *B. pilosicoli*, pouco clara até o momento.

Foi utilizado o modelo experimental em pintos de um dia, que possui boa eficiência quando usado para a infecção oral com a *B. pilosicoli*, pois permite a consistente colonização cecal dos animais inoculados. **ABSTRACT**

The objective of the present work was to evaluate differences in pathogenicity among 19 strains of B. pilosicoli isolated from cases of diarrhea in pigs in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. A one-day old chick model was used. It shows a good efficiency when used for oral infection with B. pilosicoli, because enables consistent infection and cecal colonization in the infected animals. Using this type of experimental infection, we tried to establish differences in pathogenicity between reference strains of B. pilosicoli and strains of this species previously isolated from cases of diarrhea in pigs in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Twenty one swine strains isolated in Brazil and two control strains (the reference strain of the species, P43/6/78, and one human isolate, P16) were inoculated. The animals were orally inoculated with a suspension of live bacteria multiplied in liquid medium, in an inoculum of 0,8mL, containing 1×10^6 spirochetes in the logarithmic phase of growth. Twenty one days after inoculation, euthanasia was conducted and the cecum was fixed in 10% formalin, processed for histology and examined using silver staining and immunohistochemistry. With silver staining, 65% of the B. pilosicoli strains were shown to colonize the epithelium of the cecum. There were different types of colonization, consisting of continuous adherence, focal adherence or presence of free bacteria in the intestinal lumen. Using histochemistry, 76,2% of the strains showed colonization. It was concluded that immunohistochemistry was more efficient than silver staining in order to assess intestinal cecal colonization in the one-day old chick model, because it was able to detect 11,2% strains higher than silver staining. The objective of the second experiment was to evaluate the horizontal transmission of B. pilosicoli. To assess it, non-inoculated chicks ("contacts") were kept in the same cage together with inoculated ones. Using silver staining, 23,8% showed positive colonization, and by immunohistochemistry 54,2% were positive. In this experiment, the immunohistochemistry technique also showed more efficient result than silver staining. The conclusion of this experiment was that field strains showed a high capacity of horizontal spread. An unexpected finding was the presence of elongated intracellular figures inside the cytoplasm of epithelial cells in some inoculated chicks. They were present in cells inoculated with 33,3% of the strains, when observed through silver staining. Using the present data, we could not conclude that it represented B. pilosicoli invasion, because it could be another intracellular bacteria or an artifact. However, recently (in 2003) the first report of intracellular infection with B. pilosicoli was published, diagnosed by electronic microscopy. If confirmed with the strains assessed in the present work, it could mean an unanticipated high invasive capacity among them. New studies will be carried out, and this finding could help to advance in the understanding of the pathogenesis of B. pilosicoli infection, unclear up to now.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1- Diferenciação de cinco grupos de espiroquetas intestinais suínas pelo padrão de hemólise em ágar sangue, reações bioquímicas e utilização de açúcares.....13
- TABELA 2- Características das *Brachyspira* spp. intestinais dos suínos.....13

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|---|----|
| FIGURA 1- | Morfologia serpentiforme e extremidade pontiaguda típica da <i>Brachyspira pilosicoli</i> | 12 |
| FIGURA 2- | Aspecto do alojamento individual dos lotes de pintos nas gaiolas..... | 19 |
| FIGURA 3- | Aspecto da seringa usada para inoculação oral dos pintos..... | 21 |
| FIGURA 4- | Critério para interpretação da colonização pela <i>B. pilosicoli</i> de acordo com a coloração pela prata e pela imunohistoquímica..... | 22 |
| FIGURA 5- | Ceco de pinto inoculado com <i>B. pilosicoli</i> . Hiperemia visível através da serosa..... | 25 |
| FIGURA 6- | Presença de figuras alongadas paralelas, no interior do citoplasma das células da glândula do intestino grosso de pintos inoculados com <i>B. pilosicoli</i> | 26 |
| FIGURA 7- | Ceco de ave com aderência de bactérias, formando a falsa borda em escova..... | 27 |
| FIGURA 8- | Ceco de ave com um desprendimento focal das espiroquetas pelo processamento histológico..... | 27 |
| FIGURA 9- | Mucosa do ceco apresentando aspecto fusionado das vilosidades com aderência de bactérias..... | 28 |
| FIGURA 10- | Ceco de ave, aderência focal de espiroquetas no epitélio..... | 28 |
| QUADRO 1- | Resultado do exame microscópico de cortes de cecos de pinto inoculados com <i>B. pilosicoli</i> e em animais contatos, corados pela prata..... | 29 |
| QUADRO 2- | Resultado do exame microscópico de cortes de cecos de pintos inoculados com <i>B. pilosicoli</i> e em animais contatos, submetidos à técnica de imunohistoquímica. | 33 |
| QUADRO 3- | Resumo dos achados nos exames de coloração pela prata e por imunohistoquímica..... | 34 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 12 |
| 2.1 | Caracterização taxonômica e características morfológicas e culturais da <i>Brachyspira pilosicoli</i> | 12 |
| 2.2 | Epidemiologia | 14 |
| 2.3 | Patogenia e colonização | 15 |
| 2.4 | Quadro clínico..... | 17 |
| 2.5 | Lesões macroscópicas..... | 16 |
| 2.6 | Lesões histológicas..... | 17 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 19 |
| 3.1 | Local e período..... | 19 |
| 3.2 | Animais experimentais, instalações e manejo..... | 19 |
| 3.3 | Cepas bacterianas usadas e infecção experimental..... | 20 |
| 3.4 | Exames histológicos..... | 21 |
| 3.5 | Exames imunohistoquímicos..... | 23 |
| 3.5.1 | Obtenção do anticorpo primário..... | 23 |
| 3.5.2 | Seleção dos materiais submetidos ao teste de imunohistoquímica..... | 23 |
| 4 | RESULTADOS..... | 25 |
| 4.1 | Achados macroscópicos gerais..... | 25 |
| 4.2 | Achados microscópicos gerais..... | 26 |
| 4.3 | Detecção da bactéria através da coloração pela prata..... | 27 |
| 4.4 | Detecção da bactéria através da imunohistoquímica..... | 32 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 35 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 39 |
| | REFERÊNCIAS..... | 40 |
| | ANEXO A - Avaliação da patogenicidade de amostras de <i>Brachyspira pilosicoli</i> isoladas de casos de diarreia em suínos..... | 44 |

1. INTRODUÇÃO

A *Brachyspira (B) pilosicoli* é o agente da colite espiroquetal (CE), uma doença infecciosa dos suínos que ocorre principalmente nas fases de recria e terminação. A infecção provoca uma forma de colite não hemorrágica, sendo que os sintomas de diarreia, perda de peso e piora da conversão alimentar são menos severos do que os presentes na disenteria suína (DS), doença causada pela *Brachyspira (B) hyodysenteriae*.

A colite espiroquetal e a disenteria suína se encontram disseminadas entre os maiores países produtores de suínos no mundo. No Brasil, é muito frequente a ocorrência de diarreia em leitões na fase de crescimento e terminação e a maioria quase absoluta dos casos clínicos acaba sendo diagnosticada clinicamente como infecção por *Lawsonia (L.) intracellularis* (“Enteropatia Proliferativa dos Suínos” ou “Ileíte”). Esta pode ser uma conclusão equivocada, pois no trabalho de Barcellos *et al.* (2000b) espiroquetas fracamente β hemolíticas foram isoladas de 7,2 % entre 319 amostras de fezes coletadas de leitões com diarreia em 10 granjas no Estado do Rio Grande do Sul. Existem outros registros pontuais de casos clínicos de infecções causadas por espiroquetas no nosso meio; pela *B. hyodysenteriae* no RS (Disenteria Suína) (BARCELLOS, 1978; BARCELLOS *et al.*, 1995) e por autores no Estado do Paraná (WARTH *et al.*, 1985).

Até recentemente, não havia sido detectada no Brasil a infecção pela *B. pilosicoli*. Barcellos *et al.* (2000a) estudaram a importância relativa de espécies de *Brachyspira* como causadoras de problemas de diarreia em granjas de suínos em áreas de criação intensiva do Estado do Rio Grande do Sul. O exame de 206 materiais (“swabs” retais) coletados de suínos com diarreia, em 17 granjas que não usavam rações adicionadas de antimicrobianos, permitiu o isolamento de espiroquetas em todas. Espécies patogênicas estavam presentes em 13 das 17 granjas e as outras 4 apresentavam apenas espécies comensais. Entre as fezes coletadas, as espécies patogênicas (*B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*) foram isoladas de 49/206 (23,8%) das amostras. Esses dados sugerem a importância do agente em nosso meio e indicam a necessidade de que as infecções espiroquetais sejam incluídas no diagnóstico diferencial das diarreias prevalentes nas fases de recria e terminação.

Os trabalhos realizados até o momento pelo grupo da Faculdade de Veterinária da UFRGS (BARCELLOS *et al.*, 2000a; BARCELLOS *et al.*, 2000b; BARCELLOS *et*

al., 2000c; BARCELLOS, 2001) envolveram a recuperação da bactéria por cultivos em meios sólidos incubados em jarras de anaerobiose, usando meios seletivos e a classificação dos isolados através de técnicas fenotípicas e genotípicas. A metodologia para diagnóstico das infecções por *Brachyspira* spp. são de alto custo e complexas, além disso determinam um número alto de resultados falso- negativos e a obtenção dos resultados pode levar um longo tempo (até 40 dias). Todos esses problemas fazem com que dados sobre a real taxa de prevalência e significação da infecção em nosso meio e em vários países do mundo sejam pouco conhecidos.

Existem poucas técnicas disponíveis para a avaliação da patogenicidade de cepas *B. pilosicoli*. O modelo da inoculação experimental em suínos apresenta resultados bastante erráticos, determinados principalmente por diferenças nos receptores de ligação para a bactéria na membrana celular dos enterócitos intestinais de diferentes leitões. Além disso, animais com diferentes graus de imunidade contra *Brachyspira* spp. podem mostrar variações de suscetibilidade. Nosso objetivo com o presente trabalho foi o de avaliar os diferentes graus de patogenicidade de distintas cepas de *Brachyspira pilosicoli* isoladas de granjas no Estado do Rio Grande do Sul. O modelo de infecção de pinto e a avaliação da colonização cecal, que já mostrou eficiência em trabalhos anteriores (DWARS *et al.*, 1992; TROTT *et al.*, 1995; TROTT, HAMPSON, 1998), será utilizado para esse fim. O uso da técnica de imunohistoquímica em tecidos coletados após a inoculação experimental de pintos permitirá avaliar simultaneamente a adequação dessa técnica para o uso em diagnóstico e para estudar aspectos da patogenia da infecção, marcando o agente e distinguindo o mesmo de outras bactérias da microbiota intestinal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização taxonômica e características morfológicas e culturais da *Brachyspira pilosicoli*

Até o final da década de 70, todas as espiroquetas intestinais β hemolíticas (EIBH) presentes no intestino dos suínos eram consideradas “não patogênicas”. Posteriormente, Taylor *et al.* (1980) sugeriram que EIBH poderiam estar associadas com diarréias não fatais em suínos na fase de crescimento. Em trabalhos posteriores, Duhamel *et al.* (1996) determinaram que as EIBH associadas com uma determinada forma de infecção intestinal em suínos (denominada por eles de “colite espiroquetel”) eram diferentes das outras espécies do gênero, mas apresentavam algumas características fenotípicas em comum com espécies apatogênicas (denominadas então *Serpulina (S.) innocens* e *S. murdochii*). Os autores propuseram o nome *Serpulina pilosicoli* para descrever a espiroqueta fracamente beta hemolítica patogênica. A nova espiroqueta tinha a capacidade de aderir às células epiteliais do intestino grosso, sendo que a colonização pela massa bacteriana seria capaz de reduzir a eficiência da absorção e causar a diarréia mucóide, característica da colite espiroquetel (DUHAMEL *et al.*, 1996).

Mais recentemente, foram realizados estudos moleculares usando o sequenciamento do DNA codificador do RNA ribossomal (16S rRNA) e os resultados permitiram o reposicionamento das amostras de *S. pilosicoli* no gênero *Brachyspira*, levando à unificação dos gêneros *Serpulina* e *Brachyspira* (OCHIAI *et al.*, 1997).

A *B. pilosicoli* apresenta 4 a 7 flagelos inseridos sub-terminalmente a cada lado de um cilindro protoplasmático central. A célula possui um diâmetro entre 0.19 a 0.30 μ , comprimento entre 2 a 11 μ e a extremidade apresenta-se pontiaguda (TAYLOR *et al.*, 1980; SELLWOOD *et al.*, 1997), Figura 1.



Figura 1: Morfologia serpentina e extremidade pontiaguda, típica da *Brachyspira pilosicoli*.

Nas espiroquetas intestinais, o número de flagelos varia entre os gêneros e espécies. A *B. pilosicoli* é uma espiroqueta que se cora como Gram-negativa, é anaeróbica, tolerante a até 1% de oxigênio e produz uma zona de β hemólise quando cultivada em meio de cultura contendo sangue (JOHNSTON *et al.*, 1999). A tabela 2 mostra os 5 grupos de espiroquetas intestinais de suínos reconhecidos por técnicas fenotípicas como a utilização de açúcares, reações bioquímicas e padrão de hemólise em ágar sangue.

Tabela 1 - Diferenciação de cinco grupos de espiroquetas intestinais suínas pelo padrão de hemólise em ágar sangue, reações bioquímicas e utilização de açúcares.

| Teste | <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> | <i>Brachyspira intermedia</i> | <i>Brachyspira innocens</i> | <i>Brachyspira murdochii</i> | <i>Brachyspira pilosicoli</i> |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| *PFN | 16-24 | 16-28 | 16-28 | 16-28 | 08-12 |
| Hemólise | Forte | Fraca | Fraca | Fraca | Fraca |
| Indol | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Hipurato | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |
| Celobiose | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| L-fucose | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| D-galactose | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Variável |
| D-ribose | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |

*PFN, número de flagelos periplasmáticos por célula.

Fonte: Barcellos (2000)

A Tabela 2 apresenta as principais características das *Brachyspira* spp. presentes no intestino de suínos.

Tabela 2 - Características das *Brachyspira* spp. intestinais dos suínos

| ESPIROQUETA | ORIGEM | RELAÇÃO COM O HOSPEDEIRO | LOCALIZAÇÃO NO INTESTINO |
|--------------------------|--|--------------------------|--|
| <i>B. hyodysenteriae</i> | Fezes e conteúdo do cólon de suínos com disenteria suína | Patógeno | Muco sobre o epitélio, espaços intraepiteliais |
| <i>B. pilosicoli</i> | Fezes de suínos, outros animais e seres humanos com diarreia | Patógeno | Aderida ao epitélio intestinal |
| <i>B. innocens</i> | Fezes de suínos sadios | Comensal | Superfície das células epiteliais |
| <i>B. intermedia</i> | Fezes de suínos e aves sadias e com diarreia | Provável patógeno | Desconhecido |
| <i>B. murdochii</i> | Fezes de suínos sadios | Comensal | Desconhecido |
| <i>B. alvinipulli</i> | Fezes de aves com diarreia | Patógeno | Aderida ao epitélio intestinal |

Fonte: Barcellos (2000)

2.2 Epidemiologia

A colite espiroquetal em suínos já foi diagnosticada em todos os principais países que se dedicam à suinocultura (HARRIS, LYSONS, 1992). A infecção dos leitões ocorre mais freqüentemente na fase imediatamente posterior à transferência dos animais entre as creches e recrias. Os fatores predisponentes capazes de explicar esse aumento de ocorrência seriam o estresse que se segue à movimentação entre a creche e recria, alojamento em ambiente pior do que o da creche e mistura de animais infectados (excretadores sadios) e não infectados (sem defesa imunitária) (BARCELLOS, 2000).

Com relação à infecção humana, a colonização do trato intestinal geralmente tem sido descrita em países africanos e entre aborígenes australianos (LEE, HAMPSON, 1992; LEE *et al.*, 1993). Para a sociedade ocidental, a doença se limita quase que exclusivamente a grupos de indivíduos imunodeprimidos e homossexuais. Com base em resultados da hibridação DNA-DNA e eletroforese isoenzimática (multilocus enzyme electrophoresis, MEE), isolados de pacientes humanos demonstraram pertencer ao mesmo grupo genético das espiroquetas responsáveis pela infecção em suínos. Espiroquetas intestinais humanas estreitamente relacionadas à cepa patogênica P43/6/78 (padrão de *B. pilosicoli*) foram usadas para infectar pintos de um dia. Durante os 22 dias que durou o experimento, algumas cepas se mostraram unidas à parede cecal e produziram erosão da mucosa. Este experimento destacou o uso de pintos de um dia como modelo animal no estudo da espiroquetose intestinal (TROTT *et al.*, 1995).

A infecção dos animais ocorre principalmente por contaminação com matéria fecal. Assim, a eliminação de *B. pilosicoli* através das fezes se converte em um aspecto relevante na difusão do agente da CE. Foi sugerido que um período de 21 dias seja requerido para a eliminação da *B. pilosicoli* de um ambiente infectado (BARCELLOS *et al.*, 1999). O período de incubação é de 3 a 20 dias e até 50 % dos leitões expostos à infecção podem ser afetados, com baixa mortalidade (BARCELLOS, 2000). Também são de importância como reservatório os roedores e o movimento de lotes de animais, entre os quais podem se encontrar portadores.

2.3 Patogenia e colonização

A colonização microbiana é um processo complexo, influenciado pelos numerosos fatores regulados pela bactéria e seu hospedeiro original, incluindo: antagonismo bacteriano, genótipo, fisiologia animal e nutrição (KING, KELLY, 2001). A colonização da mucosa por parte das espiroquetas pode ser evidenciada através de exames histopatológicos de rotina, mas a confirmação da infecção por *B. pilosicoli* deve ser feita através da coloração pela prata (HARRISSON, GOSSER, 1979). Foram descritas técnicas mais precisas, utilizando reações imunohistoquímicas com anticorpos monoclonais ou policlonais específicos (THOMAS, SELWOOD, 1992; JOENS *et al.*, 1993). Através destas técnicas, caso ocorra uma reação antígeno-anticorpo, ou seja, o soro hiperimune venha a se unir especificamente à bactéria (*B. pilosicoli*), poderá ser visualizada uma reação enzima-substrato que transformará um cromógeno incolor num produto final colorido.

A patogenia da infecção pela *B. pilosicoli* se relaciona principalmente com a aderência da bactéria na membrana epitelial que se situa logo abaixo das microvilosidades do intestino grosso. Até o momento, é desconhecida a forma precisa dessa ligação. A quimiotaxia das espiroquetas para a mucina da superfície das células epiteliais do intestino parece ser um ponto importante na patogenia da doença. Essas conclusões se baseiam em algumas observações, como a de que espiroquetas apresentam uma eficiente motilidade em meios viscosos, como o muco (CANALE-PAROLA, 1978). A mucina é o principal constituinte do gel mucoso do cólon, consiste basicamente de glicoproteínas, que podem servir como substrato para o crescimento e quimiotaxia da *B. pilosicoli in vitro* (WITTERS, DUHAMEL, 1998). Um outro mecanismo de patogenicidade descrito é a capacidade de transporte de glicose-galactose para o interior da célula, codificada pelo gene *mgIB*. Esse determina a síntese de um produto de expressão que foi proposto como base molecular para uma série de eventos associados com a colonização da mucina, interferindo diretamente com a capacidade da *B. pilosicoli* em causar a infecção intestinal (ZHANG *et al.*, 1998). Estudos comparativos com células cultivadas e em modelos animais sugerem que a união a células epiteliais envolve a relação entre moléculas específicas nas espiroquetas (adesinas) e receptores na célula do hospedeiro (MUNIAPPA *et al.*, 1996,1998, MUNIAPPA, DUHAMEL 1997). A ligação das espiroquetas às células epiteliais não se relaciona apenas com área da borda em escova da superfície epitelial, em casos de colite

espiroquetal. Bactérias foram também observadas invadindo a lâmina própria do intestino de seres humanos (TAKEUCHI *et al.*, 1974), suínos (DUHAMEL, 1997) e cães (DUHAMEL *et al.*, 1996). Mais recentemente, a espiroqueta foi encontrada no interior de enterócitos de frangos com quadro clínico de diarreia (JANSSON, FELLSTRÖM, 2003).

Em diferentes trabalhos, foi possível comprovar variações de patogenicidade entre cepas de *B. pilosicoli*. Por exemplo, no estudo realizado por Trott e Hampson (1998), em que foram utilizadas cepas humanas de *B. pilosicoli* (Gap 401, Rosie 2299) e uma de origem suína (3295), foram demonstradas diferenças nas lesões quando usado o modelo de infecção de pintos de um dia medindo as lesões cecais. Foi também verificado que um grupo de pintos infectados com o isolado Gap 401 apresentava espiroquetas unidas polarmente ao epitélio intestinal em numerosos focos; enquanto que no resto de animais infectados um número maciço de espiroquetas distribuiu-se difusamente em todos os segmentos dos cecos examinados. Outros estudos realizados por Trott *et al.* (1995) e por Dwars *et al.* (1992) mostraram resultados semelhantes. As variações patológicas incluíram o grau de alongamento das criptas, diferenças nos graus de união das bactérias à lâmina epitelial, presença ou ausência de depósitos de eosinófilos e vacuolização da membrana citoplasmática terminal, assim como o grau de alterações presentes na lâmina própria. As variações entre grupos infectados com a mesma cepa foram limitadas ao grau de união ao epitélio. Portanto, pode-se especular que as cepas de *B. pilosicoli* poderiam ser apatogênicas (se fracassarem na colonização); levemente patogênicas (se mostrarem união polar ao epitélio, com lesões, mas sem diarreia) ou altamente patogênicas se apresentarem união e causarem lesões que resultem em diarreia e, possivelmente, em desidratação e emagrecimento (TROTT, HAMPSON, 1998).

2.4 Quadro clínico

Na colite espiroquetal, a diarreia começa 10 a 14 dias após a infecção. Isso geralmente ocorre 2 a 3 semanas após a entrada dos leitões na fase de crescimento (com aproximadamente 20 a 25 kg de peso.). A diarreia é geralmente transitória, ocorrendo cura entre 7 a 10 dias. Leitões muito jovens (com 4 semanas de idade) ou mais maduros (com até 20 semanas de idade) podem mostrar sinais de diarreia. Os sintomas podem

persistir, mas é raro encontrar sinais clínicos em leitões com mais de 20 semanas (JOHNSTON *et al.*, 1999).

Os sintomas da colite produzida pela CE podem passar despercebidos e, no caso de estarem presentes, são difíceis de diferenciar daqueles observados nos estágios tardios da disenteria suína ou da infecção pela *L. intracellularis*. Os primeiros sinais da infecção são: escassa perda de condição corporal, produção de fezes moles com consistência e aspecto semelhante a cimento fresco, evoluindo para diarreia franca dentro de 3 dias. Nas fases iniciais, a temperatura corporal pode subir até 40- 41°C, a diarreia pode variar de cor entre cinza a marrom e a superfície pode apresentar-se brilhante (TAYLOR, TROTT, 1997). As lesões macroscópicas associadas à CE podem ser muito sutis. Entretanto, os animais podem apresentar aspecto de refugo, com a carcaça desidratada e com matéria fecal aderida à região perineal (TAYLOR *et al.*, 1980).

2.5 Lesões macroscópicas

As alterações mais específicas para a infecção pela *B. pilosicoli* são limitadas ao intestino grosso, que se encontra geralmente flácido e com a parede engrossada, em casos iniciais, com edema no mesentério. O conteúdo do intestino é fluido, mas pode se tornar mais denso próximo ao reto (TAYLOR, TROTT, 1997). Ocasionalmente, os danos à mucosa se caracterizam por erosões focais coalescentes, com aderência de partículas de alimento, dando ao mesmo uma aparência de calçamento com paralelepípedos, (JOHNSTON, 1999). Em casos avançados, a mucosa frequentemente encontra-se inflamada, com áreas locais de congestão ou hemorragia e aumento na produção de muco.

2.6 Lesões histológicas

O principal achado histológico de casos de CE é a colonização da superfície do ceco e do cólon por um grande número de espiroquetas, unidas por uma extremidade ao epitélio, formando uma figura que tem sido definida como uma “falsa borda em escova”. As espiroquetas também podem ser encontradas dentro das criptas, assim como entre células epiteliais descamadas e em multiplicação ativa dentro de macrófagos

(TAYLOR, TROTT, 1997). Os principais achados histológicos associados com CE foram descritos por Neef *et al.* (1994) num trabalho experimental em que foram infectados leitões gnotobióticos com diferentes cepas de *Brachyspiras*; entre elas a cepa P 43/6/78. Observou-se engrossamento da lâmina própria em cortes do ceco, associado a um incremento na profundidade das criptas. Acompanhando as alterações, puderam ser evidenciados lesões inflamatórias e danos às células epiteliais. Outras características incluem marcada infiltração neutrofílica da lâmina própria, hemorragia ou hiperemia e dilatação das criptas. Lesões similares foram descritas em pintos inoculados experimentalmente com distintas cepas de *Brachyspira pilosicoli*, por Trott e Hampson (1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e período

O experimento foi conduzido na unidade de isolamento do CPVDF (Centro de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor”) em Eldorado do Sul, RS, no Setor de Patologia e no Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS e na Universidade de La Plata, Buenos Aires, Argentina. O período experimental para cada lote inoculado compreendeu 21 dias (da inoculação à necropsia dos pintos).

3.2 Animais experimentais, instalações e manejo

O experimento foi desenhado para utilizar 132 pintos de um dia de vida, divididos em 22 grupos de 6. Em função da mistura acidental de dois lotes durante o experimento (os inoculados com as cepas SIPV 40/42 e 43), o número alojado passou a ser de 20 lotes de 6 pintos e um de 12. A sala onde as gaiolas foram colocadas possuía aporte de ar filtrado e condicionamento ambiental, permitindo manter a temperatura em torno de 35 graus centígrados. Todas as aberturas foram fechadas para impedir a perda de calor e a umidade foi mantida em 85%. Vinte e quatro a 48h antes de introduzir os animais, a sala e a ante-sala foram esterilizadas. No início do experimento, os animais foram pesados, separados aleatoriamente e cada grupo alojado numa gaiola individual (Figura 2).

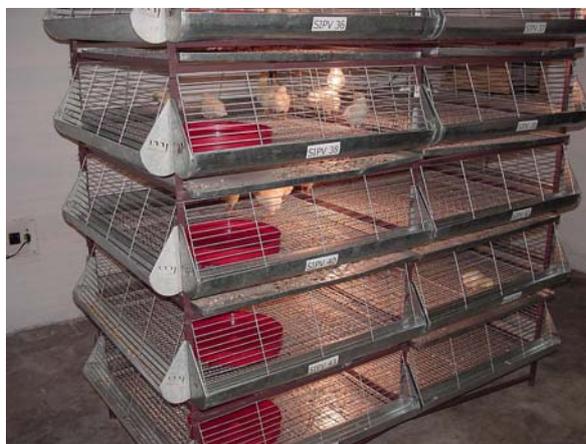


Figura 2: Aspecto do alojamento individual dos lotes de pintos nas gaiolas

Cada grupo experimental constava de 6 animais, 4 inoculados com cada uma das cepas de *B. pilosicoli* e 2 mantidos não inoculados, como contatos. Os animais contatos foram alojados na mesma gaiola dos desafiados, mas com marcação individual vermelha na cabeça para permitir a diferenciação. Nas primeiras 24 horas após o desafio os pintos não receberam ração ou água, para manter o intestino vazio e facilitar a colonização intestinal. A seguir, receberam ração não comercial, sem antibióticos, formulada especialmente para a ocasião. Essa providência explica-se pelo fato de que alimentos comerciais, assim como os seus núcleos, são sistematicamente adicionados de antimicrobianos. A água de bebida e a comida foram fornecidas *ad-libitum* durante o experimento. Os pintos foram examinados diariamente, sendo realizado um exame clínico pela observação visual e analisada a consistência das fezes, segundo os critérios sugeridos por Soncini e Madureira (1998). As gaiolas foram limpas apenas no final do experimento, em função de que a quantidade de fezes acumuladas não justificava a limpeza periódica.

3.3 Cepas bacterianas usadas e infecção experimental

Foram usadas as seguintes cepas bacterianas para infectar os pintos:

- a) P 43/6/78 (ATCC 51139). É a cepa de referência da espécie, de origem inglesa e infecta suínos (TAYLOR, TROTT, 1997). Foi obtida através do Dr. Gerald Duhamel, Department of Veterinary Clinical Studies, Lincoln, Nebraska, USA;
- b) SP16 (ATCC 49776). Infecta seres humanos e é originária dos Estados Unidos da América (DUHAMEL, 2001). Foi obtida através do Dr. Gerald Duhamel, Lincoln, Nebraska, USA;
- c) SIPV 1, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 36, 37, 38, 39, 40/42, 43. Todas foram isoladas de casos de diarreia em suínos e são de origem brasileira (BARCELLOS *et al.*, 2000b). Todas as bactérias estavam conservadas liofilizadas e em refrigeração no CPVDF. Após ressuspensão com solução salina, as cepas foram multiplicadas em agitação (300 g), num meio líquido pré-reduzido esterilizado (Meio de PRAS, KUNKLE *et al.*, 1986) a 37°C, por um período de 5 dias. A titulação do inóculo foi realizada por contagem das células bacterianas em câmara de Neubauer, corrigidas para um título de 1×10^6 células/mL.

Um inóculo de 0,8mL dessa diluição foi fornecido por via oral a 4 de 6 pintos de cada grupo no início do experimento por 3 vezes, a cada 3 horas. Os 2 animais remanescentes de cada grupo foram mantidos como contatos, inoculados simultaneamente com um volume equivalente de meio de cultivo estéril. O inóculo foi fornecido por meio de seringas em cuja extremidade foi adaptada uma sonda de borracha com 5 cm de comprimento, Figura 3.



Figura 3: Aspecto da seringa usada para inoculação oral dos pintos

Decorridos 21 dias da inoculação, os animais foram sacrificados, segundo normas aceitas de eutanásia. No máximo 15 minutos após a eutanásia, foram retirados da porção proximal, medial e distal do ceco fragmentos para a realização de cortes para análise histopatológica pela coloração pela prata e imunohistoquímica. Os materiais foram imediatamente imersos numa solução de formalina tamponada a 10% (PROPHET, 1992). A observação da colonização intestinal pela coloração pela prata foi usada como critério para selecionar os cortes que seriam submetidos à análise imunohistoquímica.

Em função da mistura acidental de dois lotes, como foi referido anteriormente, os grupos formados pelas cepas 42 e 43 foram lidos como pertencendo a um grupo único.

3.4 Exames histológicos

Os tecidos para histologia foram fixados em formalina tamponada a 10% por um mínimo 1 dia antes de realizar-se as desidratações em concentrações crescentes de

álcool partindo de uma concentração de 70%, 90% e três lavagens em álcool absoluto e diafanização em xilol absoluto em duas lavagens. Os materiais permaneciam em cada solução de lavagem por 1 hora. Após eram colocados em parafina aquecida a 60°C por duas horas e depois emoldurados em blocos. A partir dos blocos o tecido era cortado em micrótomo numa espessura de aproximadamente 5 µm e foram montados sobre uma lâmina de microscopia. A partir das mesmas, foi realizada a coloração pela prata pelo método Warthin-Starry (JOHNSON, 1992).

A leitura foi feita em microscópio ótico, com 400 aumentos. Usando esta coloração, as bactérias se coram de marrom escura ou negra e o fundo adquire uma cor dourada, no caso da coloração pela prata. Para a imunohistoquímica, as bactérias se coram amarronzadas utilizando como cromógeno o 3',3' diaminobencidina (DAB). Na leitura, foram considerados os seguintes parâmetros para a presença de *Brachyspira* spp., Figura 4:

Fraço (positivo +);

Moderado (positivo ++);

Acentuado (positivo +++).

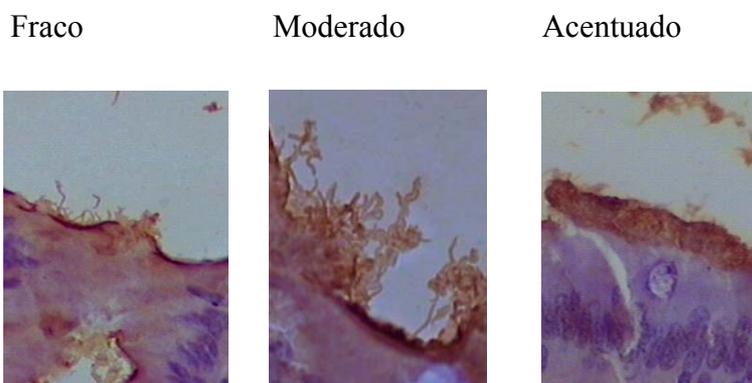


Figura 4 - Critério para interpretação da colonização pela *B. pilosicoli* de acordo com a coloração pela prata e pela técnica imunohistoquímica

3.5 Exames imunohistoquímicos

3.5.1 Obtenção do anticorpo primário

O soro hiperimune policlonal usado para a técnica imunohistoquímica foi produzido através da hiperimunização de coelhos, usando uma técnica padrão previamente descrita (BURROWS, LEMKE, 1981). Inicialmente os coelhos foram inoculados por via intramuscular com uma emulsão aquosa-oleosa obtida com massa de *B. pilosicoli* (padronizadas para a concentração de 1×10^{11} bactérias/ mL pela observação microscópica direta, em câmara de Neubauer) em adjuvante incompleto de Freund (DIFCO). Após 21 dias, foram realizadas três inoculações intravenosas de 1 mL do antígeno aquoso, em dias alternados. Decorridos 14 dias após a última inoculação, os coelhos foram sangrados e o soro obtido armazenado em frascos tipo Falcon e mantido congelado até o uso. A cepa de *B. pilosicoli* usada foi a de referência da espécie (P43/6/78).

3.5.2 Seleção dos materiais submetidos ao teste de imunohistoquímica

De cada grupo de 4 animais inoculados e os dois controle, considerando os resultados da coloração pela prata, foram selecionados 2 a 3 cortes para a realização do método da Streptavidina Biotina Marcada (LSAB), prova da imunohistoquímica, segundo Gimeno *et al.* (2002), seguindo as seguintes etapas:

- a) Os cortes foram desparafinados através de 2 passagens de 10 minutos em xilol; a seguir foram hidratados, por 2 passagens de 5 minutos, em álcool absoluto;
- b) A peroxidase endógena foi inativada por imersão numa solução de água oxigenada (0,6mL) e metanol (19,4 mL);
- c) A hidratação teve continuidade, fazendo 2 passagens por imersão em álcool 96° por 3 minutos cada; 1 passagem em álcool 80° por 3 minutos e 1 passagem por álcool 70°C por 3 minutos;
- d) Foi realizada a lavagem com PBS por 10 minutos; a seguir foi feita a secagem cuidadosa de cada lâmina;
- e) Incubou-se com soro normal e albumina sérica bovina (BSA) durante 15 minutos, após o que se retirou o excesso de soro;

- f) Cobriu-se com anti-soro primário (hiperimune policlonal) durante 30 minutos à temperatura ambiente ou durante toda a noite a 4°C, usando as diluições 1:50, 1:70 e 1:100;
- g) No dia seguinte foram realizadas 3 lavagens com solução salina fosfatada tamponada (PBS) de 5 minutos e cada lâmina foi secada;
- h) Incubou-se com um anticorpo marcado com biotina (anticorpo secundário anti-coelho) durante 10 minutos; lavou-se a seguir com PBS durante 15 minutos e secou-se;
- i) Incubou-se com solução de streptavidina conjugada com peroxidase durante 10 a 20 minutos e lavou-se com PBS durante 15 minutos;
- j) Incubou-se com cromógeno (DAB) durante 2 a 5 minutos; lavou-se com água destilada corrente;
- k) Realizou-se a coloração de fundo com hematoxilina, segundo Allen (1992);
- l) Realizou-se a montagem com resina de cedro, entre lâmina e lamínula.

A leitura foi feita em microscópio ótico, com 400 aumentos. Na leitura, foram considerados os mesmos parâmetros usados para interpretar os cortes corados pela prata, ou seja: fraco (positivo +), moderado (positivo ++) e acentuado (positivo +++), Figura 4.

4. RESULTADOS

4.1 Achados macroscópicos gerais

Durante os 21 dias de duração do experimento, os animais apresentaram comportamento normal, sem presença de sintomas de diarreia ou outras alterações clínicas evidentes. As fezes, através da avaliação visual, não apresentaram alterações significativas de consistência (mostravam aspecto de fezes formadas). No final do experimento, entretanto, os animais apresentavam aspecto significativamente desidratado, diferindo do que seria esperado para o crescimento de pintos saudáveis. Morreram dois animais durante o período experimental, foram necropsiados sem a constatação de lesões entéricas macroscópicas que pudessem ser relacionadas com as bactérias inoculadas.

Na necropsia dos animais inoculados e contatos, foi realizado um exame detalhado dos cecos. A única lesão encontrada foi de escassa hiperemia e presença de algumas sufusões na parte média e distal do órgão, nunca na parte proximal (Figura 5).



Figura 5 - Ceco de pinto inoculado com *B. pilosicoli*.
Hiperemia visível através da serosa.

Essas lesões estavam presentes numa porcentagem reduzida de cecos (2,3%).

4.2 Achados microscópicos gerais

No exame histológico dos cortes de cecos dos pintos cuja inoculação resultou positiva, foi possível observar em todos os casos uma marcada hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais. O número de células inflamatórias na mucosa, principalmente polimorfonucleares e macrófagos presentes nas lâminas foi:

- a) cepas SIPV 1,8,9,12,16,18,20,22,23 e 42/43: fraco;
- b) cepas SIPV 13,15 e 37: acentuado;
- c) cepa SIPV 14: 2 lâminas acentuado e 4 fraco.

Com relação à presença de células inflamatórias na lâmina própria, foi positiva no ceco dos pintos infectados com as cepas SIPV 9,13,14,15. Em todos esses casos, a quantidade foi moderada. Em apenas uma lâmina, que correspondeu à cepa SIPV 12, observou-se descamação e necrose do epitélio intestinal. As outras cepas que haviam mostrado células inflamatórias na mucosa não mostraram reação inflamatória na lâmina própria.

Em dez lâminas que se apresentaram fortemente positivas para a presença de *B. pilosicoli* foram visualizadas figuras alongadas paralelas entre si, no interior das células epiteliais e células glandulares intestinais, compatíveis com espiroquetas, Figura 6. As cepas relacionadas com essa alteração foram SIPV 8,9,13,15,36,43. Entre essas, quatro foram de animais contatos (SIPV 8,12,13,15).

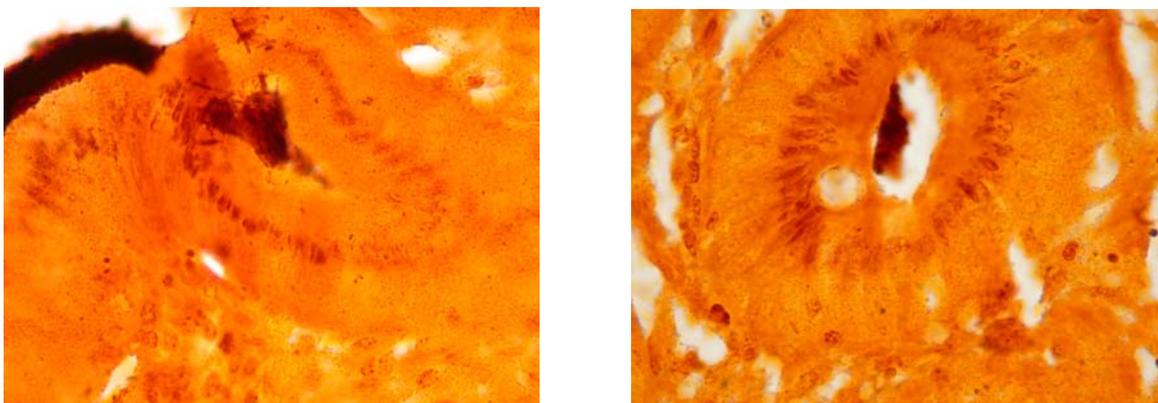


Figura 6- Presença de figuras alongadas paralelas, em forma de paliçada, no interior do citoplasma das células das glândulas do intestino grosso de pintos inoculados com *B. pilosicoli*. SIPV9 e SIPV13. Warthin-Starry, obj. 40.

Outras alterações serão analisadas nos itens seguintes, onde se especifica a técnica utilizada para a detecção da *B. pilosicoli*.

4.3 Detecção da bactéria através da coloração pela prata.

Usando essa coloração foram consideradas negativas 100% das lâminas (cada uma delas se referindo a um animal desafiado) correspondentes às seguintes cepas: P43 e SP16 (usadas como cepas de referência) e SIPV 19,20,36,38,39,40/42.

A colonização do epitélio por espiroquetas formando uma linha no epitélio similar à borda em escova foi observada nas cepas SIPV 9,13,14,15,16,18,22,37,43 de maneira forte. Alguns exemplos da colonização maciça pelas espiroquetas constam nas Figuras 7 a 10.

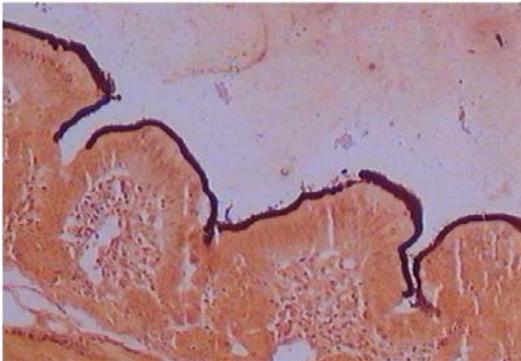


Figura 7- Ceco de ave com aderência de bactérias (SIPV 16), formando a falsa borda em escova..
Warthin Starry, obj. 4

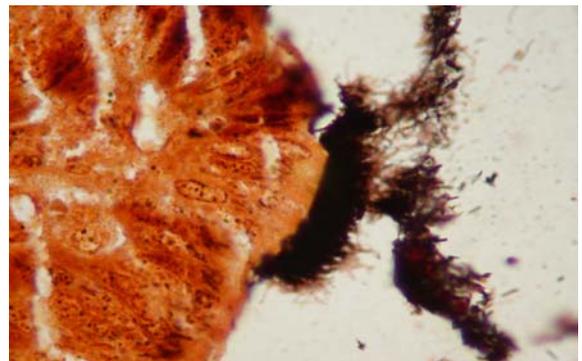


Figura 8- Ceco de ave com desprendimento focal das espiroquetas pelo processamento histológico (SIPV1).
Warthin Starry, obj. 4

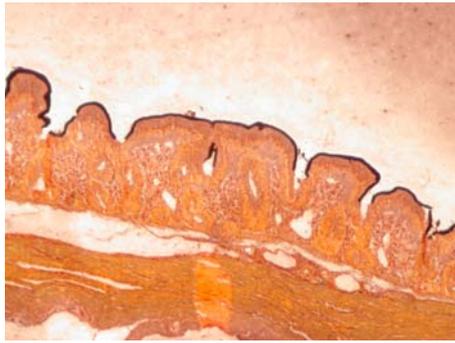


Figura 9- Mucosa do ceco apresentando aspecto fusionado das vilosidades com aderência de bactérias. SIPV 9. Warthin Starry, obi. 4

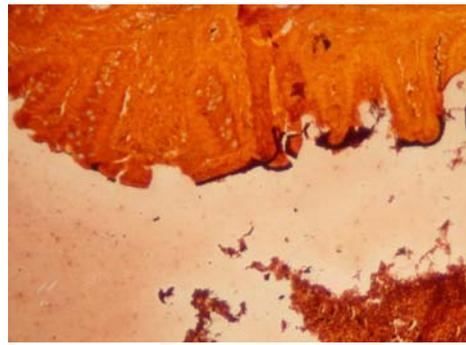


Figura 10- Ceco de ave, aderência focal de espiroquetas no epitélio. SIPV 9 Warthin Starry, obj. 4

As cepas SIPV 14 e 16, enquadradas dentro das positivas acima mencionadas, pertencem aos animais controles (infectados por contato). Cabe destacar que entre essas lâminas se observou uma aderência contínua das bactérias ao longo do epitélio intestinal para algumas amostras (SIPV 22 e 37), assim como para outras houve uma aderência focal (SIPV1 e 12). Em alguns casos as duas situações estavam presentes na mesma lâmina (SIPV 9,13,14,15,16 e 18).

As cepas SIPV 1,12,20,23 e 43 foram debilmente infectantes e a sua presença foi notada não na superfície das células epiteliais, mas livres na luz intestinal. A aderência fraca foi também observada em alguns pintos incluídos como contatos não inoculados para as cepas SIPV 15,20,23 e 43. Especialmente nas lâminas em que aparecem as espiroquetas na luz intestinal foi possível comprovar a associação com outras bactérias, bem como nas lâminas que correspondem às cepas SIPV1,8,16 e 37. Em vários cortes espiroquetas foram visualizadas dentro de glândulas intestinais (SIPV 1,8,9,13,14,15,16,18,20,23,37 e 43), sendo que algumas dessas também correspondem a lâminas controles, como as cepas SIPV 15,16,20,23 e 43. Outro achado característico foi a presença de macrófagos na mucosa do intestino com bactérias em seu interior, produto da fagocitose.

Os resultados obtidos constam no Quadro 1.

Quadro 1- Resultado do exame microscópico de cortes de cecos de pinto inoculados com *B. pilosicoli* e em animais contatos, corados pela prata.

| CEPAS | PINTOS | PINTO NÚMERO | ADERÊNCIA | | | PRESENÇA NA LUZ INTESTINAL | RESULTADO FINAL | OUTRAS LESÕES INTESTINAIS |
|--------------|--------|-----------------|-----------|-----------|----------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| | | | POSITIVOS | | NEGATIVO | | | |
| | | | Focal | Contínuos | | | | |
| SIPV23 | E | 508 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 509 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 510 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 511 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | C | 512 | | | 5 | 5 | POSITIVO + | b,c,h |
| | | 513 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| SIPV36 | E | 187 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 188 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 189 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 190 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | C | 191 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 192 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| SIPV37 | E | 193 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 195 | | 8 | 2 | | POSITIVO + + + | a,b,c,h |
| | | 196 | | 2 | 8 | | POSITIVO + | a,c,h |
| | | 197 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | C | 194 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 198 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| SIPV38 | E | 199 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 200 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 201 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 202 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | C | 203 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 204 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| SIPV39 | E | 205 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 206 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 207 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 208 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | C | 209 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 210 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| SIPV40/42 | E | 211 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 212 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 213 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 214 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 215 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 216 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 217 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 218 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | C | 219 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 220 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| SIPV43 | E | 221 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 222 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 223 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | | 224 | | | 10 | | NEGATIVO | |
| | C | 225 | | | 6 | 4 | POSITIVO + | b,c,h |
| | | 226 | | | 6 | 4 | POSITIVO + | b,c,h |
| TOTAL | | | 0 | 10 | 467 | 13 | | |
| | | | 10 | | | | | |

LEGENDA:

E= Experimental, C= Contatos.

- a) Aderência da bactéria no epitélio,
- b) Presença da bactéria na luz das glândulas intestinais,
- c) Inflamação da mucosa, principalmente polimorfonucleares e macrófagos,
- d) Inflamação da lâmina própria, principalmente polimorfonucleares e macrófagos,
- e) Fagocitose da bactéria pelos macrófagos da bactéria,
- f) Abundante associação com outras bactérias,
- g) Descamação do epitélio intestinal,
- h) Hipertrofia e hiperplasia do epitélio intestinal.

Número de bactérias: + = pequeno, ++ = médio e +++ = alto

4.4 Detecção da bactéria através da imunohistoquímica

Através dessa técnica foi possível analisar a presença ou ausência das bactérias das distintas cepas nos cortes, a ação dos macrófagos na mucosa e sua associação com outras bactérias, como esquematizado na Tabela 2. Pelo fato de que a maioria das alterações microscópicas são iguais às detalhadas na Tabela 1, só serão apresentadas a seguir as diferenças observadas pela coloração das bactérias pela prata e pela imunohistoquímica. Pelo alto custo da técnica, foram selecionados apenas alguns animais entre os inoculados com cada cepa, tendo como base os resultados obtidos pelos cortes avaliados com a coloração pela prata (2 a 3 animais por cepa, incluindo animais inoculados e contatos).

Apresentaram resultado negativo as lâminas procedentes das cepas P43, S16, SIPV19. Algumas cepas que haviam apresentado resultado negativo através da coloração pela prata, mostraram resultado positivo ao ser usada a imunohistoquímica.

A colonização do epitélio intestinal esteve presente em todas as cepas restantes, de maneira focal e ao longo de toda a borda epitelial. No caso das cepas SIPV8,12,20,23,43, além da colonização da superfície epitelial, houve observação da presença de bactérias na luz intestinal.

Cabe destacar que cada lâmina esteve representada por um número de cortes que corresponderam a um mesmo animal desafiado com uma mesma cepa, que no caso da coloração pela prata se unificou em 10 e na imunohistoquímica em 5. Nos gráficos pode-se observar o fato de que dentro da mesma lâmina existem cortes positivos com aderência focal ou contínua e, inclusive, cortes negativos.

No Quadro 2 é apresentado o resultado do exame microscópico de cortes de cecos de pintos inoculados com *B. pilosicoli* e em animais contatos submetidos à técnica de imunohistoquímica.

Quadro 2- Resultado do exame microscópico de cortes de cecos de pintos inoculados com *B. pilosicoli* e em animais contatos submetidos à técnica de imunohistoquímica

| CEPAS | PINTOS | PINTO NÚMERO | DILUIÇÃO | ADERÊNCIA | | | PRESEÇA NA LUZ INTESTINAL | RESULTADO FINAL | OUTRAS LESÕES |
|-----------|--------|--------------|----------|-----------|-----------|----------|---------------------------|-----------------|---------------|
| | | | | POSITIVOS | | NEGATIVO | | | |
| | | | | Focal | Contínuos | | | | |
| 3 | E | 226 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| | C | 229 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| 16 | E | 182 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| | C | 185 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| PV1 | E | 419 | 1/100 | | 4 | 1 | | POSITIVO+ | a,d |
| | | 429 | 1/50 | 4 | | 1 | | POSITIVO+ | a,d |
| | C | 426 | 1/50 | 2 | | 3 | | POSITIVO+ | a,d |
| PV8 | E | 414 | 1/50 | | 4 | 1 | | POSITIVO +++ | a,b,c |
| | | 416 | 1/100 | | | 1 | 4 | POSITIVO +++ | a,b,c |
| | C | 438 | 1/50 | 2 | 1 | 2 | | POSITIVO ++ | a |
| SIPV9 | E | 446 | 1/100 | | 5 | | | POSITIVO +++ | a,b,c |
| | | 449 | 1/100 | 2 | 1 | 2 | | POSITIVO ++ | a,b |
| PV12 | E | 430 | 1/70 | | 4 | 1 | | POSITIVO ++ | a,b |
| | | 436 | 1/70 | 2 | | 3 | | POSITIVO + | a,d |
| | C | 434 | 1/70 | | | 1 | 5 | NEGATIVO | |
| PV13 | E | 450 | 1/50 | | 4 | 1 | | POSITIVO +++ | a,b |
| | C | 456 | 1/70 | | 2 | 3 | | POSITIVO + | a,d |
| PV14 | E | 497 | 1/70 | | 4 | 1 | | POSITIVO +++ | a,b |
| | C | 494 | 1/50 | | 4 | 1 | | POSITIVO +++ | a,b |
| PV15 | E | 457 | 1/70 | 4 | | 1 | | POSITIVO + | a,d |
| | C | 462 | 1/70 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| PV16 | E | 463 | 1/70 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| | | 465 | 1/50 | | 4 | 1 | | POSITIVO +++ | a,b |
| | | 467 | 1/70 | | 4 | 1 | | POSITIVO ++ | a,c |
| | C | 466 | 1/50 | | 5 | | | POSITIVO +++ | a |
| PV18 | E | 479 | 1/70 | 3 | | 2 | | POSITIVO + | a,d |
| | E | 483 | 1/50 | | 5 | | | POSITIVO +++ | a,b,c |
| | E | 484 | 1/70 | 1 | | 4 | | POSITIVO + | a |
| | C | 481 | 1/70 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| PV19 | E | 478 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| | E | 486 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| | C | 500 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| PV20 | E | 488 | 1/70 | | 4 | 1 | | POSITIVO ++ | a,b |
| | C | 492 | 1/70 | | | | 5 | POSITIVO ++ | |
| SIPV22 | E | 502 | 1/50 | | 5 | | | POSITIVO ++ | a,b |
| | E | 503 | 1/70 | 3 | | 2 | | POSITIVO + | a,b,d |
| | C | 507 | 1/70 | | 4 | 1 | | POSITIVO ++ | a,b |
| PV23 | E | 509 | 1/70 | 2 | 2 | 1 | | POSITIVO +++ | a,b |
| | C | 512 | 1/50 | | | | 5 | NEGATIVO | |
| | C | 513 | 1/70 | 4 | 1 | | | POSITIVO +++ | a,b |
| PV36 | E | 188 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| | C | 191 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| SIPV37 | E | 195 | 1/50 | | 5 | | | POSITIVO +++ | a,b |
| | C | 194 | 1/50 | 3 | 1 | 1 | | POSITIVO ++ | a |
| SIPV38 | E | 200 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| | C | 203 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| SIPV39 | E | 208 | 1/50 | 5 | | | | POSITIVO + | a,d |
| | C | 209 | 1/50 | | | 5 | | NEGATIVO | |
| SIPV40/42 | E | 218 | 1/50 | 3 | 2 | 1 | | NEGATIVO | |
| | C | 219 | 1/50 | 5 | | | | POSITIVO + | a,d |
| SIPV43 | E | 234 | 1/50 | | | 5 | 5 | POSITIVO + | a,d |
| | C | 235 | 1/50 | | | | 5 | POSITIVO ++ | a,b |
| TOTAL | | | | 45 | 75 | 118 | 29 | | |
| | | | | 120 | | | | | |

LEGENDA:

Número de bactérias: + = pequeno, ++ = médio e +++ = alto.

Os tecidos utilizados para os cortes foram de ceco

A recuperação antigênica foi feita por calor e tripsina

- a) Aderência da bactéria no epitélio,
- b) Presença da bactéria na luz das glândulas intestinais,
- c) Fagocitose da bactéria pelos macrófagos da mucosa,
- d) Associação com outras bactérias

Um resumo dos achados nos exames de coloração pela prata e por imunohistoquímica com relação à presença ou ausência das *Brachyspira* spp. consta do Quadro 3.

Quadro 3- Resumo dos achados nos exames de coloração pela prata e por imunohistoquímica (IHQ).

5. DISCUSSÃO

A infecção com *B. pilosicoli* ocorre nas diversas espécies animais principalmente pela via fecal-oral, como demonstrado anteriormente (BARCELLOS, 2000). No caso atual, como forma de avaliar o grau dessa forma de infecção cruzada (transmissão horizontal), foi usado um modelo experimental que envolveu o alojamento na mesma gaiola de pintos inoculados e contatos não inoculados. Através do exame de lâminas coradas pela prata, demonstrou-se a transmissão cruzada com 5 cepas (SIPV 14,15,20,23,43). Usando a técnica da imunohistoquímica, foi demonstrada a infecção cruzada para 13 cepas: SIPV 1,8,9,13,14,16,20,22,23,37,40/42,43. Apenas num caso (cepa 15) houve detecção de infecção de animais contatos em lâmina corada pela prata sem que houvesse reação positiva pela imunohistoquímica. De outra parte, essa técnica detectou 6 cepas cuja infecção não havia sido demonstrada na coloração pela prata. Isso sugere uma maior sensibilidade da técnica. A imunohistoquímica, ao combinar técnicas anatômicas, imunológicas e bioquímicas permite localizar componentes tissulares definidos *in situ* mediante o emprego de anticorpos específicos e de moléculas marcadas. Tanto para a Veterinária como para a Medicina Humana a imunohistoquímica permite diagnosticar enfermidades infecciosas uma vez que o agente infeccioso e seus antígenos podem ser identificados em cortes de tecidos, apreciando a sua distribuição e a sua relação com as lesões (GIMENO *et al.*, 2002). Usando as duas técnicas, 76% (16/21) das amostras foram capazes de ser transmitidas entre os animais inoculados e os contatos. O piso das gaiolas era de telado de arame com furos quadrados, totalmente vazado, drenando eficientemente líquidos e proporcionando um ambiente de baixa contaminação fecal aos pintos. Mesmo nessa situação observou-se que essa infecção ocorreu de forma maciça, o que sugere alta capacidade infectante das amostras de *B. pilosicoli* de origem suína usadas no experimento para pintos.

A amostra padrão da espécie (P43/6/78) e o isolado de origem humana (SP16) mostraram-se não aderentes e foram incapazes de provocar reação inflamatória, quando avaliadas pelas duas técnicas. Não foram encontradas referências ao uso anterior dessas cepas no presente modelo experimental, o que dificulta a análise do achado. De outra parte, essas cepas são altamente laboratorizadas (ou seja, foram submetidas em diversos países a um número muito elevado de sub-cultivos). Nessas condições, as bactérias tendem a perder alguns determinantes de virulência e apresentam redução variável em sua capacidade patogênica.

Com relação às alterações macroscópicas no ceco dos pintos, houve lesões em apenas 2 a 3% dos animais inoculados. Isso revelou a baixa patogenicidade das cepas de *B. pilosicoli* avaliadas para esses animais. De outra parte, a colonização foi detectada em 13% dos cortes examinados através da coloração pela prata e em 68% pela técnica de imunohistoquímica, o que demonstrou a alta capacidade do organismo em se associar ao epitélio intestinal sem causar problemas clínicos. Isso foi demonstrado pela ausência de diarreia nos pintos inoculados, concordando com registros anteriores de outros autores (TROTT, HAMPSON, 1998; DUHAMEL, 2001). O mecanismo exato da enterite e da diarreia causada pela *B. pilosicoli* não é claro. Alguns autores especulam que, pelo menos em parte, seria devido por um prejuízo à absorção causado pela aderência maciça da bactéria (DUHAMEL, 2001; BARCELLOS, 2000). Como nesse caso essa colonização ocorreu na maioria dos animais sem presença de diarreia, nossos achados diferem dessa hipótese. Outra teoria relaciona os efeitos de uma toxina produzida pela *B. pilosicoli* (subtilisina), capaz de afetar a coesividade no complexo juncional entre os enterócitos intestinais e causar a descamação celular (DUHAMEL, 2001). Esse efeito só foi observado numa lâmina, o que poderia estar associado com a baixa ocorrência de lesões macroscópicas e ausência de diarreia. A possibilidade de que essa toxina possa se expressar de forma diversa em diferentes espécies animais poderia explicar as variações na patogenicidade da *B. pilosicoli* para suínos e pintos. De outra parte, a presença de variações em receptores na superfície das células intestinais ou diferenças relacionadas com a idade dos animais poderiam também explicar as variações.

Na observação macroscópica dos cecos observou-se que as lesões ocorreram sempre nas suas porções mediana e distal, nunca afetando a parte proximal, confirmando o achado de outros autores (TROTT, HAMPSON, 1998; DUHAMEL, 2001). Do mesmo animal, examinando histologicamente cortes coletados em diversos segmentos intestinais, puderam ser observadas todas as variações de aderência da bactéria, desde colonização focal, a contínua ou negativa. Pela observação da lesão macroscópica de hiperemia e sufusões que estava presente em alguns animais, pode-se especular que a maior aderência tivesse ocorrido na porção média e distal do ceco dos pintos.

Na observação das lâminas positivas, tanto na coloração pela prata como pela imunohistoquímica, o achado microscópico mais evidente foi a aderência da bactéria à superfície do epitélio intestinal. Num número menor de lâminas, observou-se também invasão das glândulas epiteliais, conforme havia sido relatado anteriormente (TAYLOR,

TROTT 1997; DUHAMEL, 2001). Uma outra observação desses autores foi uma infreqüente invasão de macrófagos, o que foi confirmado nas nossas observações (invasão presente em 3 lâminas, correspondendo às cepas SIPV 13 e 22; pela coloração pela prata e para a imunohistoquímica a invasão esteve presente em 4 lâminas, correspondendo às cepas SIPV 8,16,18).

Houve diferença na aderência das bactérias ao epitélio do intestino, na observação das lâminas coradas pela prata e por imunohistoquímica. Para as lâminas observadas após a coloração pela prata, em 4,5 % dos casos, observou-se aderência em focos ao longo do epitélio intestinal. Em 18,2 %, observou-se colonização de maneira contínua ao epitélio intestinal, com a formação da estrutura que tem sido referida como “falsa borda em escova”. Em 45 % das lâminas, houve a observação simultânea das duas formas de colonização (contínua e focal); e em 32 % dos cortes a bactéria estava presente na luz intestinal. Em muitas ocasiões, o processamento histológico poderia ter causado a presença da bactéria na luz intestinal, como fica evidente na Figura 9. Entre os fatores que poderiam explicar essa “descamação” das bactérias aderidas, poderiam ser citados o atrito com a navalha e a ação dos álcoois e outros reativos usados no processamento dos tecidos.

No caso das lâminas após a realização da técnica histoquímica, observou-se em 16,6% a colonização focal, em 33,3% a colonização contínua e em 33,3% simultaneamente as duas formas de colonização. Quanto à presença da bactéria na luz intestinal, foi encontrada em 8,3% das lâminas. No caso da imunohistoquímica as bactérias são coradas especificamente, reduzindo a coloração de fundo e permitindo a visualização de espiroquetas que, por estar em baixo número, poderiam passar despercebidas contra um fundo muito contaminado por outras células bacterianas.

Em estudos anteriores, para a classificação de cepas patogênicas ou apatogênicas para pintos foram usados dois critérios: a colonização e a ocorrência de diarreia nos animais inoculados (TROTT, HAMPSON, 1998). No nosso caso, pela ausência de sinais clínicos, ficamos restritos à classificação através dos diferentes níveis de colonização. Dessa forma, poderíamos definir as cepas por nós analisadas como de alta capacidade colonizante mas de baixa capacidade patogênica, por não serem capazes de causar alterações patológicas capazes de induzir a diarreia.

Um achado inusitado na observação microscópica foi o alto número de cepas que apresentaram cortes com o achado de figuras microscópicas alongadas, em forma de paliçada, colonizando maciçamente em área do quarto superior do epitélio celular,

próximo ao centro da célula (Figura 6). Esse achado esteve presente em 10 entre as 21 amostras analisadas. No presente estudo, não foi possível determinar se as estruturas observadas eram a *B. pilosicoli* inoculada, um artefato de coloração ou outra bactéria intracelular. Foi achado convincentemente apenas nas lâminas coradas pela prata, não sendo observada uma coloração de intensidade similar quando submetida à imunohistoquímica. É possível que pela localização intracelular tenha havido dificuldade nessa reação antígeno-anticorpo. Seria possível tentar aumentar a sensibilidade do teste pela recuperação antigênica com o uso de forno de microondas ou ultra-som. Essas técnicas deverão ser aplicadas posteriormente. Estudos adicionais, envolvendo microscopia eletrônica e testes de hibridização *in situ* poderiam auxiliar também a determinar se as estruturas intracelulares correspondem à cepa de *Brachyspira* inoculada. Até recentemente, espiroquetas do gênero *Brachyspira* não haviam sido detectadas como parasitas intracelulares em animais, apesar de que a invasão intraepitelial atingindo a lâmina própria e sendo fagocitadas nesse local por macrófagos já havia sido relatada (DUHAMEL, 2001). Essa situação mudou, pois mais recentemente Jansson e Fellström (2003) relataram a presença de evidências morfológicas da invasão de enterócitos de pintos por *Brachyspira* spp. especialmente em áreas necróticas, em casos de diarreia natural, pela técnica da coloração pela prata. Através da microscopia eletrônica confirmaram que os achados prévios correspondiam a organismos morfológicamente similares a *Brachyspira* spp., Também observaram que a bactéria não estava envolvida por nenhuma membrana ou estrutura fagocítica, aparecendo livre no citoplasma de enterócitos necróticos ou intactos.

Houve diferença no grau das lesões histológicas para as distintas cepas. Especificamente para as cepas SIPV 9 e 13, notou-se em uma lâmina de cada uma, reação não observada em nenhuma outra entre as amostras usadas. Consistia de maciça aderência da bactéria ao epitélio cecal e das criptas. Concomitantemente, havia uma forte resposta inflamatória na mucosa e na lâmina própria, com presença de heterófilos e macrófagos. Para o restante das cepas, os achados microscópicos estiveram restritos à capacidade de aderência da bactéria, com ocasional ocorrência de uma ou outra entre as lesões histológicas que estiveram presentes na sua totalidade no caso anterior. Uma alteração comum a todos os cortes positivos foi a hiperplasia e hipertrofia do epitélio intestinal e das criptas.

6. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos, podemos concluir que:

1. Entre as duas técnicas comparadas, a imunohistoquímica foi a mais sensível para a detecção da *B. pilosicoli* no epitélio do ceco dos pintos inoculados. Ela foi capaz de detectar amostras positivas onde a coloração pela prata foi negativa;
2. As cepas que foram capazes de colonizar demonstraram diferenças nessa capacidade e em induzir lesões histológicas. Isso sugere variações no grau de patogenicidade, mas pela ausência dos sintomas característicos da infecção intestinal por *Brachyspira* spp. em pintos (diarréia), pode-se definir que houve apenas diferença no grau de infecciosidade;
3. A mistura dos animais contatos com os desafiados nas gaiolas permitiu comprovar a transmissão horizontal pela via fecal-oral.
4. Foram encontradas figuras alongadas paralelas no interior dos enterócitos. Essas estruturas poderiam corresponder a *Brachyspira* spp., mas estudos posteriores necessitam ser realizados para esclarecer essa hipótese.

REFERÊNCIAS

ALLEN, T. C. Hematoxilina y eosina. In: PROPHET, E B. *et al.*(Eds.) **Laboratory methods in histotechnology**. Washington D.C.: American Registry of Pathology, 1992. cap.9, p. 53-58.

BARCELLOS, D.E.S.N. Diagnóstico da disenteria suína e isolamento do *Treponema hyodysenteriae* no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Porto Alegre, v.5, p.11-15, 1978.

BARCELLOS, D.E.S.N.; BOROWSKI, S.M.; de OLIVEIRA, S.J. Causas de diarreia em leitões na fase de recria. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7., 1995, Blumenau. **Anais**. Blumenau: Associação Brasileira dos Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES), 1995. p. 87.

BARCELLOS, D.E.S.N.; DUHAMEL, G.E.; MATHIESEN, M.R. Survival of pathogenic intestinal spirochetes kept in pure culture and in pig feces held at four different temperatures. **Nebraska Swine Report**, Nebraska-Lincoln, v.219, p.12-14, 1999.

BARCELLOS, D.E.S.N. *et al.* The identification and prevalence of intestinal spirochetes in relation to feed medication in brazilian pig herds. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000a, Melbourne, **Proceedings**. Melbourne: International Pig Veterinary Society (IPVS), 2000a. p.10.

BARCELLOS, D.E.S.N. *et al.* Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. **The Veterinary Record**, v.146, p.398-403, 2000b.

BARCELLOS, D.E.S.N. *et al.* Rapid identification and typing of porcine intestinal spirochetes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p.189-198, 2000c.

BARCELLOS, D.E.S.N. **Infecção por *Brachyspira* spp. em suínos: epidemiologia e caracterização fenotípica e genotípica das espécies**. 2000. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Microbiológicas) – Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

BURROWS, M.R.; LEMKE, R.M. Identification of *Treponema hyodysenteriae* by a rapid microagglutination test. **The Veterinary Record**, v.108, p. 187-189, 1981.

CANALE-PAROLA, E. Motility and chemotaxis of spirochetes. **Annual Review of Microbiology**, v.32, p. 69-99, 1978.

DUHAMEL, G.E. *et al.* Prevalence of porcine colonic spirochetosis in a multiple-site production system and microbial sensitivity patterns of *Serpulina pilosicoli*. In: AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS MEETING, 1996 Arkansas. **Proceedings**. Arkansas: American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD), 1996. p. 45.

DUHAMEL, G.E. Porcine colonic spirochetosis associated with *Serpulina pilosicoli*: experimental reproduction, epidemiology and control. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS MEETING, 28., 1997, Quebec City. **Proceedings**. Quebec City: American Association of Swine Practitioners, 1997. p. 487-495.

DUHAMEL, G.E. Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis. **Animal Health Research Reviews**, v.2, p. 3-17, 2001.

DWARS, R.M.; DAVELAAR, F.G.; SMITH, H.F. Infection of broiler chicks (*Gallus domesticus*) with human intestinal spirochaetes. **Avian Pathology**, v. 21, p. 559-568, 1992.

GIMENO, E.J., *et al.* Técnicas inmunohistoquímicas en patología veterinaria: aspectos teóricos y prácticos. **Veterinaria Argentina**, Buenos Aires, v. 6, p. 332-339, 2002.

HARRIS, D.L.; LYSONS, R.J. Swine dysentery. In: LEMAN, A.D.; *et al.* (Eds). **Diseases of swine**. 7th Ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. cap. 49 p. 599-616.

HARRISSON, L.R.; GOSSER, H.S. Demonstration of spirochetes in formalized tissues using Dieterle's silver stain. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS, 22., 1979 Columbia. **Proceedings**. Columbia: American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD), 1979. p. 373-378 .

JANSSON, D.S.; FESLSTRÖM, C. Morphologic evidence of invasion of enterocytes by *Brachyspira* spp. in chicken with diarrhea. Trabalho apresentado ao 2th International conference on colonic spirochaetal infections in animals and humans, Edinburgh, 2003,

JOENS, L.A.; MARQUEZ, R.; HALTER, M. Comparison of outer-membrane fractions of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **Veterinary Microbiology**, v. 35, p. 119-132, 1993.

JOHNSON, F.B. Pigments and minerals. In: PROPHET, E B., *et al.*(Eds.) **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington D.C.: American Registry of Pathology, 1992. cap. 20, p.183 – 200.

JOHNSTON, T. *et al.* Recent advances in diagnosing and controlling porcine colonic spirochetosis caused by *Serpulina pilosicoli*. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.21, p. 198-209, 1999.

KING, T.P.; KELLY, D. Glycobiology, the microbiota and enteric health in the young pig. In: LYONS, T. P.; COLE, D.J.A.(Eds.). **Concepts in pig science**. United Kingdom: Nottingham University Press, 2001. cap. 12, p.157- 187.

KUNKLE, R.A.; HARRIS, D.L.; KINYON, J.M. Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.24, p. 669-671, 1986.

LEE, J.I.; HAMPSON, D.J. Intestinal spirochetes colonizing aborigines from communities in the remote north of Western Australia. **Epidemiology and Infection**, v. 109, p. 133-141, 1992.

LEE, J.I. *et al.* Human intestinal spirochetes are distinct from *Serpulina hyodysenteriae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 16-21, 1993.

MUNIAPPA, N. *et al.* Light and ultrastructural changes in the ceca of chicken inoculated with human and canine *Serpulina pilosicoli*. **Veterinary Pathology**, v.33, p. 542-550, 1996.

MUNIAPPA, N.; DUHAMEL, G.E. Phenotypic and genotypic profiles of human, canine and porcine spirochetes associated with colonic spirochetosis correlates with *in vivo* brush border attachment. In: PAUL, P.S. ; FRANCIS, D.H.; BENFIELD, D. (Eds.). **Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases**. Washington, DC: Plenum, 1997. p. 159-166.

MUNIAPPA, N. *et al.* Attachment of human and rhesus *Serpulina pilosicoli* to cultured cells and comparison with a chick infection model. **Journal of Spirochetes and Tick-Borne Diseases**, v. 64, p. 93-98, 1998.

NEEF, N.A.; LYSONS, R.J. Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2395-2403, 1994.

OCHIAI, S.; ADACHI, Y; MORI, K. M. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachyspira innocens* comb. nov. *Brachyspira pilosicoli* comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 41, p. 445-452, 1997.

PROPHET, E.B. Fixation. In: PROPHET, E B. *et al.* (Eds.). **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington D.C.: American Registry of Pathology, 1992. cap.4, p. 25-28.

SELLWOOD, R.; BLAND, A.P. Ultrastructure of intestinal spirochaetas. In: HAMPSON, D.J.; STATON, T.B. (Eds.). **Intestinal spirochetes in domestic animals and man**. Cambridge: CAB International, 1997. cap. 5, p. 109-149.

SONCINI, R.; MADUREIRA JR., S. Monitorias sanitárias. In: Sobestiansky, J. *et al.* (Eds.). **Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília: Serviço de Produção de Informação – SPI, 1998. cap. 5, p. 91-110.

TAKEUCHI, A. *et al.* Spiral-shaped organisms on the surface colonic epithelium of the monkey and man. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.27, p. 1287-1296, 1974.

TAYLOR, D.J.; SIMMONS, J.R.; LAIRD, H.M. Production of diarrhoea in pigs feeding pure cultures of a spirochete differing from *Treponema hyodysenteriae*. **Veterinary Record**, v. 106, p. 326-332, 1980.

TAYLOR, D.J.; TROTT, D.J. Porcine Intestinal Spirochaetosis and Spirochaetal Colitis. In: HAMPSON, D.J.; STATON, T.B. (Eds.). **Intestinal spirochetes in domestic animals and man**. Cambridge: CAB International, 1997. cap. 8, p. 211-241.

THOMAS, W.; SELWOOD, R. Monoclonal antibodies to a 16 kDA antigen of *Serpulina (Brachyspira) hyodysenteriae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 37, p. 214-220, 1992.

TROTT, D.J.; McLAREN, A.J.; HAMPSON, D.J. Pathogenicity of human and porcine intestinal spirochetes in day-old specific pathogen free chicks: an animal model for intestinal spirochetosis. **Infection and Immunity**, v.63, n.9, p. 3705-3710, 1995.

TROTT, D.J.; HAMPSON, D.J. Evaluation of day-old specific pathogen free chicks as an experimental model for pathogenicity testing of intestinal spirochaete species. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, p. 365-381, 1998.

WARTH, J.F.G.; KLUPPEL, M.E.A.; DITTRICH, T.R.C. Diagnóstico da disenteria suína no Estado do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2., 1985, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira dos Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES), 1985. p.9.

WITTERS, N.A.; DUHAMEL, G.E.. Motility-regulated mucin association of *Serpulina pilosicoli*, the agent of colonic spirochetosis of humans and animals. In: PAUL, P.S.; FRANCIS, D.H.; BENFIELD, D. (Eds.). **Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases**. Washington, D.C.: Plenum, 1998. p. 23-38.

ZHANG, P.; WITTERS, N.A.; DUHAMEL, G.E. Identification of *Serpulina pilosicoli* outer membrane antigens (SPOMA) by western blot analysis of human isolate SP16 with convalescent and hyperimmune swine soro. In: PAUL, P.S.; FRANCIS, D.H.; BENFIELD, D. (Eds.) **Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases**. Washington, D.C.: Plenum, 1998. p.39-57.

ANEXO A- Trabalho remetido para publicação no 11º Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, ABRAVES, Goiânia, 30/09 a 3/10 de 2003.

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE AMOSTRAS DE BRACHYSPIRA PILOSICOLI ISOLADAS DE CASOS DE DIARRÉIA EM SUÍNOS¹

Paulovich, F.²; Borowski, S.M.³; Driemeier, D.⁴; Razia, L.E.²; Coutinho, T.A.³; Prates, A.B.H.²; Pescador, C.⁴; Correa, A.M.R.⁴; Barcellos, D.E.S.N.^{2*}

²Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS, www.ufrgs.br/setorsuinos

³Centro de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, CPVDF/ FEPAGRO, Eldorado do Sul, RS

⁴Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Veterinária da UFRGS.

INTRODUÇÃO

A *Brachyspira pilosicoli*, uma espiroqueta, é o agente da colite espiroquetal (CE), doença infecciosa dos suínos que cursa com colite não hemorrágica e sintomas de diarreia, perda de peso e piora da conversão alimentar em animais de recria e terminação. No Brasil, diarreia em leitões nas fases de crescimento e terminação é muito freqüente e a maioria quase absoluta dos casos clínicos é diagnosticada clinicamente como infecção por *Lawsonia (L.) intracellularis* (Enteropatia Proliferativa Suína). Esta conclusão pode ser equivocada, pois num trabalho realizado no Rio Grande do Sul, espiroquetas fracamente β hemolíticas foram isoladas de 7,2 % entre 319 amostras de fezes coletadas de leitões com diarreia em 10 granjas desse Estado (2). Até recentemente, não havia sido detectada no Brasil a infecção pela *B. pilosicoli*. A importância relativa de espécies de *Brachyspira* como causadoras de problemas de diarreia em granjas de suínos foi avaliada recentemente em áreas de criação intensiva do Estado do Rio Grande do Sul (1). O exame de 206 materiais (“swabs” retais) coletados de suínos com diarreia, em 17 granjas que não usavam rações adicionadas de antimicrobianos, permitiu o isolamento de espiroquetas em todas. Espécies patogênicas estavam presentes em 13 das 17 granjas e as outras 4 apresentavam apenas espécies comensais. Os dados sugerem a importância do agente em nosso meio e indicam a necessidade de que as infecções espiroquetais sejam incluídas no diagnóstico diferencial das diarreias nas fases de recria e terminação.

Existem poucas técnicas disponíveis para a avaliação da patogenicidade de cepas *B. pilosicoli*. O modelo da inoculação experimental em suínos apresenta resultados bastante erráticos, principalmente por diferenças nos receptores de ligação para a bactéria na membrana celular dos enterócitos intestinais de diferentes leitões. Além disso, animais com diferentes graus de imunidade contra *Brachyspira* spp. podem mostrar variações de suscetibilidade.

Nosso objetivo com o presente trabalho foi o de avaliar graus de patogenicidade de distintas cepas de *Brachyspira pilosicoli* isoladas de suínos com diarreia no Estado do Rio Grande do Sul. O modelo de infecção de pinto e a avaliação da colonização cecal, que já mostrou eficiência em trabalho anterior (5), foi utilizado para esse fim. Para medir os efeitos da infecção, foram comparados dois métodos de análise histológica (coloração pela prata e uma técnica imunohistoquímica). Num segundo experimento, foi avaliada a infecção horizontal, mantendo pintos inoculados e não inoculados numa mesma gaiola.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na unidade de isolamento do Centro de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor”, em Eldorado do Sul, RS, no Setor de Patologia e no Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, RS e na Universidade de La Plata, Buenos Aires, Argentina. O período experimental para cada lote inoculado compreendeu 21 dias (da inoculação à necropsia dos pintos). O experimento envolveu 20 lotes de 6 e um de 12 pintos de um dia. Cada grupo experimental constava de 6 animais, 4 inoculados com cada uma das cepas de *B. pilosicoli* e 2 mantidos não inoculados, como contatos. Nas primeiras 24 hs após o desafio os pintos não receberam ração ou água, para manter o intestino vazio e facilitar a colonização intestinal. A seguir, receberam ração não comercial, sem antibióticos, formulada especialmente para a ocasião. As cepas usadas para a infecção experimental foram a de referência para *B. pilosicoli* (P43/6/78); um isolado humano SP16 e 19 isolados de *B. pilosicoli* oriundos de casos de diarreia em suínos no RS - SIPV 1, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 36, 37, 38, 39, 40/42 e 43 (2). Foram crescidas em meio líquido e um inóculo de 0,8 ml contendo 1×10^6 células/ mL foi fornecido por via oral a 4 de 6 pintos de cada grupo no início do experimento por 3 vezes, a cada 3 horas. Os 2 animais remanescentes de cada grupo foram mantidos como contatos não infectados, inoculados simultaneamente com um volume equivalente de meio de cultivo estéril. Os animais foram sacrificados após 21 dias. A colonização intestinal e a ocorrência de lesões foram avaliadas pela coloração pela prata e por imunohistoquímica. Para a coloração pela prata foi usada uma técnica rotineira em histopatologia (Warthin Starry). A técnica imunohistoquímica usada foi a da Streptavidina Biotina Marcada - LSAB (3), usando soro policlonal contra a cepa P43/6/78 da *B. pilosicoli*, obtido pela hiperimunização de coelhos. A leitura foi feita em microscópio ótico, com 400 aumentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os 21 dias de duração do experimento, não foi observada diarreia nos pintos inoculados e nos contatos. Na necropsia dos animais inoculados e contatos, foi realizado um exame detalhado dos cecos. A única lesão encontrada, em 12 pintos, foi de escassa hiperemia e presença de algumas sufusões na parte média e distal do órgão.

No exame histológico dos cortes de cecos dos pintos cuja inoculação resultou positiva, foi possível observar em todos os casos uma marcada hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais.

Usando a coloração pela prata foram consideradas negativas as lâminas correspondentes às seguintes cepas: P43 e SP16 (usadas como cepas de referência) e SIPV 19,20,36,38,39,40/42. A colonização do epitélio por espiroquetas formando uma linha no epitélio similar à borda em escova foi observada nas cepas SIPV 9,13,14,15,16,18,22,37,43 de maneira forte. As cepas SIPV 14 e 16, enquadradas dentro das positivas acima mencionadas, pertencem aos animais controles (infectados por contato). Cabe destacar que entre essas lâminas se observou uma aderência contínua das bactérias ao longo do epitélio intestinal para algumas amostras (SIPV 22 e 37), assim como para outras houve uma aderência focal (SIPV 1 e 12). Em alguns casos as duas situações estavam presentes na mesma lâmina (SIPV 9,13,14,15,16 e 18). As cepas SIPV 1,12,20,23 e 43 foram debilmente infectantes e a sua presença foi notada não na superfície das células epiteliais, mas livres na luz intestinal. A aderência fraca foi

também observada em alguns pintos incluídos como contatos não inoculados para as cepas SIPV 15,20,23 e 43. Especialmente nas lâminas em apareceram espiroquetas na luz intestinal, foi possível comprovar a associação com outras bactérias, bem como nas lâminas que correspondem às cepas SIPV1,8,16 e 37. Em vários cortes espiroquetas foram visualizadas dentro de glândulas intestinais (SIPV 1,8,9,13,14,15,16,18,20,23,37 e 43), sendo que algumas dessas também correspondem a lâminas de animais contatos, como as cepas SIPV 15,16,20,23 e 43.

Outro achado significativo foi a presença de macrófagos na mucosa do intestino com bactérias em seu interior, produto da fagocitose. Em dez lâminas que se apresentaram fortemente positivas para a presença de *B. pilosicoli* foram visualizadas figuras alongadas paralelas entre si, no interior das células epiteliais e células glandulares intestinais, compatíveis com espiroquetas. As cepas relacionadas com essa alteração foram SIPV 8,9,13,15,36,43. Entre essas, quatro foram de animais contatos (SIPV 8,12,13,15). Essas representaram 33,3 % das cepas, quando analisadas através da coloração pela prata. Pelos dados obtidos, não foi possível concluir que as figuras fossem *Brachyspira pilosicoli*, pois poderia tratar-se de outra bactéria intracelular ou artefato. Até o ano de 2002, *Brachyspiras* eram consideradas capazes de causar infecção intracelular apenas em macrófagos. Isso mudou, pois recentemente (ano de 2003) foi realizado o primeiro registro por microscopia eletrônica de um achado de *Brachyspira* spp. intracelular, a partir de casos de infecção de campo em frangos (4). O nosso achado poderia significar uma alta capacidade invasiva entre as cepas isoladas no Rio Grande do Sul e seria o primeiro registro de uma infecção experimental induzida pela infecção com apenas uma espiroqueta. Novos estudos deverão ser realizados para confirmar se a estrutura intracelular representa a *B. pilosicoli*.

Algumas cepas que haviam apresentado resultado negativo na coloração pela prata, mostraram resultado positivo ao ser usada a imunohistoquímica. A colonização do epitélio intestinal esteve presente em todas as cepas restantes, de maneira focal e ao longo de toda a borda epitelial. No caso das cepas SIPV8,12,20,23,43, além da colonização da superfície epitelial, houve observação da presença de bactérias na luz intestinal.

CONCLUSÕES

1. Entre as duas técnicas comparadas, a imunohistoquímica foi a mais sensível para a detecção da *B. pilosicoli* no epitélio do ceco dos pintos inoculados. Ela foi capaz de detectar amostras positivas onde a coloração pela prata não a demonstrou; 2. As cepas que foram capazes de colonizar demonstraram diferenças nessa capacidade e em induzir lesões histológicas. Isso poderia sugerir variações no grau de patogenicidade, mas pela ausência dos sintomas característicos da infecção intestinal por *Brachyspira* spp. em pintos (diarréia), pode-se definir que houve apenas diferença no grau de infecciosidade; 3. A mistura dos animais contatos com os desafiados nas gaiolas permitiu comprovar a transmissão horizontal pela via fecal-oral. 4. Foram encontradas figuras alongadas paralelas no interior dos enterócitos. Essas estruturas poderiam corresponder a *Brachyspira* spp., mas estudos posteriores necessitam ser realizados para clarificar essa hipótese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARCELLOS, D.E.S.N.; MATHIESEN, M.R.; UZEDA, M.; DUHAMEL, G.E.. The identification and prevalence of intestinal spirochetes in relation to feed medication in Brazilian pig herds. In: **INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS**, 16. Melbourne, **Proceedings**, p.10, 2000a.

2. BARCELLOS, D.E.S.N.; MATHIESEN, M., UZEDA, M., KADER, I.T.A.; DUHAMEL, G. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. **The Veterinary Record**, v.146, p.398-403, 2000b.
3. GIMENO, E.J.; BELAK, K.; MASSONE, A.R.; IBARGOYEN, G.S. Técnicas inmunohistoquímicas en patología veterinaria: aspectos teóricos y prácticos. **Veterinaria Argentina**, Buenos Aires, v. 6, p. 332-339, 2002..
4. JANSSON, D.S.; FESLSTRÖM, C. Morphologic evidence of invasion of enterocytes by *Brachyspira* spp. in chicken with diarrhea. In: **IInd INTERNATIONAL CONFERENCE ON COLONIC SPIROCHAETAL INFECTIONS IN ANIMALS AND HUMANS. Proceedings**. Edinburgh, p.44, 2003.
5. TROTT, D.J.; HAMPSON, D.J. Evaluation of day-old specific pathogen free chicks as an experimental model for pathogenicity testing of intestinal spirochaete species. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, p. 365-381, 1998.