

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**“ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM* E
HELICOBACTER SUIS NA ETIOPATOGENIA DE ÚLCERAS GÁSTRICAS
DE SUÍNOS”**

MARINA DE MATTOS FERRASSO

Botucatu / SP
Fevereiro de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**“ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM* E
HELICOBACTER SUIS NA ETIOPATOGENIA DE ÚLCERAS GÁSTRICAS
DE SUÍNOS”**

MARINA DE MATTOS FERRASSO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para a obtenção de título de Doutora.

Orientador: Professor Adjunto João Pessoa Araújo Junior (IBB/UNESP).

Coorientadora: Dr^a Taís Fukuta da Cruz.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ferrasso, Marina de Mattos.

Estudo da participação de *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* na etiopatogenia de úlceras gástricas de suínos / Marina de Mattos Ferrasso. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Coorientador: Taís Fukuta da Cruz

Capes: 50502000

1. Suíno - Estômago. 2. Estômago - Ferimentos e lesões. 3. Úlceras. 4. Suíno - Criação. Úlceras. 5. *Fusobacterium necrophorum*. 6. *Helicobacter heilmannii*.

Palavras-chave: estômagos suínos; lesões estomacais; *pars oesophagea*; suinocultura; úlceras.

Marina de Mattos Ferrasso

“ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* NA ETIOPATOGENIA DE ÚLCERAS GÁSTRICAS DE SUÍNOS.”

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior
Presidente e Orientador
Departamento de Microbiologia e Imunologia - IBB – Unesp – Botucatu

Dr^a. Marianna Vaz Rodrigues
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia - IBB – Unesp – Botucatu

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa
Membro
Departamento de Medicina Veterinária - FZEA – USP – Pirassununga

Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Mores Rall
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia - IBB – Unesp – Botucatu

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ – Unesp – Botucatu

Data da defesa de tese: 18 de fevereiro de 2019.

Agradecimentos

Certa vez uma pessoa muito sábia me explicou que há três tipos de gratidão: a gratidão pelas coisas boas que nos acontecem, pelas coisas ruins que deixam de acontecer e pelas coisas ruins que acontecem. Depois de escutar essa fala, a maneira que passei a enxergar a vida e as pessoas que me cercam mudou, e com certeza posso dizer que sou extremamente grata por tudo que me aconteceu e tem acontecido e por todos que cruzaram meu caminho. Então, meu sincero e mais profundo muito obrigada.

À Deus pelas oportunidades, bênçãos e provações colocadas em meu caminho, por sempre ter me mostrado o caminho do bem e tudo que há de mais bonito.

Aos meus pais, Estela e Cláudio pelo apoio e incentivo desde muito pequena com as leituras antes de dormir e livrinhos para colorir! Sendo sempre os meus melhores exemplos a seguir.

Ao João Pedro, meu "namorado", pelo apoio e incentivo incondicionais em todos os momentos e nas mais difíceis tomadas de decisão. E à minha "sogra" Graça pelas palavras doces de incentivo e coleguismo sempre!

Ao professor Germano Biondi por ter aberto tantas portas e possibilidades: meu mais sincero e profundo muito obrigada!!!

Ao professor João Pessoa que abriu portas e acreditou no meu trabalho embora sem me conhecer. Meu MUITO OBRIGADA sempre será pouco para agradecer.

À Taís, minha co-orientadora, parceira de processamento de amostras, de viagem de muitas horas e de mais processamento de amostras. Muito obrigada pela parceria e coleguismo.

À Marianna por toda ajuda, desde o início, desde sempre! Desde a parte técnica e principalmente pela parte emocional, sempre foram fundamentais todos os conselhos e dicas, muito obrigada!

Aos colegas da virologia, meu muito obrigada por terem me acolhido e se tornado meus amigos, vocês são demais! Obrigada Ari, Cá, Clau, Cid, Duroc, Jacque, Jéssica, Leila e Pam, vocês foram fundamentais em toda essa importante etapa da minha vida!

Aos professores, colegas e funcionários do IBTEC por pela compreensão e apoio durante todo o período do experimento!

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela paciência, compreensão e auxílio em todos e-mails, telefonemas e conversas!

Aos meus queridos mestres, colegas e colaboradores da UFPel, minha casa, minha formação, onde aprendi a essência da profissão e levarei com muito amor e carinho os anos que lá passei!

Aos queridos amigos que Botucatu me presenteou! Tia Pam, Ingrid, Duroc, Gabi, Ane, Anita... muito obrigada por todo apoio, incentivo e palavras em todos os momentos!

Aos meus queridos colegas da SR Erechim, que me incentivaram, apoiaram e acolheram tão bem. Um especial agradecimento ao happy hour das meninas e amadas

componentes: Ananda, Andreia, Helen, Joline, Lucí, Luciana e Miche, nossas sessões de amigo-terapia sempre foram o melhor remédio para todas as horas! Obrigada por sempre estarem por perto.

Aos meus colegas de IDA: Berna, Teio e Vítor obrigada pelo incentivo e coleguismo de todos os dias!

Meu muito obrigada a todos que fizeram parte desse período de tanto aprendizado, todos foram fundamentais na formação da Marina de hoje, que com certeza não é a mesma de alguns anos atrás. A gratidão sempre será o maior e melhor sentimento que guardo por todos! MUITO OBRIGADA, mais uma vez.

Agradeço também à CAPES pela concessão de bolsa e ao CNPq pelo financiamento do projeto (Processo 403531/2016-0).

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I	12
Introdução	12
Revisão de Literatura	12
Suinocultura	13
Anatomia do Estômago Suíno	14
Úlceras Gástricas em Suínos	16
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	18
<i>Helicobacter suis</i>	19
CAPÍTULO II	22
Artigo Científico: Classificação macroscópica e microscópica de estômagos suínos com e sem lesão	22
CAPÍTULO III	32
Artigo Científico: Detecção de <i>Fusobacterium necrophorum</i> e <i>Helicobacter suis</i> em lesões de estômagos suínos	32
CAPÍTULO IV	45
Discussão e Conclusões Gerais	45
Bibliografia	47

FERRASSO, M. M. **Estudo da participação de *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* na etiopatogenia de úlceras gástricas de suínos.** Botucatu, 2019. 53p. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A suinocultura é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro. Por isso, perdas devem ser evitadas a fim de satisfazer a indústria e o bem-estar dos animais. O aparecimento de úlceras gastroesofágicas em suínos causa prejuízos para o produtor e pode levar os animais à morte. O objetivo do trabalho foi verificar a participação de *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* como agentes etiológicos das úlceras nos suínos. Para isso foi realizada avaliação macroscópica e microscópica das lesões, padronização e aplicação de qPCR para diagnóstico bacteriano e visualização de micro-organismos em lâminas de histopatologia coradas por prata, a partir de estômagos de suínos com e sem úlceras. Foram avaliados 126 estômagos, 63 sadios e 63 com úlcera. O DNA extraído de fragmento de tecido da região do *pars oesophagea* foi utilizado para a análise por qPCR. Foi detectado DNA de *F. necrophorum* em seis (4,8%) estômagos e *H. suis* em 16 (12,7%). Os resultados demonstraram que houve diferença quanto a classificação macroscópica e microscópica das lesões. A classificação macroscópica das lesões dos estômagos serve como uma forma de triagem a fim de demonstrar as condições de saúde do animal abatido. A histopatologia pode demonstrar o processo inflamatório desde o seu início, quando a lesão ainda não é visível macroscopicamente favorecendo o rastreamento das possíveis causas das lesões. Os resultados demonstraram associação entre a detecção de *H. suis* e a presença de úlceras. Para ambos os micro-organismos se observou associação entre a gravidade das lesões e a presença das bactérias. Não foi observada diferença entre detecção de micro-organismos pela qPCR ou coloração por prata.

PALAVRAS-CHAVE: úlceras; estômagos suínos; *pars oesophagea*; lesões estomacais; suinocultura.

FERRASSO, M. M. **Study of the participation of *Fusobacterium necrophorum* and *Helicobacter suis* in the gastric swine ulcer etiopathogeny.** Botucatu, 2019. 53p. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Swine production is one of the main activities of the Brazilian agribusiness and because of that losses must be avoided in order to satisfy the industry and animal welfare. The appearance of gastroesophageal ulcers in swine causes loss to the producer and can lead to animal's death. The aim of the present study was to verify the participation of *Fusobacterium necrophorum* and *Helicobacter suis* as etiological agents of ulcers in swine. Macroscopic and microscopic evaluation of the lesions was performed, qPCR for bacterial diagnose and microorganism visualization in histology slides stained with silver from swine with and without ulcers was also performed. In total, 126 stomachs were evaluated, 63 healthy and 63 with ulcer. The DNA extracted from the tissue fragment of the region *pars oesophagea* was used for qPCR. DNA of *F. necrophorum* was detected in six (4.8%) stomachs and *H. suis* in 16 (12.7%). Results demonstrated that there was statistical difference as to the macroscopic and microscopic lesions classification. Data pointed to an association between *H. suis* detection and ulcer presence. An association between gravity of the lesions and the presence of bacteria was observed to both microorganisms. The macroscopic classification of the stomachs lesions serves as a form of screening in order to demonstrate the health conditions of the slaughtered animals. Histopathology can demonstrate the inflammatory process from its onset, when the lesion is not yet visible macroscopically favoring the tracking of the possible causes of the lesions. No difference between microorganism detection by qPCR and silver staining was observed. Both silver staining and qPCR can verify the presence of these microorganisms on the tissue analyzed, however, with qPCR there is precision of genus or species.

KEY WORDS: ulcers; swine stomach; *pars oesophagea*; stomach lesions; swine production.

INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira é composta por diferentes arranjos produtivos entre o produtor e a empresa de processamento. Na região Sul, a maioria dos produtores são pequenos suinocultores integrados ou cooperados, especializados em determinada etapa da produção. Na região Sudeste, o maior número de produtores é independente e com produção de ciclo completo. A região Centro-Oeste apresenta 50% dos criadores integrados às agroindústrias e nas regiões Norte e Nordeste independentes (ABCS, 2016).

A aplicação de normas e procedimentos é importante para prevenção da introdução de doenças infecciosas nos locais de produção. Os princípios de boa alimentação, bom alojamento e boa saúde, evitam situações de estresse e também a permite que o suíno expressar um comportamento natural, além de melhorar resultados dos indicadores técnicos. As enfermidades são um dos principais desafios da suinocultura, influenciando os resultados técnicos e financeiros das granjas seja por altas taxas de mortalidade ou perdas em desempenho (EMBRAPA, 2011).

A visualização de úlceras gástricas em animais abatidos ou até mesmo ocasionando seu óbito é uma preocupação na suinocultura. Sabe-se que a etiologia dessas lesões é multifatorial, incluindo fatores infecciosos, granulometria da ração, manejo nutricional, práticas de manejo inadequado entre outros (SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2007; GELBERG, 2013). Dessa maneira, os fatores que influenciam o aparecimento dessas lesões, sejam infecciosos ou não, e as medidas preventivas precisam ser elaboradas para garantir o bem-estar dos animais e a lucratividade da atividade para o produtor.

O Laboratório de Virologia da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP) foi procurado por um Médico Veterinário, pois animais de granjas a que prestava serviço apresentavam alto índice de mortalidade na fase de terminação. À necropsia, úlceras foram observadas como provável causa *mortis*. A ração e o manejo do local foram analisados e não foram encontradas

anormalidades. Já no abatedouro, ao realizar-se a inspeção do interior do estômago foram visualizadas úlceras em grande proporção dos animais.

A partir do relato feito pelo Médico Veterinário, amostras de tecido ulcerado foram encaminhadas para análise ao Laboratório, onde foram submetidas à análise de microbioma utilizando sequenciamento de última geração, na plataforma Illumina. Após análise utilizando o *software Geneious 8*, os resultados demonstraram uma alta proporção de membros dos gêneros bacterianos *Fusobacterium* e *Helicobacter*. Em outra análise, utilizando o Software CLC Genomics, foi observado que se tratava das espécies *Fusobacterim necrophorum* e *Helicobacter suis*. Dessa maneira, foi proposto um estudo para pesquisa de *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* em estômagos suínos com os seguintes objetivos:

- Avaliar macroscopicamente e microscopicamente o grau de lesão dos estômagos coletados.

- Avaliar histologicamente a presença de bactérias através da coloração de prata.

- Padronizar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) e aplicá-la para o diagnóstico de *F. necrophorum* e *H. suis*.

- Relacionar a presença de *Fusobacterium necrophorum* e *H. suis* com gravidade das úlceras gástricas.

REVISÃO DE LITERATURA

Suinocultura

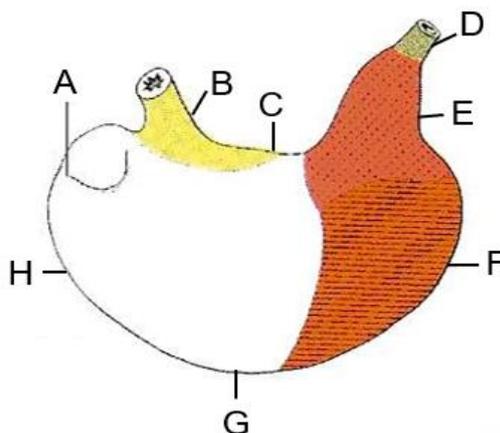
A produção de suínos no Brasil é, majoritariamente, através de confinamento e adota como modelo de produção a integração entre produtores e indústria. As indústrias e as granjas seguem os protocolos sanitários, dentro dos padrões estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (Organização das Nações

Unidas para Alimentação e Agricultura) e de acordo com as normas de bem-estar animal (ABPA, 2017b). Os animais em fase de terminação em granjas produtoras são enviados ao abatedouro com aproximadamente 150 dias de vida e pesam em torno de 100 kg (EMBRAPA, 2003). As indústrias também contam com Serviço de Inspeção Oficial seja Federal, Estadual ou Municipal, para garantir que os alimentos que chegam à mesa do consumidor sejam seguros.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), no ano de 2017, foram abatidos 43,19 milhões de suínos no Brasil, produzindo 3,81 milhões de toneladas de carne. Em 2017, foram exportadas 592.614 toneladas de carne e Rússia, Hong e China foram os principais destinos. O consumo *per capita* de carne suína no Brasil foi de 14,7 kg conforme relatório da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018). Tendo em vista que esta é uma das principais atividades econômicas do agronegócio, perdas devem ser evitadas a fim de satisfazer aos interesses da indústria e o bem-estar dos animais.

Anatomia do estômago suíno

O estômago é um órgão do sistema digestório e situa-se entre o esôfago e o intestino delgado. A entrada gástrica denomina-se cárdia e a saída piloro, sendo a musculatura dessas estruturas esfínctérica. O estômago dos suínos é classificado como unicavitário composto porque possui regiões distintas com mucosa glandular e aglandular (KÖNIG, SAUTET e LIEBICH, 2006) (Figura 1). A região aglandular compreende a região esofágica, enquanto a cárdica, o fundo e o piloro são áreas glandulares. As úlceras ocorrem principalmente na região esofagiana (DEROUCHEY, 2009) (Figura 2).



A – Divertículo ventricular; B – Região esofágica; C - Curvatura menor; D – Píloro; E – Região de glândulas pilóricas; F – Região de glândulas fúndicas ou próprias; G – Curvatura maior; H – Região de glândulas cárdicas.

FIGURA 1. Desenho mostrando as regiões glandular e aglandular de estômagos de suínos (adaptado de KÖNIG, SAUTET e LIEBICH, 2006).

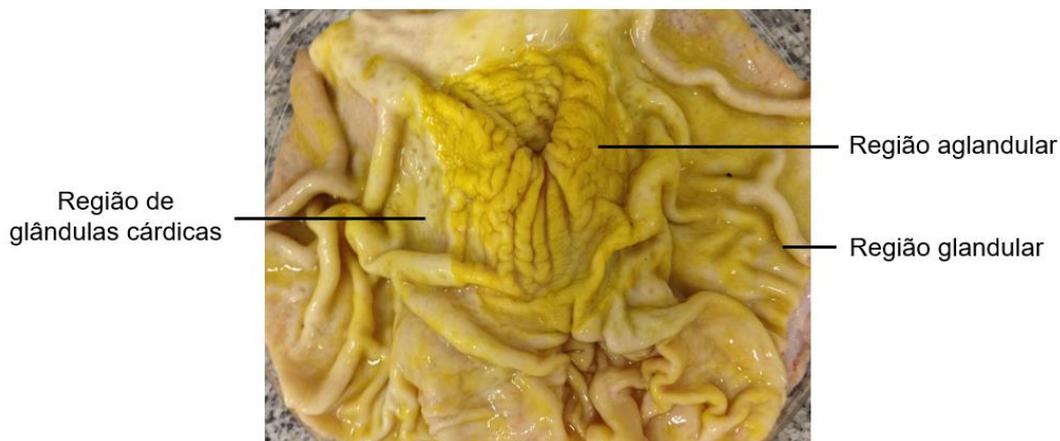


FIGURA 2. Regiões do estômago suíno.

As células parietais da mucosa gástrica secretam ácido clorídrico (HCl) e as células principais, pepsinogênio. As glândulas da região pilórica secretam muco e pepsinogênio principalmente. Nos suínos, a mucosa cárdica secreta muco e bicarbonato (ARGENZIO, 2006).

A região aglandular do estômago do suíno é uma área pequena quadrangular a retangular, composta por epitélio escamoso estratificado que circunda a abertura esofágica, sendo uma protrusão da mucosa esofágica

(Figura 2). Essa região não produz muco, o que a deixa desprotegida dos efeitos da acidez e ação enzimática do conteúdo estomacal, sendo também conhecida como *pars oesophagea* (GELBERG, 2013; SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2007; ARGENZIO, 2006).

Úlceras gástricas em suínos

O aparecimento de úlceras na região gastroesofágica ocorre exclusivamente em suínos e mais comumente em suínos criados em confinamento (GELBERG, 2013). A etiologia dessa lesão é multifatorial podendo ser relacionada ao estresse do confinamento, manejo alimentar, granulometria e peletização da ração, causas infecciosas e lesões locais entre outros (SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2007; GELBERG, 2013). A granulometria da ração, a composição e a baixa concentração de fibras parecem desequilibrar o gradiente de acidez entre a região do *pars oesophagea* e o piloro, aumentando a fluidez do alimento no estômago suíno (FRIENDSHIP, 1999).

A patogenia das lesões ainda não está completamente elucidada, no entanto, ocorre na maioria dos casos na região do quadrilátero esofágico, uma área anatomicamente aglandular e que, por não produzir muco, a torna desprotegida frente à ação do pH ácido e de enzimas existentes no estômago (SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2012). Acredita-se que o contato constante da secreção gástrica na região aglandular resulte em hiperplasia das células epiteliais, espessamento e queratinização do tecido, resultando na paraqueratose e por consequência fadiga e ruptura das junções intercelulares das células epiteliais, permitindo a infiltração do suco gástrico nas camadas mais profundas dos tecidos. Primeiramente, visualizam-se erosões que posteriormente podem atingir as camadas internas (lâmina própria, muscular da mucosa e submucosa), resultando nas ulcerações. As consequências podem ser graves, como hemorragias, perfuração da parede do estômago e morte, deixando cicatrizes na região ou até mesmo substituição por tecido glandular (SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2007).

As úlceras gástricas em suínos são um problema na suinocultura em todo o mundo, havendo relatos em diferentes continentes e a incidência é variável,

devido principalmente, às diferenças de manejo e alimentação (RADOSTITS, 2010). O aparecimento das lesões é rápido (FRIENDSHIP,1999). A incidência da doença clínica é baixa, mas quando ocorre hemorragia, a taxa de mortalidade é alta, sendo essa a maior relação com as perdas econômicas. Ainda não se tem um consenso sobre a influência das lesões no crescimento dos animais. Caso a morte do animal tenha decorrido em função da úlcera, a carcaça pode ficar pálida e haver presença de sangue no estômago e intestinos (RADOSTITS, 2010).

No Brasil, um estudo conduzido por Carvalho e colaboradores em 1999 avaliou a frequência de lesões gástricas em suínos destinados ao abate na região de Ribeirão Preto - SP, os autores observaram que dos 1085 estômagos analisados, 694 (64%) estômagos possuíam algum tipo de lesão observada macroscopicamente. Dalla Costa e colaboradores (2006) os autores observaram que 52,9% dos estômagos avaliados possuíam lesões pré-ulcerativas ou úlceras, sendo 47,1% dos animais com mucosa gastroesofágica normal, 41,9% com paraqueratose, 10,5% lesão gastroesofágica escore dois e 0,5% escore três. Dalla Costa e colaboradores (2008) também no Brasil, ao acompanharem 192 fêmeas oriundas de duas granjas (96 por granja), concluíram que o tempo de jejum dos suínos na granja não influencia o aparecimento de lesões gastroesofágicas, nesse caso o número de lesões foi considerado baixo (14,97%), sendo que; 13,90% (26 suínos) apresentaram escore de úlcera um e 1,09% (dois suínos) apresentaram úlcera com escore dois. A prevalência de animais sem lesão foi de 48,13% e com paraqueratose de 36,90%.

Swaby e Gregory (2012) avaliaram 9.827 estômagos suínos em um abatedouro na Inglaterra e concluíram que 80% dessas amostras possuíam lesões ulcerativas ou pré-ulcerativas. No continente africano, em Gana a prevalência de 17,3% (13/75) de úlceras gástricas em suínos oriundos de um abatedouro, foi registrada por Laryea e colaboradores (2016). Já em Ruanda, Mushonga e colaboradores (2017) ao analisarem estômagos de diferentes abatedouros, determinaram a prevalência de 12,86% (648/5040).

Fusobacterium necrophorum

Fusobacterium são micro-organismos fusiformes Gram-negativos anaeróbicos que podem ser encontrados na cavidade oral, nos tratos genital, gastrointestinal e respiratório superior de seres humanos e animais, podendo ser isolados de hospedeiros saudáveis (MARTINEZ e UZEDA, 2004; NAGARAJA, 2016). Em animais, as infecções causadas por fusobactérias são endógenas, geralmente exercem efeitos patogênicos quando as barreiras anatômicas são violadas, permitindo a invasão de tecidos subjacentes, sendo considerados micro-organismos oportunistas. A maioria das infecções que os envolvem é mista, com bactérias que agem sinergeticamente agravando lesões (TAN, NAGARAJA e CHENGAPPA, 1996; QUINN et al., 2001; NAGARAJA, 2016).

O filo Fusobacteria é um dos cinco encontrados em estômagos humanos em um estudo realizado por Bik e colaboradores (2005). Lowe e colaboradores (2001) avaliaram tonsilas de suínos de duas granjas com bom estado sanitário e sem terem tido enfermidades respiratórias recentes e detectaram bactérias do gênero *Fusobacterium*, incluindo *F. necrophorum*.

Ainda não existem relatos da participação do *F. necrophorum* na etiopatogenia de úlceras gástricas em suínos e acredita-se que a prevalência de infecções por esse patógeno seja subestimada (NAGARAJA, 2016). Também não há descrição de associação desta com o *Helicobacter suis*. Em um estudo realizado por Andersen, Ganeshkumar e Kolenbrander (1998) foi testada a capacidade de *Helicobacter pylori* aderir a diversas espécies de *Fusobacterium*; a adesão ocorreu em espécies oriundas de placa dental humana e não das demais, o que sugere a capacidade de *Helicobacter pylori* sobreviver em outro ambiente que não o estômago e a capacidade desses dois gêneros interagirem. De Witte e colaboradores (2017), na Bélgica, isolaram bactérias do gênero *Fusobacterium* do estômago de suínos e sugeriram uma nova espécie para esse gênero: *Fusobacterium gastrosuis*.

A bactéria *F. necrophorum* está ligada a diversas doenças, sempre em associação a outros micro-organismos, como abscessos hepáticos e *footrot* em bovinos (associado à *Arcanobacterium pyogenes*), necrobacilose em bovinos

(associado à *Bacterioides melaninogenicus*), rinite necrótica em suínos (associado a outros micro-organismos anaeróbicos), dermatite interdigital em ovinos ou *footrot* (associado à *Dichelobacter nodosus*), disenteria em suínos (em associação com *Brachyspira hyodysenteriae* e *Bacterioides vulgatus*), entre outros (QUINN et al., 2001; GELBERG, 2013; HARGIS e GINN, 2013). A sinergia entre as bactérias causadoras do *footrot* ocorre porque *D. nodosus* libera proteases e fatores de crescimento, facilitando a penetração pelos micro-organismos na pele e multiplicação bacteriana, sendo *F. necrophorum* é responsável pela necrose e inflamação (HARGIS e GINN, 2013). Em 1998, Ramos-Vara e colaboradores, reportaram estomatite necrosante em três leitões, possivelmente associada a outras bactérias como *Prevotella*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Pasteurella haemolytica*. A estomatite necrosante é o agravamento das demais estomatites e são as toxinas produzidas por *F. necrophorum* as responsáveis pela piora das lesões (GELBERG, 2013). Zhou, Dobbinson e Hickford (2010) na Nova Zelândia analisaram cascos de seis suínos que apresentavam claudicação e verificaram a presença de duas variantes de *F. necrophorum*; no entanto, não observaram a presença de *Dichelobacter nodosus*, o micro-organismo responsável pelo *footrot*, sendo assim, os autores sugeriram que a claudicação não foi causada por *footrot* e sim por algum outro agente ou fator.

Helicobacter suis

O gênero *Helicobacter* é constituído de bacilos Gram-negativos curvos ou helicoidais, não formam esporos, são móveis por flagelação lofotríquia e são microaerófilos (FERNANDEZ, 2004). *Helicobacter suis* apresenta a morfologia de um espiral firmemente enrolado (JACOB, 2016). A principal espécie de *Helicobacter* que coloniza estômagos de suínos é *H. suis* (HAESEBROUCK et al., 2009). A transmissão desse gênero bacteriano pode ser oral-oral ou oral-fecal (JACOB, 2016). Suínos com doença gástrica têm alta prevalência de *H. suis*, associada a úlceras gástricas localizadas principalmente na região paraesofágica (FOX, 2004), com lesões macroscópicas que apresentam hiperqueratose, coloração amarelada e úlceras crônicas (QUEIROZ et al. 1996).

Estudos apontam que a prevalência desse micro-organismo em suínos abatidos pode ser maior de 60% (JACOB, 2016).

Queiroz e colaboradores (1996), em um estudo no Brasil mostraram que a presença de *Helicobacter* em estômagos de suínos com lesões macroscópicas é mais comum do que em estômagos hígidos. Bracarense e colaboradores (2013) confirmaram presença de *Helicobacter* spp. em 47 dos 67 (70%) estômagos de animais sadios amostrados em um abatedouro no Brasil.

Grasso e colaboradores (1999) na Itália analisaram 85 estômagos em um frigorífico; desses, 62 apresentaram gastrite e, em oito desses 62, houve presença de *Helicobacter*. Em nenhum dos estômagos sem gastrite foi observado o micro-organismo, dessa forma os autores sugerem a relação da presença do gênero bacteriano com as lesões. O estudo realizado por Park e Park (2003) com camundongos experimentalmente infectados por *Helicobacter*, também demonstrou associação entre a infecção dos animais com a presença de gastrite. Em 2008, Baele e colaboradores isolaram através de cultivo microbiológico, *H. suis* em três de cinco amostras de estômago coletadas de leitoas em um abatedouro na Bélgica. Um estudo realizado através da infecção experimental de suínos pelo *H. suis* por De Bruyne e colaboradores (2012) na Bélgica, mostrou que além de causar as úlceras gástricas, houve também diminuição de cerca de 10% no ganho de peso diário desses animais.

Como *H. suis* é a espécie de *Helicobacter* não *H. pylori* mais prevalente em seres humanos (Van den Bulck et al., 2005; Haesebrouck et al., 2009), o estudo desse micro-organismo também é importante porque além de causar a doença nos animais também pode infectar o ser humano. De Cooman e colaboradores (2013) detectaram DNA de *H. suis* viável de 2/50 amostras de carne suína vendida em supermercados. Em um estudo realizado por De Cooman e colaboradores (2014), DNA de *H. suis* foi detectado em amostras de carcaças de três abatedouros na Bélgica, sendo 13/90 *swabs* de boca positivos, 9/90 *swabs* de cabeça positivos e 15/90 linfonodos positivos. O micro-organismo não foi detectado nas tonsilas palatinas e nem na água do tanque de escaldagem dos abatedouros. Liu e colaboradores (2014) em um estudo realizado na China,

mostraram que humanos infectados por *H. pylori* podem ser coinfectedados com outras espécies do gênero, sendo *H. suis* o mais comum.

Diante do exposto, seguem dois artigos relacionados ao assunto abordado até o momento: relação entre a classificação macroscópica e microscópica de lesões em estômagos suínos e a comparação entre a detecção das bactérias *F. necrophorum* e *H. suis* por qPCR e lâminas impregnadas por prata.

CAPITULO II

ARTIGO CIENTÍFICO: a ser submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira (normas disponíveis em: <http://www.pvb.com.br/>)

Classificação macroscópica e microscópica de estômagos suínos com e sem lesões pré-ulcerativas e ulcerativas

Marina de Mattos Ferrasso, João Pessoa Araújo Junior

RESUMO. A suinocultura é uma das principais atividades do agronegócio, por isso perdas devem ser evitadas a fim de satisfazer a indústria e o bem-estar dos animais. O aparecimento de úlceras gastroesofágicas em suínos causa prejuízos para o produtor e pode levar os animais à morte. O objetivo do trabalho foi realizar a classificação macroscópica e microscópica de estômagos suínos com e sem úlceras. Foi conduzido um estudo de caso-controle em que foram avaliados 126 estômagos, 63 sadios e 63 com úlcera. Os resultados demonstraram diferença estatística entre a classificação macroscópica e microscópica. Ao serem analisados os 126 estômagos de suínos abatidos sob o Serviço de Inspeção Federal, a classificação macroscópica dos estômagos foi de: dois (1,6%) para escore 0; 61 (48,4%) para escore 1; 15 (11,9%) para escore 2; 23 (18,3%) para escore 3 e 25 (19,8%) para escore 4. Na microscopia, 113/126 estômagos possuíam folículos linfóides, 121/126 infiltrado inflamatório; 120/126 presença de linfócitos; 108/126 macrófagos; 80/126 vacuolização da camada muscular; 64/126 hiperqueratose e 11/126 úlceras. Mesmo a classificação microscópica sendo mais precisa, a classificação macroscópica é importante, pois é através dela que há a possibilidade em realizar uma rápida análise das condições de saúde dos animais e a partir disso avaliar as condições a que são submetidos e tipo de alimentação que recebem.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Lesões estomacais; suinocultura; úlceras; *pars oesophagea*; histopatologia; estômagos suínos.

INTRODUÇÃO

A aplicação de normas e procedimentos é importante para prevenção da introdução de doenças infecciosas nos locais de produção. Os princípios de boa alimentação, bom alojamento e boa saúde, evitam situações de estresse e também a permite que o suíno expressar um comportamento natural, além de melhorar resultados dos indicadores técnicos. As enfermidades são um dos principais desafios da suinocultura, influenciando os resultados técnicos e financeiros das granjas seja por altas taxas de mortalidade ou perdas em desempenho (EMBRAPA, 2011).

O aparecimento de úlceras na região gastroesofágica ocorre exclusivamente em suínos e mais comumente em suínos criados em confinamento (GELBERG, 2013). A etiologia dessa lesão é multifatorial podendo ser relacionada ao estresse do confinamento, manejo alimentar, granulometria e peletização da ração, causas

infecciosas e lesões locais entre outros (SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2007; GELBERG, 2013). As úlceras gástricas em suínos são um problema na suinocultura em todo o mundo, havendo relatos em diferentes continentes e a incidência é variável, devido principalmente, às diferenças de manejo e alimentação (RADOSTITS, 2010). O aparecimento das lesões é rápido (FRIENDSHIP, 1999), a incidência da doença clínica é baixa, mas quando ocorre hemorragia, a taxa de mortalidade é alta sendo essa a maior relação com as perdas econômicas. Ainda não se tem um consenso sobre a influência das lesões no crescimento dos animais (RADOSTITS, 2010); no entanto, Sobestiansky e Barcellos (2007) sugerem que as lesões mais graves podem causar morte súbita e os mais leves perdas no ganho de peso e refugagem. Caso a morte do animal ocorra em função da úlcera, a carcaça pode ficar pálida e haver presença de sangue no estômago e intestinos (RADOSTITS, 2010).

Acredita-se que o contato constante da secreção gástrica na região aglandular resulte em hiperplasia das células epiteliais, espessamento e queratinização do tecido, resultando na paraqueratose e por consequência fadiga e ruptura das junções intercelulares das células epiteliais, permitindo a infiltração do suco gástrico nas camadas mais profundas dos tecidos. Primeiramente, visualizam-se erosões que posteriormente podem atingir as camadas internas (lâmina própria, muscular da mucosa e submucosa), resultando nas ulcerações. As consequências podem ser graves, como hemorragias, perfuração da parede do estômago e morte, deixando cicatrizes na região ou até mesmo substituição por tecido glandular (SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2007).

O objetivo deste estudo foi classificar macroscopicamente e microscopicamente estômagos suínos com úlceras e sadios.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras. Este trabalho foi aprovado sob o número de protocolo 167/2015 na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP.

As amostras de estômago foram coletadas de carcaças oriundas de oito granjas: duas do Estado de São Paulo e seis do Mato Grosso do Sul em frigoríficos legalmente estabelecidos, cadastrados e inspecionados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. A obtenção desse material se deu após a etapa de evisceração durante o fluxograma de abate desses animais.

No estudo de caso controle, um grupo de animais doentes (casos) e um grupo de animais não doentes (controles) são selecionados e comparados com relação à presença do fator de risco (TRHUSFIELD, 2005). Por esse motivo, a partir da totalidade de estômagos analisados (n=186), de oito granjas distintas, partiu-se de um grupo de suínos acometidos por úlceras, os casos, e comparou-se a outro grupo de suínos, que não apresentaram a lesão, os controles, dentro de cada granja individualmente, para que as condições as quais esses animais foram submetidos ao longo de sua criação não se tornassem fatores de interferência. Assim, a seleção dos casos e dos controles de cada granja foi realizada separadamente para que a proporção de um caso para um controle (1:1) fosse alcançada, a exclusão foi aleatória para que não houvesse qualquer interferência na pesquisa. Para a classificação dos casos, foram consideradas as amostras cujo escore macroscópico foi maior ou igual a 2, pois é o grau em que as ulcerações passam a ser observadas

na mucosa gástrica. Totalizando 126 amostras, 63 casos e 63 controles. As amostras foram doadas pelos estabelecimentos e o material encaminhado ao Laboratório de Virologia mantido sob refrigeração em caixas isotérmicas sendo processado em até no máximo 48 horas após o recebimento.

Análise macroscópica. A avaliação macroscópica das lesões dos estômagos analisados foi realizada conforme escore descrito por Sobestiansky, Matos e Souza (2001), a qual está demonstrada na Tabela 1. Essa avaliação foi realizada por dois ou mais pesquisadores por tratar-se de uma análise qualitativa.

TABELA 1. Escore e lesões observados pela análise macroscópica de estômagos suínos.

Score*	Lesões Macroscópicas
0	Estômago normal – Mucosa esofágica-gástrica com epitélio liso, brilhante e sem alterações visíveis
1	Paraqueratose – Mucosa esofágica-gástrica com epitélio proliferado, rugoso, sem brilho, podendo ter pequenas erosões
2	Paraqueratose e ulceração – Mucosa esofágica-gástrica com paraqueratose e ulceração menor que 33%
3	Paraqueratose e ulceração – Mucosa esofágica-gástrica com paraqueratose e ulceração entre 34% e 65%
4	Paraqueratose e ulceração – Mucosa esofágica-gástrica com paraqueratose e ulceração entre 66% e 100%

*Classificação segundo SOBESTIANSKY, MATOS e SOUZA, 2001

Análise histopatológica. Para a confecção das lâminas, os fragmentos de tecido foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24h e posteriormente acondicionados em álcool 70% até o encaminhamento para o Laboratório de Histologia da Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp de Botucatu/SP) para confecção das lâminas e coloração de hematoxilina eosina. As lesões histopatológicas dos estômagos foram avaliadas e classificadas segundo escore descrito por Park e colaboradores (2000), conforme descrito na Tabela 2.

TABELA 2. Escore e lesões de tecido gástrico de suínos observados pela análise histopatológica.

Score*	Lesões Histológicas
0	Sem infiltração de células inflamatórias
1	Infiltração leve de linfócitos, plasmócitos e alguns eosinófilos
2	Infiltração moderadamente densa de linfócitos e plasmócitos, mas não de folículos linfoides
3	Infiltração moderadamente densa de linfócitos e plasmócitos e presença de folículos linfoides
4	Infiltração muito densa de linfócitos e plasmócitos e presença de folículos linfoides

* Classificação segundo PARK et al. 2000

Análise dos resultados. O trabalho foi conduzido como um estudo de caso-controle. Para a análise dos resultados foi utilizado *Chi-quadrado* do *software Statistica v.10* (StatSoft 2011) e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Por tratar-se de um estudo de caso-controle, 63 estômagos foram classificados como com lesão (escore maior ou igual a 2) que são lesões de ulceração discreta ou inicial até lesões mais graves e 63 foram classificados como sem lesão (escore 0 ou 1) quando a mucosa do estômago não apresentou alteração ou apenas apresentou paraqueratose. Os fragmentos dos estômagos classificados macroscopicamente foram submetidos à análise histopatológica sendo classificados quanto ao tipo celular presente e grau de lesão. O número de amostras por escore macroscópico e microscópico está representado na Tabela 3.

TABELA 3. Classificação macroscópica e microscópica do grau de lesão dos estômagos suínos.

Escore macroscópico	Escore microscópico						Total
	0	1	2	3	4	Sem lâmina	
0	0	0	0	1	1	0	2
1	1	0	2	33	24	1	61
2	0	2	0	12	1	0	15
3	2	1	0	14	6	0	23
4	1	2	0	12	9	1	25
Total	4	5	2	72	41	2	126

*Não foi possível a leitura de duas lâminas pela ausência de material.

Ao ser realizada a comparação para verificar a existência de diferença entre a graduação macroscópica e microscópica o teste estatístico de *Chi-quadrado* demonstrou que não houve diferença estatística significativa ($p=0,9972$) entre os testes macroscópico e microscópico.

Ao serem comparadas as classificações macroscópica e microscópica, pôde-se perceber, no entanto, que houve diferença estatística ($p<0,05$) dos escores entre as técnicas, conforme Gráfico 1.

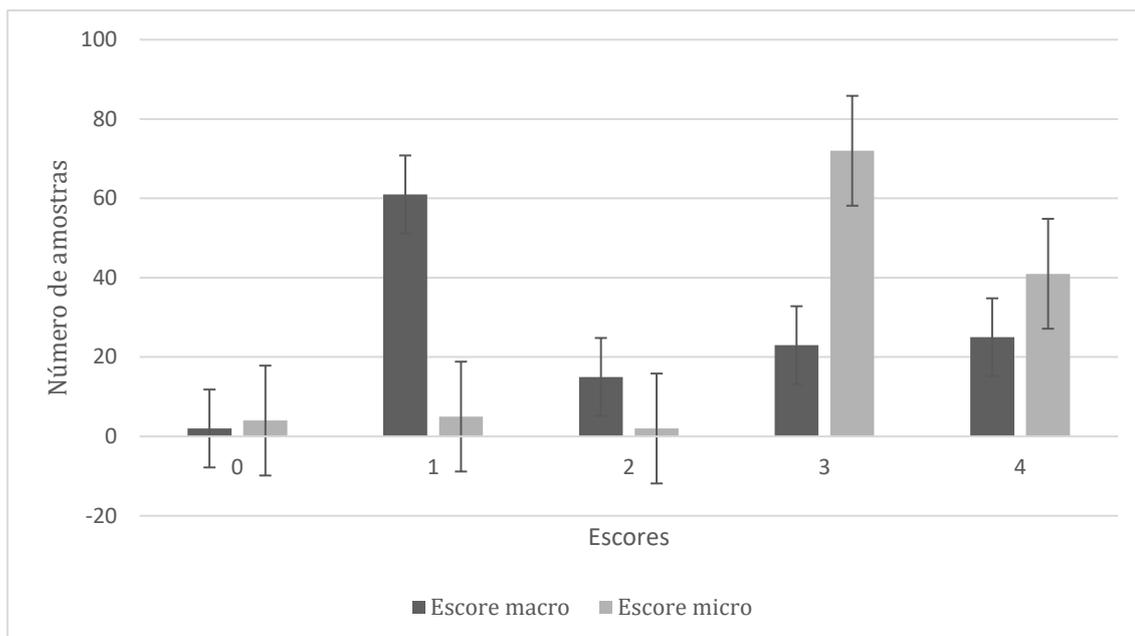


GRÁFICO 1. Análise total de escores de estômagos suínos por macroscopia e microscopia.

Assim, é possível perceber que não houve relação com a classificação macroscópica e microscópica, ou seja, o escore macroscópico não foi o mesmo que o microscópico.

Ao serem analisados os 126 estômagos, a classificação macroscópica dos estômagos foi de: dois (1,6%) para escore 0; 61 (48,4%) para escore 1; 15 (11,9%) para escore 2; 23 (18,3%) para escore 3 e 25 (19,8%) para escore 4 (Tabela 3). Como esse foi um estudo de caso-controle não se pode inferir valores como prevalência e incidência.

Já ao serem analisadas as lâminas de histopatologia os resultados foram de quatro amostras (3,2%) escore 0; cinco (4%) escore 1; dois (1,6%) escore 2; 72 (58,1%) escore 3 e 41 (33,1%) escore 4, não foi possível realizar a leitura de duas lâminas (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A patogenia das lesões ainda não está completamente elucidada; no entanto, ocorre na maioria dos casos na região do quadrilátero esofágico, uma área anatomicamente aglandular e que, por não produzir muco, a torna desprotegida frente à ação do pH ácido e de enzimas existentes no estômago (SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2012). Os estômagos analisados foram classificados conforme o grau de lesão macroscópica na região do quadrilátero esofágico, sendo que apenas quatro de todos os 186, apresentaram a região preservada. Acredita-se que o contato constante da secreção gástrica na região aglandular resulte em hiperplasia das células epiteliais, espessamento e queratinização do tecido, resultando na paraqueratose e por consequência fadiga e ruptura das junções intercelulares das células epiteliais, permitindo a infiltração do suco gástrico nas camadas mais profundas dos tecidos. Primeiramente, visualizam-se erosões que posteriormente podem atingir as camadas internas (lâmina própria, muscular da mucosa e submucosa), resultando nas ulcerações. As consequências podem ser graves, como

hemorragias, perfuração da parede do estômago e morte, deixando cicatrizes na região ou até mesmo substituição por tecido glandular (SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2007).

No Brasil, um estudo conduzido por Carvalho e colaboradores em 1999 em que foi avaliada a frequência de lesões gástricas em suínos destinados ao abate na região de Ribeirão Preto - SP, os autores observaram que dos 1085 estômagos analisados, 694 (64%) estômagos possuíam algum tipo de lesão observada macroscopicamente, esses autores classificaram as lesões em paraqueratose, erosões, ulcerações da mucosa gástrica e suas combinações. Dalla Costa e colaboradores (2006) os autores observaram que 52,9% dos estômagos avaliados possuíam lesões pré-ulcerativas ou úlceras, sendo 47,1% dos animais com mucosa gastroesofágica normal, 41,9% com paraqueratose, 10,5% lesão gastroesofágica escore dois e 0,5% escore três. Em outro trabalho realizado por Dalla Costa e colaboradores (2008) também no Brasil, ao acompanharem 192 fêmeas oriundas de duas granjas (96 por granja), nesse caso o número de lesões foi considerado baixo (14,97%), sendo que; 13,90% (26 suínos) apresentaram escore de úlcera um e 1,09% (dois suínos) apresentaram úlcera com escore dois. A prevalência de animais sem lesão foi de 48,13% e com paraqueratose de 36,90%. Vogt e colaboradores (2008) ao classificarem as lesões de 20.792 estômagos de suínos abatidos em frigorífico no Rio Grande do Sul obtiveram 18.657 (89,7%) estômagos com algum grau de lesão, sendo 10,3% de grau 0, 12.148 (58,4%) de grau 1; 5.145 (24,7%) de grau 2; 1.004 (4,8%) de grau 3 e 368 (1,8%) de grau 4. Na Inglaterra, Swaby e Gregory (2012) acompanharam o abate de 9.827 suínos e classificaram as lesões gástricas em 4 graus, 0 sem lesão, 1 lesão leve, 2 lesão média e 3 lesão severa, esses autores observaram 20,4% estômagos de escore 0; 49,2% de escore 1; 23,9% de grau 2 e 6,4% de grau 3. Em um estudo conduzido em Gana, por Laryeae e colaboradores (2016) em que 75 estômagos foram avaliados e as lesões classificadas de 1 a 5 (1 hiperqueratose leve, 2 hiperqueratose severa, 3 erosão, 4 lesão na mucosa e 5 úlcera) os resultados obtidos foram de 3/75 grau 1; 5/75 grau 2; 2/75 grau 3; 0/75 grau 4 e 3/75 grau 5. Herskin e colaboradores (2016) submeteram 15 grupos de suínos a um ensaio clínico, divididos em 3 animais por baia, totalizando 45 suínos. Os autores proveram palha em diferentes quantidades por dia como fator de enriquecimento ambiental para avaliar as lesões gástricas depois de eutanasiar esses animais, e concluíram que 67% dos animais apresentaram lesões gástricas, no entanto, nos animais que tiveram acesso permanente a palha, a severidade foi menor, fato importante para a saúde e bem-estar desses animais. Gottardo e colaboradores (2017) na Itália, avaliaram 22551 estômagos suínos, classificando-os em escores, sendo: 0 (saudável), 1 (hiperqueratose), 2 (erosão e/ou úlcera média) e 3 (úlcera severa), eles obtiveram como resultado 3786 (16,8%) escore 0, 14086 (62,5%) escore 1, 3746 (16,6%) escore 2 e 933 (4,1%) de escore 3.

O estômago normal não contém folículos linfóides, no entanto, está presente em pacientes com gastrite crônica associada com *H. pylori* (Torres et al., 2000). Dos estômagos avaliados, 113 (91,2%) possuíam folículos linfóides, o que pode sugerir presença bacteriana, o que se assemelha ao encontrado por Yamasaki e colaboradores (2009) que ao avaliarem 67 estômagos no Brasil, detectaram folículos linfóides em 80,5% (54) das amostras.

Segundo Abbas, Lichtman e Pillai (2015) a inflamação aguda, que pode se desenvolver em minutos a horas e durar por dias, é a principal maneira como o

sistema imune reage às infecções e lesões teciduais, através do acúmulo de leucócitos, proteínas plasmáticas e fluido derivado do sangue em tecido extravascular, local de infecção ou lesão. Esses componentes sanguíneos são recrutados para os locais, onde realizam funções como combate aos microorganismos e início do reparo do tecido danificado. A inflamação crônica é um processo que demora mais do que aguda caso a infecção não seja eliminada ou se a lesão tecidual for prolongada. Normalmente, envolve o recrutamento e ativação de monócitos e linfócitos. Os locais de inflamação crônica frequentemente passam por remodelamento tecidual, com angiogênese e fibrose. Conforme Kumar, Abbas e Aster (2013) nas ulcerações coexistem inflamações aguda e crônica, onde durante no estágio agudo, há infiltração polimorfonuclear intensa e dilatação vascular nas margens do defeito. Com a cronicidade, as margens e a base da úlcera desenvolvem cicatrização, com acúmulo de linfócitos, macrófagos e plasmócitos. Neste trabalho, além dos folículos linfoides, as lesões mais encontradas nas amostras avaliadas nesse estudo foram: infiltrado inflamatório (121); presença de linfócitos (120); macrófagos (108); vacuolização da camada muscular (80); hiperqueratose (64) e úlceras (11).

Park e colaboradores (2000) ao avaliarem estômagos de 50 suínos na Coreia, visualizaram hiperqueratose em 10 amostras. No presente trabalho a metodologia utilizada para a classificação dos escores foi a mesma utilizada por esses autores que fizeram uma média dos escores encontrados e foi de $2,86 \pm 0,09$; já neste estudo, 48/126 foram classificadas conforme os escores mais graves, 3 e 4. Da Silva, Santos e Barbosa (2001) avaliaram estômagos de 64 suínos e classificaram esses estômagos em com úlcera e sem úlcera. Desses 64, 13 (20,31%) apresentaram lesão macroscópica e 51 (79,59%) não. Os autores realizaram quatro cortes histológicos por estômago e a análise dos 256 cortes histológicos mostrou que 98 (38,28%) casos exibiam alterações histológicas indicativas de gastrite, em diferentes graus, sendo que 55 (21,48%) casos pertenciam ao grupo de suínos portadores de úlcera gástrica, enquanto os 43 (16,80%) casos restantes, aos suínos controles. Os autores ainda concluíram que as reações inflamatórias foram mais frequentes em fragmentos da mucosa cárdica. Para Yamasaki e colaboradores (2009) as alterações histológicas mais frequentes foram a degeneração epitelial e o alongamento de papilas, identificadas em 56 (83,5%) amostras analisadas; paraqueratose em 52 (77,6%) e hiperplasia epitelial em 41 (61,1%). As erosões de epitélio foram verificadas em 40 (59,7%) amostras, enquanto a ulceração do *pars esophagea* foi identificada em 12 (17,9%), 50 amostras apresentaram algum grau de infiltrado inflamatório misto ou mononuclear. Neste trabalho, infiltrado inflamatório foi observado em 121/126 amostras e úlceras em 11/126 amostras.

Segundo Krauss et al. (2018), a classificação através das duas técnicas, macroscópica e microscópica, provê informações complementares sobre a saúde gástrica dos animais, pois enquanto a gravidade das lesões macroscópicas pode ser classificada através de escores, a profundidade das erosões e as alterações recentes podem ser visualizadas através da técnica de histopatologia. Mesmo a classificação por escores levando em consideração a observação de diferentes estruturas, pode ser observado que tanto no presente trabalho, quanto no citado, os escores com maior graduação foram os mais frequentes.

Pode ser percebido por meio da literatura que há diversas formas de classificação da gravidade das lesões, mas que de maneira geral classificam os estômagos em sem lesão, lesões moderadas e graves, sendo que os escores de graus

3 e 4 são os mais graves e podem causar morte súbita em suínos nas granjas, e os mais leves (1 e 2) perdas no ganho de peso e refugagem (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007). Gottardo e colaboradores (2017) citaram que o uso profilático de medicamentos antiparasitários, direcionados ao tratamento de nematódeos gastrointestinais e fatores relacionados ao bem-estar animal, como tipo de piso, enriquecimento ambiental e ausência de mistura de animais diminuem o risco dos animais desenvolverem lesões gástricas. Por se tratarem de lesões de causas multifatoriais, o cuidado com a alimentação, estresse e instalações em que esses animais recebem e a que são submetidos devem ser avaliados e observados constantemente, a fim de que não ocorra atraso no desenvolvimento dos animais ou nos casos mais severos, sua morte.

CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho foi possível concluir que houve diferença quanto a classificação de lesões macroscopicamente e microscopicamente. Esse resultado possivelmente se deve ao fato de a análise macroscópica ser uma análise subjetiva, mesmo utilizando graduação por escores. A análise microscópica é mais precisa, pois avalia as células presentes na inflamação. Essa análise pode mostrar um agravamento da lesão antes que ela seja visualizada na mucosa gástrica. Mesmo a classificação microscópica sendo mais precisa, a classificação macroscópica é importante, pois é através dela que há a possibilidade em realizar uma rápida análise das condições de saúde dos animais e a partir disso avaliar as condições a que são submetidos e tipo de alimentação de recebem.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1195p.
- CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, C.J.B.; MARTINEZ, P.A.O.; MAZZUCATO, B.C.; ALESSI, A.C. Frequência de lesões gástricas em suínos destinados ao abate na região de Ribeirão Preto, SP. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 3, p. 223-228, 1999.
- DALLA COSTA, O. A.; da Costa, M. J. R. P.; LUDKE, J. V.; COLDEBELLA, A.; KICH, J. D.; PELOSO, J. V.; FAUCITANO, L.; DALLA ROZA, D. Tempo de jejum dos suínos no manejo pré-abate sobre a perda de peso corporal, o peso do conteúdo estomacal e a incidência de úlcera esofágica-gástrica. *Ciência Rural*, v. 38, n. 1, 2008.
- DALLA COSTA, O. A.; COLDEBELLA, A.; da COSTA, M. J. R. P.; FAUCITANO, L.; PELOSO, J. V.; LUDKE, J. V.; SCHEUERMANN, G. N. Período de descanso dos suínos no frigorífico e seu impacto na perda de peso corporal e em características do estômago. *Ciência Rural*, v. 36, n. 5, 2006.
- DA SILVA, João Carlos Pereira; DOS SANTOS, José Lúcio; BARBOSA, Alfredo José Afonso. Gastrite em suínos: frequência, relação com a úlcera gástrica e com a densidade de células endócrinas do estômago. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 8, n. 1, 2001.

EMBRAPA. Manual Brasileiro de Boas Práticas Agropecuárias na Produção de Suínos / Elaboração de Conteúdo Técnico Alexandre César Dias... [et al.] . Brasília, DF : ABCS; MAPA; Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2011. 140 p.; 29,7 cm .

GELBERG, H. B. 7 Sistema Alimentar, Peritônio, Omento, Mesentério e Cavidade Peritoneal. In: ZACHARY, J. F; MCGAVIN, M. D. Bases da Patologia em Veterinária. 5ªEd. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 324-406.

GOTTARDO, F., SCOLLO, A., CONTIERO, B., BOTTACINI, M., MAZZONI, C., & EDWARDS, S. A. Prevalence and risk factors for gastric ulceration in pigs slaughtered at 170 kg. *Animal*, v. 11, n. 11, p. 2010-2018, 2017.

HERSKIN, M. S., JENSEN, H. E., JESPERSEN, A., FORKMAN, B., JENSEN, M. B., CANIBE, N., & PEDERSEN, L. J. Impact of the amount of straw provided to pigs kept in intensive production conditions on the occurrence and severity of gastric ulceration at slaughter. *Research in Veterinary Science*, v. 104, p. 200-206, 2016.

KRAUSS, I., SCHWARZ, L., SCHODL, K., KNECHT, C., BRUNTHALER, R., METZLER-ZEBELI, B., ... & HENNIG-PAUKA, I. ASSESSING GASTRIC ULCERATION IN FATTENING PIGS HOUSED WITHOUT OR WITH STRAW AND ADDITIONAL SPACE- A MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC STUDY ON A CONVENTIONAL AUSTRIAN FARM. *Slovenian Veterinary Research*, v. 55, n. 2, 2018.

KUMAR, VINAY; ABBAS, ABUL K.; ASTER, JON C. Robbins patologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Capítulo 2: Inflamação e Reparo. 910p.

LARYEA, M. A. et al. THE OCCURRENCE OF GASTRIC LESIONS IN SLAUGHTERED PIGS AT THE KUMASI ABATTOIR, GHANA. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, v. 14, n. 1, p. 85-91, 2016.

PARK, J. H., LEE, B. J., LEE, Y. S., & PARK, J. H. Association of tightly spiraled bacterial infection and gastritis in pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 62, n. 7, p.725-729, 2000.

SOBESTIANSKY, J.; KIECKHÖFER, H. Condições diversas – Úlcera gástrica. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D. Doença dos Suínos 2ªEd. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p. 711-836.

SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M. P. C.; SOUZA, C. M. de. Monitoria patológica de suínos em matadouros. 52p., 2001.

SOBESTIANSKY, J.; KIECKHÖFER, H. ÚLCERA GÁSTRICA. In: Doenças dos suínos. 2ª ed. 2012.

SOBESTIANSKY, J.; KIECKHÖFER, H. Condições diversas – Úlcera gástrica. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D. Doença dos Suínos 2ªEd. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p. 711-836.

SWABY, H.; GREGORY, N.G. A note on the frequency of gastric ulcers detected during post-mortem examination at a pig abattoir. *Meat Science* 90 (2012) 269–271

TORRES, J., PÉREZ-PÉREZ, G., GOODMAN, K. J., ATHERTON, J. C., GOLD, B. D., HARRIS, P. R., ... MUÑOZ, O. A Comprehensive Review of the Natural History of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *Archives of Medical Research*, v. 3,1 n.5, p. 431–469, 2000.

THRUSFIELD, M. 15 Observacional studies. In: *Veterinary Epidemiology*. 3rd Ed. Graphicraft: Hong Kong. 2005.

YAMASAKI, L., BOSELLI-GROTTI, C. C., ALFIERI, A. A., SILVA, E. O., OLIVEIRA, R. L., CAMARGO, P. L., & BRACARENSE, A. P. F. R. L. Alterações histológicas da pars esophagea de suínos e sua relação com *Helicobacter* spp. Histological findings in swine pars esophagea and its *Helicobacter* spp. relationship. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.3, p. 553-560, 2009.

VOGT, F. I.; BERNARDI, R. T.; MOTTIN, V. D.; PASSOS, D. T.; LUNGE, V. R.; OLIVEIRA, S. J. Cultivo de *Arcobacter* spp a partir de Diferentes Graus de Lesões de Úlcera Gástrica em Suínos. *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*. 2008.

ARTIGO CIENTÍFICO: a ser submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira (normas disponíveis em: <http://www.pvb.com.br/>)

Detecção de *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* em lesões de estômagos de suínos

Marina de Mattos Ferrasso, Taís Fukuta da Cruz, Marianna Vaz Rodrigues, João Pessoa Araújo Junior

RESUMO. A suinocultura é uma das principais atividades do agronegócio, por isso perdas devem ser evitadas a fim de satisfazer a indústria e o bem-estar dos animais. O aparecimento de úlceras gastroesofágicas em suínos causa prejuízos para o produtor e pode levar os animais a morte. O objetivo do trabalho foi verificar a participação de *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* como agentes etiológicos das úlceras nos suínos. Foi realizada avaliação macroscópica das lesões, padronização de qPCR para diagnóstico bacteriano e visualização de micro-organismos em lâminas de histologia coradas por prata em estômagos de suínos com e sem úlceras. Foram avaliados 126 estômagos, 63 sadios e 63 com úlcera. DNA extraído de fragmento de tecido da região do *pars oesophagea* foi utilizado para a análise por qPCR. Os dados apontaram uma associação entre a detecção de *H. suis* e a presença de úlceras. Para ambos os micro-organismos se observou associação entre a gravidade das lesões e a presença das bactérias. Não foi observada diferença entre detecção de micro-organismos pela qPCR ou coloração por prata. Tanto coloração por prata quanto qPCR podem verificar a presença desses micro-organismos no tecido analisado, no entanto, com a qPCR há precisão de gênero ou espécie.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Lesões estomacais; suinocultura; úlceras; *pars oesophagea*; qPCR; histopatologia.

INTRODUÇÃO

O bem-estar animal garante aos animais princípios de boa alimentação, bom alojamento, boa saúde, evita situações de estresse e também a possibilidade do suíno expressar seu comportamento natural, além de melhorar resultados dos indicadores zootécnicos. As enfermidades são um dos principais desafios da suinocultura, pois influencia os resultados zootécnicos e financeiros das granjas, seja por altas taxas de mortalidade ou perdas em desempenho. Por isso, é importante a aplicação de normas e procedimentos para prevenção da introdução de doenças infecciosas nos locais de produção (EMBRAPA, 2011).

A visualização de úlceras gástricas em animais abatidos ou até mesmo seu óbito é uma preocupação na suinocultura. Dessa maneira, os fatores que influenciam o aparecimento dessas lesões, sejam infecciosos ou não, e as medidas preventivas

precisam ser investigados para garantir o bem-estar dos animais e a lucratividade da atividade para o produtor. A etiologia dessa lesão é multifatorial podendo ser relacionada ao estresse do confinamento, manejo alimentar, granulometria e peletização da ração, causas infecciosas (bactérias do gênero *Helicobacter*) e lesões locais entre outros (GELBERG, 2013; SOBESTIANSKY e KIECKHÖFER, 2007). A granulometria da ração, a composição e a baixa concentração de fibras parecem desequilibrar o gradiente de acidez entre a região do *pars oesophagea*, aumentando a fluidez do alimento no estômago suíno (FRIENDSHIP, 1999).

O aparecimento de úlceras na região gastroesofágica ocorre exclusivamente em suínos e mais comumente em suínos criados em confinamento (GELBERG, 2013), que é a principal forma de criação de suínos no Brasil, juntamente a adoção de modelo de produção a integração entre produtores e indústria. Os animais em fase de terminação em granjas produtoras são enviados ao abatedouro com aproximadamente 150 dias de vida e pesam em torno de 100 kg (EMBRAPA, 2003).

As úlceras gástricas em suínos são um problema na suinocultura em todo o mundo, havendo relatos em diferentes continentes e a incidência é variável (RADOSTITS, 2010). O aparecimento das lesões é rápido (FRIENDSHIP, 1999). A incidência da doença clínica é baixa, mas quando ocorre hemorragia, a taxa de mortalidade é alta, sendo essa a maior relação com as perdas econômicas. Ainda não se tem um consenso sobre a influência das lesões no crescimento dos animais. Mas, caso a morte do animal tenha decorrido em função da úlcera, a carcaça pode ficar pálida e haver presença de sangue no estômago e intestinos (RADOSTITS, 2010).

Suínos com doença gástrica têm alta prevalência de *Helicobacter suis*, associada a úlceras gástricas localizadas principalmente na região paraesofágica (FOX, 2004), essa é a principal espécie que coloniza estômagos de suínos (HAESEBROUCK et al., 2009), cuja prevalência é maior de 60% em suínos abatidos (JACOB, 2016).

Ainda não existem relatos da participação do *Fusobacterium necrophorum* na etiopatogenia de úlceras gástricas em suínos, no entanto, a bactéria *F. necrophorum* está ligada a diversas doenças, sempre em associação a outros micro-organismos, como abscessos hepáticos e *footrot* em bovinos (associado à *Arcanobacterium pyogenes*), necrobacilose em bovinos (associado à *Bacterioides melaninogenicus*), rinite necrótica em suínos (associado a outros micro-organismos anaeróbicos), dermatite interdigital em ovinos ou *footrot* (associado à *Dichelobacter nodosus*), disenteria em suínos (em associação com *Brachyspira hyodysenteriae* e *Bacterioides vulgatus*), entre outros (QUINN et al., 2001; GELBERG, 2013; HARGIS e GINN, 2013). De Witte e colaboradores (2017), na Bélgica isolaram bactérias do gênero *Fusobacterium* do estômago de suínos e sugeriram uma nova espécie para esse gênero: *Fusobacterium gastrosuis*. Acredita-se que a prevalência de infecções por *F. necrophorum* seja subestimada (NAGARAJA, 2016) e não há descrição de sua associação com o *H. suis*.

Tendo em vista que a suinocultura é uma das principais atividades econômicas do agronegócio brasileiro e que perdas devem ser evitadas a fim de satisfazer aos interesses da indústria e o bem-estar dos animais. Uma pesquisa sobre a presença *F. necrophorum* e *H. suis* e a relação com as lesões gástricas e sua gravidade foi proposta. Este trabalho objetiva avaliar a presença de *F. necrophorum* e *H. suis* em estômagos suínos sadios e com diferentes graus de lesões através da técnica de qPCR e da observação de micro-organismos através de lâminas histológicas coradas por prata e comparar essas técnicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras. Este trabalho foi aprovado sob o número de protocolo 167/2015 na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP.

As amostras de estômago foram coletadas de carcaças oriundas de oito granjas duas do Estado de São Paulo e seis do Mato Grosso do Sul em frigoríficos legalmente estabelecidos, cadastrados e inspecionados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. A obtenção desse material se deu após a etapa de evisceração durante o fluxograma de abate desses animais. O cálculo amostral levou em consideração o número de animais produzidos no país e chegou-se ao número de 150, foram colhidos 186 estômagos, desses, 69 apresentaram lesões. A partir disso, foi realizada a seleção dos casos e dos controles de cada granja separadamente para que a proporção de um caso para um controle (1:1) fosse alcançada e as condições a que os animais eram expostos fossem as mesmas, a exclusão das amostras foi aleatória para que não houvesse qualquer interferência na pesquisa. Para a classificação dos casos, foram consideradas as amostras cujo escore macroscópico foi maior ou igual a 2, pois é o grau em que as ulcerações passam a ser observadas na mucosa gástrica. O total de amostras analisadas foi de 126 sendo 63 casos e 63 controles. As amostras foram doadas pelos frigoríficos e encaminhadas ao Laboratório de Virologia onde foram processadas. As amostras foram mantidas sob refrigeração em até no máximo 48 horas após a colheita.

Análise macroscópica. A avaliação macroscópica das lesões dos estômagos analisados foi realizada conforme escore descrito por Sobestiansky, Matos e Souza (2001), a qual está demonstrada na Tabela 1. Essa avaliação foi realizada por dois ou mais pesquisadores por tratar-se de uma análise subjetiva e foi realizada por consenso.

TABELA 1. Escore e lesões observados pela análise macroscópica (SOBESTIANSKY, MATOS e SOUZA, 2001).

Escore	Lesões Macroscópicas
0	Estômago normal – Mucosa esofágica-gástrica com epitélio liso, brilhante e sem alterações visíveis
1	Paraqueratose – Mucosa esofágica-gástrica com epitélio proliferado, rugoso, sem brilho, podendo ter pequenas erosões
2	Paraqueratose e ulceração – Mucosa esofágica-gástrica com paraqueratose e ulceração menor que 33%
3	Paraqueratose e ulceração – Mucosa esofágica-gástrica com paraqueratose e ulceração entre 34% e 65%
4	Paraqueratose e ulceração – Mucosa esofágica-gástrica com paraqueratose e ulceração entre 66% e 100%

Análise histológica. Para a confecção das lâminas, os fragmentos de tecido foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24h e posteriormente acondicionados em álcool 70% até o encaminhamento para o Laboratório de Histologia da Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp de Botucatu/SP) para confecção das lâminas e coloração de Bielschowsky. As lesões histológicas dos estômagos foram avaliadas segundo escore descrito por Park, Kim e Park (1995), conforme descrito na Tabela 2.

TABELA 2. Classificação da presença de bactérias segundo Park, Kim e Park (1995).

Escore	Total de micro-organismos na lâmina
0	Nenhum
1	Poucos (1 a 3)
2	Alguns (3 a 10)
3	Muitos (>10)

Extração de DNA. O DNA foi extraído a partir de um fragmento de 20mg do estômago. Depois de pesado o material, o kit *GeneJET Genomic DNA Purification* (Thermo Fisher Scientific, USA) foi utilizado segundo as orientações do fabricante, sendo o DNA eluído com 100µL. Para todas as extrações de DNA foi feito um controle de extração utilizando água como amostra.

Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). A identificação do controle endógeno *c-myc*, foi realizada segundo Wilhelm e colaboradores (2006). Para a padronização da qPCR para detecção de *F. necrophorum* e *H. suis*, os *primers* descritos por Aliyu e colaboradores (2004) e Foss e colaboradores (2013) foram selecionados, respectivamente para cada agente. Esses pares de *primers* foram analisados pelas ferramentas OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies – IDT) e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – NCBI – NIH) onde não foi observado formação de dímeros ou “hairpins” e estão listados na Tabela 3.

TABELA 3. Primers utilizados para detecção do gene *c-myc*, *F. necrophorum* e *H. suis*.

Primer*	Alvo	Sequência (5' a 3')	Tamanho esperado do produto
<i>c-myc</i> F ¹	Controle endógeno	CTCCCTGAGACTCTGCCATC	208 pb
<i>c-myc</i> R ¹	gene <i>c-myc</i>	GCTGCCTCTTTTCCACAGAA	
RPOF ²	<i>F. necrophorum</i> gene	TCTCTACGTATGCCTCACGGATC	277 pb
RPOR ²	<i>rpoB</i>	CGATATTCATCCGAGAGGGTCTCC	
HsF ³	<i>H. suis</i> gene 16s	GGGAGGACAAGTCAGGTGTGAA	79 pb
HsR ³		TCTCCCACACTCCAGAAGGATAG	

¹Wilhelm et al., 2006; ²Aliyu et al., 2004; ³Foss et al., 2013; *: F - Forward, R - Reverse

As condições das qPCR (*c-myc*, *H. suis* e *F. necrophorum*) foram de 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, seguido da curva de dissociação de 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto, 95°C por 30

segundos e 60°C por 15 segundos. Para a realização das reações foi utilizado o equipamento de qPCR 7500 Fast Real-time PCR Systems (Applied Biosystems/Life Technologies).

Para cada reação foi adicionado 1X (5µL) de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, EUA), 0,3µM dos *primers forward* (F) e *reverse* (R); 2,4µL de água *nuclease free* e 2µL de DNA. O volume final da reação foi de 10µL. As amostras foram testadas em duplicata, além de terem sido adicionados controles negativos e positivos. As condições da reação para detecção do gene *c-myc* foram as mesmas descritas acima, exceto o volume dos primers que foi de 0,15µM e 0,2µM, respectivamente, sendo o volume final corrigido através do volume de água da reação.

Em cada placa de reação para detecção de *F. necrophorum* e *H. suis* foi realizada uma curva padrão, composta por cinco pontos, em triplicata, correspondentes à amostra pura e com diluições da amostra com água *nuclease free* de 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000. As amostras padrão de *F. necrophorum* e *H. suis* utilizadas para a realização da curva de diluição foram obtidas a partir do DNA extraído do raspado de estômagos enviados para a análise. Foi realizada PCR e foi visualizada a amplificação esperada, a partir disso foi realizado sequenciamento de Sanger e as sequências resultantes foram analisadas pelo software MEGA 6.0 (TAMURA, 2013). As sequências das amostras compatíveis com as bactérias foram utilizadas como amostras padrão para as curvas.

Análise dos resultados. A análise dos resultados das qPCR foi realizada no 7500 *software* v2.0.6 do equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR Systems (Applied Biosystems/Life Technologies). As curvas de diluição foram utilizadas para verificar a eficiência da reação e coeficiente de correlação r^2 entre Ct e diluições.

Para todos os agentes pesquisados as amostras foram consideradas positivas quando o Ct foi menor que 32 e negativas quando o Ct foi maior ou igual a 32 ou quando não apresentaram amplificação. As amostras consideradas positivas foram as que apresentaram curva de dissociação coincidente com o padrão.

O trabalho foi conduzido como um estudo de caso-controle. Para a análise dos resultados foi utilizado *Chi-quadrado* do *software Statistica* v.10 (StatSoft 2011) e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

As amostras apresentaram variações de Ct entre 17,81 a 25,06 para para o gene endógeno *c-myc* e todos os controles de extração foram negativos.

A qPCR para detecção de *F. necrophorum* foi padronizada com *threshold* de 0,4 e *baseline* do terceiro ao 15º ciclo. A temperatura de *melting* foi de 80,6°C ± 1,5°C. A curva padrão apresentou um *slope* de -3,274; interseção de 28,516; r^2 de 0,998 e uma eficiência da reação de 102,022%. Seis amostras (4,8%) foram positivas para o patógeno e a variação de Cts foi de 19,97 a 31,1.

TABELA 4. Número e porcentagem de estômagos positivos para *Fusobacterium necrophorum*.

		Úlcera		Total
		Negativo	Positivo	
<i>F. necrophorum</i>	Negativo	62 (51,7%)	58 (48,3%)	120 (100%)
	Positivo	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6 (100%)
	Total	63 (50%)	63 (50%)	126 (100%)

Foi detectado DNA de *F. necrophorum* em seis (4,8%) estômagos (Tabela 4) e a variação de Cts foi de 19,97 a 31,1. A partir desses resultados foi possível perceber que não houve associação significativa entre *F. necrophorum* com a presença de úlcera ($p=0,20$).

A qPCR para detecção de *H. suis* foi padronizada com *threshold* de 0,25 e *baseline* do terceiro ao 15º ciclo. A temperatura de *melting* foi de 76,3°C \pm 1,5°C. A curva padrão apresentou um *slope* de -3,303, interseção de 27,655; R² de 0,996 e uma eficiência da reação de 100,792%.

Das amostras analisadas, 16 (12,7%) das 126 foram positivas para o patógeno e 110 (87,3%) negativas, conforme demonstrado na Tabela 3. A variação nos Cts das amostras positivas foi de 26,01 a 31,99.

TABELA 5. Número e porcentagem de estômagos suínos positivos para *Helicobacter suis*.

		Úlcera		Total
		Negativo	Positivo	
<i>H. suis</i>	Negativo	59 (53,6%)	51 (46,4%)	110 (100%)
	Positivo	4 (25%)	12 (75%)	16 (100%)
	Total	63 (50%)	63 (50%)	126 (100%)

Foi encontrada uma associação significativa entre a presença de úlcera e de *H. suis* ($p<0,05$). Demonstrando que esse micro-organismo está envolvido com a presença das lesões.

As amostras positivas para *F. necrophorum* e para *H. suis* e o grau de lesão podem ser observados na Tabela 4. Das seis amostras positivas para *F. necrophorum*, cinco foram classificadas como escore 4 e uma como escore 1. Uma associação significativa ($p<0,05$) foi encontrada ao ser analisada a detecção de *F. necrophorum* e a gravidade das lesões. Já das 16 amostras positivas para *H. suis*, oito foram classificadas como escore 4, três como escore 3, uma como escore 2 e quatro como escore 1. Ao avaliar a presença de *H. suis* e o escore das úlceras, observa-se que houve associação significativa ($p<0,05$) entre a presença dessa bactéria e a gravidade das lesões.

TABELA 6. Classificação por escore de estômagos suínos positivos para *F. necrophorum* e *H. suis*.

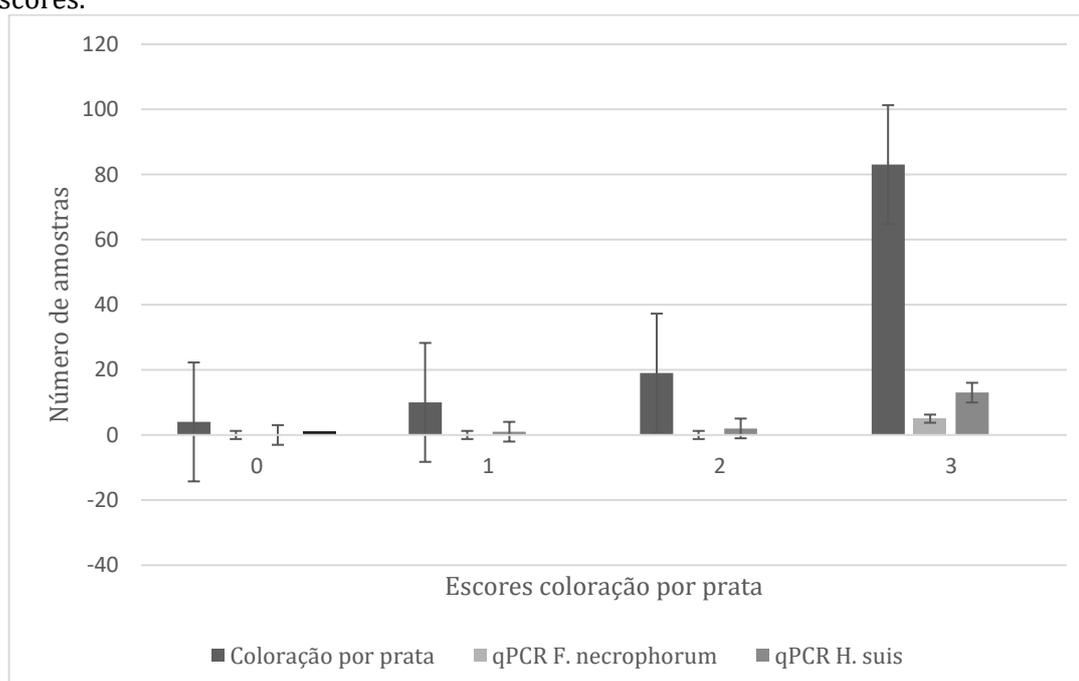
Escore	Nº total de amostras	Nº de amostras positivas (<i>F. necrophorum</i>)	Nº de amostras positivas (<i>H. suis</i>)
0	2 (1,6%)	0	0
1	61 (48,4%)	1 (16,7%)	4 (25%)
2	15 (11,9%)	0	1 (6,3%)
3	23 (18,3%)	0	3 (18,7%)
4	25 (19,8%)	5 (83,3%)	8 (50%)
Total	126 (100%)	6 (100%)	16 (100%)

Os fragmentos dos estômagos classificados macroscopicamente foram submetidos à análise histopatológica através da coloração por prata sendo classificados quanto à concentração de bactérias presentes na lâmina. O número de amostras por escore na coloração por prata e a relação com a qPCR está representado na Tabela 7.

TABELA 7. Classificação microscópica por coloração de prata e qPCR dos estômagos suínos.

Escore	Coloração por prata		qPCR (positivas)	
	nº de amostras		<i>F. necrophorum</i>	<i>H. suis</i>
0	4		0	0
1	10		0	1
2	19		0	2
3	83		5	13
Sem lâmina	10		1	0
Total	126		6	16

*Não foi possível a leitura de dez lâminas.

GRÁFICO 1. Comparação entre microscopia por coloração com prata e qPCR para *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* em estômagos suínos com o total de escores.

Também não houve diferença significativa entre os resultados da microscopia por coloração de prata e qPCR ($p = 0,9$), demonstrando que não há diferença para a detecção bacteriana entre as duas técnicas. A análise comparando a detecção bacteriana pela qPCR e pela microscopia através da coloração por prata e classificação por escores também não demonstrou diferença estatística ($p = 0,7$), conforme demonstrado no Gráfico 1, ou seja, houve maior número de amostras positivas para as bactérias na qPCR nas amostras cujo escore microscópico também foi maior.

DISCUSSÃO

Por tratar-se de um estudo de caso-controle, 63 estômagos foram classificados como sem lesões ou com lesões ulcerativas discretas ou iniciais apresentando ou não paraqueratose (escore 0 ou 1) e 63 foram classificados com lesões mais graves (escore 2 a 4).

A padronização e a realização de qPCR para o diagnóstico de *F. necrophorum* e *H. suis* foi realizada a fim de pesquisar a possível associação desses agentes com a presença de úlceras em estômagos suínos, sendo realizada a partir de fragmentos de tecido. Inicialmente, durante a padronização do experimento foi realizada a extração e detecção desses micro-organismos em amostras de raspado do conteúdo estomacal, no entanto, os fragmentos de tecido mostraram representar a biologia do estômago. O raspado da mucosa do estômago retirava todo o conteúdo da superfície de aproximadamente 50 cm² da região do quadrilátero esofágico, o que poderia não ser fidedigno como causa de lesão.

Na qPCR de *F. necrophorum*, foi detectado esse micro-organismo em seis (3,2%) das 126 amostras, das seis amostras positivas, cinco foram originadas de estômagos com úlceras e uma de estômago sadio não demonstrando valor estatisticamente significativo ($p=0,20$). No entanto, esses dados quando estratificados e analisados quanto a presença da bactéria e os graus das lesões, foi possível perceber que cinco, das seis amostras positivas foram de grau 4 e uma de grau 1, o que apresentou possível associação entre a presença de *F. necrophorum* e a gravidade das lesões ($p<0,05$).

Aliyu e colaboradores (2004) realizaram *swabs* para detectar a presença de *F. necrophorum*, de gargantas de pacientes com e sem dor de garganta e perceberam que houve associação desse patógeno concomitante à inflamação, demonstrando esse ser um material adequado para a pesquisa desse micro-organismo. As infecções causadas por *F. necrophorum* em animais são geralmente endógenas e iniciadas pela entrada em tecidos comprometidos, normalmente polimicrobianas (NAGARAJA, 2016), o que pode justificar a detecção dessa bactéria em lesões mais graves. Não existem relatos da associação de *F. necrophorum* com a presença de úlceras gástricas em suínos. De Witte e colaboradores (2017), identificaram uma nova espécie do gênero *Fusobacterium*, a partir de amostras de estômagos de suínos, a qual denominaram *Fusobacterium gastrosuis*. Os autores sugeriram que essa nova espécie precisa ser investigada para possível associação com o aparecimento de úlceras gástricas em suínos. No presente trabalho, o intuito foi detectar a associação de *F. necrophorum* com a presença de lesões em estômagos suínos, no entanto não foi possível, já a associação com a gravidade da lesão e a presença da bactéria sim.

Os resultados obtidos por meio da qPCR para detecção de *H. suis* em que as amostras de tecido foram testadas mostrou que 16 (12,7%) das 126 foram positivas para *H. suis*. Das 16 amostras positivas para *H. suis*, 12 foram oriundas de estômagos

com úlceras e quatro de estômagos saudáveis. Assim, foi possível estabelecer associação significativa entre a presença de úlcera e de *H. suis* ($p < 0,05$) mostrando que a presença desse micro-organismo parece estar envolvida com a presença das lesões. Esses resultados ao serem estratificados e analisados comparando também os graus de lesão demonstrou que das 16 amostras positivas para *H. suis* obtidas a partir de tecido, oito (50%) foram classificadas como escore 4, três (18,7%) como escore 3, uma (6,3%) como escore 2 e quatro (25%) como escore 1. Essa análise também revelou que houve associação significativa ($p < 0,05$) entre a detecção da bactéria em fragmento de tecido e a gravidade das lesões. Queiroz e colaboradores (1996), em um estudo no Brasil mostraram que a presença de *Helicobacter* em estômagos de suínos com lesões macroscópicas é mais comum do que em estômagos hígidos. Grasso e colaboradores (1999) na Itália analisaram 85 estômagos em um frigorífico, desses, 62 apresentaram gastrite e em oito desses 62 houve presença de *Helicobacter*. Em nenhum dos estômagos sem gastrite foi observado o micro-organismo, dessa forma os autores sugerem a relação da presença do gênero bacteriano com as lesões. Choi e colaboradores (2001) nos Estados Unidos, avaliaram 160 estômagos de suínos em um abatedouro e selecionaram 40 estômagos de cada grau de lesão (0 sem lesão; 1 paraqueratose; 2 com erosão e 3 com úlceras e cicatrizes). Os autores também utilizaram raspado da camada mucosa e detectaram *Helicobacter* sp. em 9 (22,5%) estômagos com grau 0; 21 (52,5%) grau 1; 34 (85%) grau 2 e 38 (95%) grau 3 e os resultados obtidos por eles demonstraram que quanto maior a severidade da úlcera maior a prevalência de *Helicobacter*. O resultado que é compatível com o reportado do presente estudo. O estudo realizado por Park, Hong e Park (2003) com camundongos experimentalmente infectados por *Helicobacter*, também demonstrou associação entre a infecção dos animais com a presença de gastrite. Por meio dos dados obtidos no presente estudo é possível inferir que a presença e severidade da lesão podem ter associação com a presença dessa bactéria. Yamasaki e colaboradores (2006) no Brasil examinaram 236 estômagos de suínos. As lesões do *pars esophagea* foram classificadas conforme a severidade em graus 0, 1, 2 e 3. A ulceração na região estava presente em 45 animais (19,1%). Utilizando a coloração de Warthin-Starry (outro tipo de coloração por prata), foi observado *Helicobacter* spp na mucosa gástrica de 112 (47,5%) amostras. Destas, 54 (48,2%) foram classificadas como úlceras de grau 2 ou 3 e 58 (51,8%) como grau 0 e 1. Dos animais positivos para o *Helicobacter* spp, 26 (23,2%) apresentavam úlceras na *pars esophagea* e 24 (21,4%) não. A análise estatística revelou que assim como no presente estudo não houve diferença significativa entre suínos com ou sem lesões gástricas em relação à presença de *Helicobacter* spp. Baele e colaboradores (2008) isolaram através de cultivo microbiológico, *H. suis* em três de cinco amostras de estômago coletadas de matrizes suínas em um abatedouro na Bélgica. Um estudo realizado através da infecção experimental de suínos pelo *H. suis* por De Bruyne e colaboradores (2012) também na Bélgica, mostrou que além de causar as úlceras gástricas, houve também diminuição de cerca de 10% no ganho de peso diário desses animais. Bracarense e colaboradores (2013) confirmaram presença de *Helicobacter* spp. em 47 dos 67 (70%) estômagos de animais saudáveis amostrados em um abatedouro no Brasil. Foss e colaboradores (2013) detectaram DNA de *H. suis* em estômagos de suínos nos Estados Unidos a partir de raspado da mucosa gástrica e de tecido e determinaram que o método do raspado foi mais sensível para a detecção de DNA de *H. suis*. Esses autores também avaliaram 118 estômagos e *H. suis* esteve presente em 55,1% deles. Por este se tratar de um estudo

de caso controle, não foi possível calcular a prevalência e como foram avaliados estômagos com e sem lesão em mesma proporção, houve um número menor de amostras positivas.

Das 6 amostras positivas para *F. necrophorum*, duas foram também positivas para *H. suis*. A hipótese inicial era de que o *H. suis* pudesse favorecer o desenvolvimento e multiplicação de *F. necrophorum*, o que não ficou comprovado, no entanto, o escore das lesões dessas duas amostras foi 4, o que demonstra o envolvimento das duas bactérias na gravidade das lesões.

Melnichouk e colaboradores (1999) no Canadá, analisaram amostras de quatro granjas de suínos, sendo que organismos semelhantes a *Helicobacter* foram encontrados em três das granjas e em 18 dos 95 (18,9%) estômagos com erosões e em 47 dos 104 (45,2%) estômagos sem lesões. O exame dos estômagos das granjas onde foram observados organismos semelhantes a *Helicobacter* revelou que há quase igual probabilidade de que organismos semelhantes a *Helicobacter* serem encontrados em estômagos com lesões como estômagos sem lesões. Fato, que concorda com o encontrado no presente trabalho, em que a presença de *H. suis* pode estar associada à presença de úlceras. Na Coreia, Park e colaboradores (2000) visualizaram micro-organismos compatíveis com *Helicobacter* em quatro (8%) de 50 estômagos avaliados, todos na região pilórica e não foram visualizados micro-organismos na região do *pars esophagus*. Na Tailândia a presença de *Helicobacter* spp. pela coloração de Warthin-Starry foi em 16,52% (19/115) das amostras analisadas, observado principalmente na superfície epitelial da região do *pars esophagus* do estômago (16/19). Os resultados encontrados pelos autores não mostraram correlação entre as alterações histopatológicas nos estômagos de suínos e a presença de *Helicobacter* spp. (Pirarat et al., 2007). Das 48 amostras de estômagos corados por prata, selecionados por Omotosho e colaboradores (2015) na Nigéria, 24 com lesões macroscópicas e 24 sem lesões, 17 (71%) dos estômagos com lesões e 9 (37,5%) dos estômagos sem lesão foram positivos para *Helicobacter* sp. na mucosa do fundo ou antro, apresentando maior frequência de infecção por espécies de *Helicobacter* em estômagos com lesões gástricas. Laryea e colaboradores (2016) em Gana, visualizaram a presença de bactérias espiraladas, compatíveis com o gênero *Helicobacter* coradas por prata em sete (29,2%) das 24 amostras analisadas. Neste trabalho em 112 (88,9%) das 126 amostras pelo menos uma célula bacteriana foi visualizada na coloração de prata. A coloração por prata é útil na visualização de micro-organismos, a fim de se verificar se há a presença desses no tecido analisado, no entanto, diferentemente da qPCR não há precisão de gênero ou espécie.

CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho foi possível concluir que não houve diferença quanto a detecção de bactérias através da técnica de qPCR e histologia pela coloração por prata. A presença de *Fusobacterium necrophorum* não parece estar relacionada à existência de úlceras gástricas, no entanto, pode estar relacionado ao agravamento das lesões. Já, *Helicobacter suis*, mostrou que pode estar relacionada tanto à presença de lesão no estômago quanto a gravidade da mesma.

REFERÊNCIAS

- ALIYU, S. H.; MARRIOTT, R. K.; CURRAN, M. D.; PARMAR, S.; BENTLEY, N.; BROWN, N. M.; BRAZIER, J. S. LUDLAM, H. Real-time PCR investigation into the importance of *Fusobacterium necrophorum* as a cause of acute pharyngitis in general practice. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, n. 10, p. 1029-1035, 2004.
- BAELE, M.; DECOSTERE, A.; VANDAMME, P.; CEELEN, L.; HELLEMANS, A.; MAST, J.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 6, p. 1350-1358, 2008.
- BRACARENSE, A. P. F. R. L.; YAMASAKI, L.; SILVA, E. O.; OLIVEIRA, R. L.; ALFIERI, A. *Helicobacter* spp. Infection Induces Changes in Epithelial Proliferation and E-cadherin Expression in the Gastric Mucosa of Pigs. *Journal of Comparative Pathology*, v.149, n.4, p. 402-409, 2013.
- CHOI, Y. K.; HAN, J. H.; JOO, H. S. Identification of Novel *Helicobacter* Species in Pig Stomachs by PCR and Partial Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 9, p. 3311-3315, 2001.
- DE BRUYNE, E.; FLAHO, B.; CHIERS, K.; MEYNS, T.; KUMAR, S.; VERMOOTE, M.; PASMANS, F.; MILLET, S.; DEWULF, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. An experimental *Helicobacter suis* infection causes gastritis and reduced daily weight gain in pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 160, p. 449–454, 2012.
- DE WITTE, C.; FLAHO, B.; DUCATELLE, R.; SMET, A.; DE BRUYNE, E.; CNOCKAERT, M.; TAMINIAU, B.; DAUBE, G.; VANDAMME, P.; HAESEBROUCK, F. Detection, isolation and characterization of *Fusobacterium gastrosuis* sp. nov. colonizing the stomach of pigs. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 42-50, 2017.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de Produção 2. Embrapa Suínos e Aves. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Suinos/SPSuinos/manejoprman.html#topo>> Acesso em: 30 ago 2015. 2003.
- EMBRAPA. Manual Brasileiro de Boas Práticas Agropecuárias na Produção de Suínos / Elaboração de Conteúdo Técnico Alexandre César Dias... [et al.] . Brasília, DF : ABCS; MAPA; Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2011. 140 p.; 29,7 cm .
- FOSS, D.; KOPTA, L.; PAQUETTE, J.; BOWERSOCK, T.; CHOROMANSKI, L.; GALVIN, J.; SANCHEZ, M. Identification of *Helicobacter suis* in pig-producing regions of the United States. *Journal of Swine Health and Production*, v. 21, p. 242-247, 2013.
- FOX, J. G. Cap. 25. Spiral Curved Organisms IV: *Helicobacter*- The Spiral Shaped Microorganisms. In: HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. *Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell Publishing Professional, 536p., 2004.

- FRIENDSHIP, R. 48. Gastric ulcers. 685-694p. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. Diseases of swine. 8th edition. Iowa State University Press: Ames, Iowa. 1209p. 1999.
- GELBERG, H. B. 7 Sistema Alimentar, Peritônio, Omento, Mesentério e Cavidade Peritoneal. In: ZACHARY, J. F; MCGAVIN, M. D. Bases da Patologia em Veterinária. 5ªEd. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 324-406.
- GRASSO, G. M.; RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M. L.; RUBERTO, A.; IANNITTO, G. Prevalence of Helicobacter-like organisms in porcine gastric mucosa: a study of swine slaughtered in Italy. *Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases*, v.19, n. 3, p.213-217, 1996.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; FLAHOUE, B.; CHIERS, K.; BAELE, M.; MEYNS, T.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R. Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 2, p. 202-223, 2009.
- HARGIS, A. M.; GINN, P. E. O Tegumento. In: ZACHARY, J. F; MCGAVIN, M. D. Bases da Patologia em Veterinária. 5ªEd. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 975-1087.
- JACOB, M. E. 24 Microrganismos espirais e curvos IV – *Helicobacter*. In: *Microbiologia Veterinária*. MCVEY, S.; KENEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2016.
- LARYEA, M. A.; EMIKPE, B. O.; ATTOH-KOTOKU, V.; OMOTOSHO, O. O.; ASARE, D. A.; ASENSO, N. T.; YEBOAH, R.; ADEJUMOBI, O. A. Mensah, M.; Okai, D. B. The Occurrence of Gastric Lesions in Slaughtered Pigs at the Kumasi Abattoir, Ghana. *Bangl. J. Vet. Med.* (2016). 14 (1): 85-91
- Melnichouk, S. I., Friendship, R. M., Dewey, C. E., Bildfell, R. J., & Smart, N. L. Helicobacter-like organisms in the stomach of pigs with and without gastric ulceration. *Journal of Swine Health and Production*, v. 7, n. 5, p. 201-205, 1999.
- NAGARAJA, T. G. 34 Anaeróbicos Gram-negativos que não formam esporos. In: *Microbiologia Veterinária*. MCVEY, S.; KENEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2016.
- Omotosho, O. O., Ayoade, G. O., Emikpe, B. O., Adediran, O. A., & Uwalaka, E. C. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 5, n. 10, p. 825-829, 2015.
- PARK, J. H.; HONG, J. J.; PARK, J. H. Experimental infection of mice with tightly coiled spiral bacteria (“*Candidatus Helicobacter suis*”) originating from the pig stomach. *Journal of Comparative Pathology*, v.129, n. 2, p. 154-160, 2003.
- PARK, Joongwon; KIM, Mi Kyung; PARK, Sill Moo. Influence of Helicobacter pylori colonization on histological grading of chronic gastritis in Korean patients with peptic ulcer. *The Korean Journal Of Internal Medicine*, v. 10, n. 2, p. 125, 1995.

PARK, J. H., LEE, B. J., LEE, Y. S., & PARK, J. H. Association of tightly spiraled bacterial infection and gastritis in pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 62, n. 7, p.725-729, 2000.

Pirarat, N., Sada, V., Wangnaitam, S., & Sunyasootcharee, B. Pathological Study of *Helicobacter* spp. infection in pig stomachs. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, v. 37, n. 1, p. 41-48, 2007.

QUEIROZ, D. M.; ROCHA, G. A.; MENDES, E. N.; DE MOURA, S. B.; DE OLIVEIRA, A. M.; MIRANDA, D. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. *Gastroenterology*, v.111, n. 1, p. 19-27, 1996.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Pathogenic anaerobic non-spore-forming Gram-negative bacteria. In: QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Wiley, 2001, p. 544.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. 35 Doenças de etiologia incerta. 1594-1639p. In: RADOSTITS, O.M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. 9ªEd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.1736p.

SOBESTIANSKY, J.; KIECKHÖFER, H. Condições diversas – Úlcera gástrica. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D. *Doença dos Suínos 2ªEd*. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p. 711-836.

SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M. P. C.; SOUZA, C. M. de. *Monitoria patológica de suínos em matadouros*. 52p., 2001.

TAMURA, K; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729 (2013)

WIHELM S., ZIMMERMANN P., SELBITZ H.J., TRUYEN U. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *Journal of Virological Methods*. v. 134. 257-260. 2006.

YAMASAKI, L.; ASSIS, F. M. S.; ROSSETO, V. J. V.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Lesões gástricas em suínos: Ocorrência e relação com o gênero, peso ao abate e presença de *Helicobacter* spp. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 27, n. 3, 2006.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho estudou a presença de úlceras gástricas em suínos. Foi conduzido como um estudo de caso-controle, um grupo de animais doentes (casos) e um grupo de animais não doentes (controles) foram selecionados e comparados com relação à presença do fator de risco (a presença das bactérias pesquisadas) (TRHUSFIELD, 2005). Por esse motivo, a partir da totalidade de estômagos analisados (n = 186), de oito granjas distintas, partiu-se de um grupo de suínos acometidos por úlceras, os casos, e comparou-se a outro grupo de suínos, que não apresentaram a lesão, os controles, dentro de cada granja individualmente, para que as condições as quais esses animais foram submetidos ao longo de sua criação não se tornassem fatores de interferência. Assim 63 estômagos sem lesão e 63 com lesão foram analisados quanto ao grau de lesão macroscópica, sendo classificados por escores, tipos celulares envolvidos nas lesões, gerando também uma classificação por escore microscópico e presença de *Fusobacterium necrophorum* e *Helicobacter suis* pelas técnicas de qPCR e histológica por coloração por prata.

O primeiro artigo apresentou dados relativos à classificação macroscópica e microscópica das lesões, comparando os escores observados em ambas classificações. Assim, nesse primeiro artigo evidenciou-se que as classificações macroscópica e microscópica apresentam várias divergências. Pode ser percebido por meio da literatura que há diversas formas de classificação da gravidade das lesões, mas que de maneira geral classificam os estômagos em sem lesão, lesões moderadas e graves. Por tratar-se de um estudo de caso-controle não pode ser realizada a estimativa de prevalência e incidência das lesões encontradas.

No segundo artigo, foi realizada a detecção de *F. necrophorum* e *H. suis* nos 126 estômagos (63 sem lesão e 63 com lesão) através de qPCR e analisada a presença desses micro-organismos nos diferentes graus de lesão. Foi realizada também uma comparação entre a detecção dos micro-organismos pela técnica de qPCR e de coloração por prata em lâminas histológicas. Neste artigo

verificou-se que não houve diferença estatística entre a detecção de micro-organismos pelas duas técnicas.

As infecções causadas por *F. necrophorum* em animais são geralmente endógenas e iniciadas pela entrada em tecidos comprometidos, normalmente polimicrobianas (NAGARAJA, 2016), o que pode justificar a detecção dessa bactéria em lesões mais graves. Não existem relatos da associação de *F. necrophorum* com a presença de úlceras gástricas em suínos. No entanto, De Witte e colaboradores (2017) identificaram uma nova espécie do gênero *Fusobacterium*, a partir de amostras de estômagos de suínos, a qual denominaram *Fusobacterium gastrosuis*. Os autores sugeriram que essa nova espécie precisa ser investigada para possível associação com o aparecimento de úlceras gástricas em suínos. Tal afirmação, é compatível com os resultados deste trabalho, tendo em vista que as espécies *F. necrophorum* e *F. gastrosuis* possuem diferenças em sua filogenia, sendo dessa forma diferentes espécies do mesmo gênero que podem estar relacionadas com o aparecimento das lesões nos estômagos dos suínos e não há outros relatos desses micro-organismos na etiopatogenia das úlceras gástricas.

Os resultados obtidos por Queiroz e colaboradores (1996) no Brasil mostraram que a presença de *Helicobacter* em estômagos de suínos com lesões macroscópicas é mais comum do que em estômagos hígidos. Grasso e colaboradores (1999) na Itália analisaram 85 estômagos em um frigorífico, desses, 62 apresentaram gastrite e em oito desses 62 houve presença de *Helicobacter*. Em nenhum dos estômagos sem gastrite foi observado o micro-organismo, dessa forma os autores sugerem a relação da presença do gênero bacteriano com as lesões. O estudo realizado por Park e Park (2003) com camundongos experimentalmente infectados por *Helicobacter*, também demonstrou associação entre a infecção dos animais com a presença de gastrite. Bracarense e colaboradores (2013) confirmaram presença de *Helicobacter* spp. em 47 dos 67 (70%) estômagos de animais sadios amostrados em um abatedouro no Brasil. Os resultados demonstrados por esses autores são semelhantes aos encontrados neste estudo, tendo em vista que a detecção de *H. suis* foi maior em estômagos classificados como os casos do estudo.

A partir do exposto e considerando os achados evidenciados nos dois artigos, pode-se inferir que a classificação macroscópica das lesões dos estômagos pode servir como uma forma de triagem a fim de demonstrar as condições de saúde do animal abatido. A histopatologia pode demonstrar o processo inflamatório desde o seu início, quando a lesão ainda não é visível macroscopicamente favorecendo o rastreamento das possíveis causas das lesões. A presença dos micro-organismos pesquisados parece estar ligada principalmente com a gravidade das lesões encontradas. *H. suis* parece estar relacionado tanto com a presença das lesões quanto com a gravidade das mesmas, enquanto *F. necrophorum* parece estar ligado apenas com o agravamento das lesões. Em algumas lâminas coradas por prata foi verificada a presença de bactérias, no entanto, não foram amostras positivas para os micro-organismos na qPCR, dessa maneira, outras técnicas devem ser utilizadas em estudos futuros para que sejam pesquisados outros micro-organismos com potencial efeito patogênico nos estômagos suínos.

BIBLIOGRAFIA

ABCS. Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. Mapeamento da suinocultura brasileira = Mapping of Brazilian Pork Chain / Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas; Associação Brasileira dos Criadores de Suínos.-- Brasília, DF, 2016. 376 p. : il. ; color.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. <http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/resumo>. Acesso em: 04 fev 2019. 2017.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>. Acesso em: 04 fev 2019. 2018.

ANDERSEN, R. N.; GANESHKUMAR, N.; KOLENBRANDER, P. E. *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium* spp. Oral Microbiology And Immunology, v. 13 n. 1, p. 51-54, 1998.

ARGENZIO, R. A. Funções Gerais do Trato Gastrointestinal e seu Controle. Capítulo 23. 353-361p. In: REECE, W. O. Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos. Décima segunda edição. 926p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BAELE, M.; DECOSTERE, A.; VANDAMME, P.; CELEN, L.; HELLEMANS, A.; MAST, J.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 6, p. 1350-1358, 2008.

BIK, E. M.; ECKBURG, P. B.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; PURDOM, E. A.; FRANCOIS, F.; PEREZ-PEREZ, G.; BLASER, M. J.; RELMAN, D. A. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 3, p. 732-737, 2006.

BRACARENSE, A. P. F. R. L.; YAMASAKI, L.; SILVA, E. O.; OLIVEIRA, R. L.; ALFIERI, A. A. *Helicobacter* spp. Infection Induces Changes in Epithelial Proliferation and E-cadherin Expression in the Gastric Mucosa of Pigs. *Journal Of Comparative Pathology*, v.149, n.4, p. 402-409, 2013.

CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, C.J.B.; MARTINEZ, P.A.O.; MAZZUCATO, B.C.; ALESSI, A.C. Frequência de lesões gástricas em suínos destinados ao abate na região de Ribeirão Preto, SP. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 3, p. 223-228, 1999.

DALLA COSTA, O. A.; da Costa, M. J. R. P.; LUDKE, J. V.; COLDEBELLA, A.; KICH, J. D.; PELOSO, J. V.; FAUCITANO, L.; DALLA ROZA, D. Tempo de jejum dos suínos no manejo pré-abate sobre a perda de peso corporal, o peso do conteúdo estomacal e a incidência de úlcera esofágica-gástrica. *Ciência Rural*, v. 38, n. 1, 2008.

DALLA COSTA, O. A.; COLDEBELLA, A.; da COSTA, M. J. R. P.; FAUCITANO, L.; PELOSO, J. V.; LUDKE, J. V.; SCHEUERMANN, G. N. Período de descanso dos suínos no frigorífico e seu impacto na perda de peso corporal e em características do estômago. *Ciência Rural*, v. 36, n. 5, 2006.

DE BRUYNE, E.; FLAHO, B.; CHIERS, K.; MEYNS, T.; KUMAR, S.; VERMOOTE, M.; PASMANS, F.; MILLET, S.; DEWULF, J.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. An experimental *Helicobacter suis* infection causes gastritis and reduced daily weight gain in pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 160, p. 449–454, 2012.

DE COOMAN, L.; FLAHO, B.; HOUF, K.; SMET, A.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F. Survival of *Helicobacter suis* bacteria in retail pig meat. *International Journal Of Food Microbiology*, v. 166, n.1, p. 164-167, 2013.

DE COOMAN, L.; HOUF, K.; SMET, A.; FLAHO, B.; DUCATELLE, R.; DE BRUYNE, E.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F. Presence of *Helicobacter suis* on pork carcasses. *International Journal Of Food Microbiology*, v. 187, p. 73-76, 2014.

DE ROUCHEY, J. D. et al. Swine Nutrition Team. Disponível em: <<http://www.thepigsite.com/articles/2749/digestive-system-of-the-pig-anatomy-and-function/>> Acesso em: 20 mai 2015.

DE WITTE, C.; FLAHO, B.; DUCATELLE, R.; SMET, A.; DE BRUYNE, E.; CNOCKAERT, M.; TAMINIAU, B.; DAUBE, G.; VANDAMME, P.; HAESBROUCK, F. Detection, isolation and characterization of *Fusobacterium gastrosuis* sp. nov. colonizing the stomach of pigs. *Systematic And Applied Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 42-50, 2017.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de Produção 2. Embrapa Suínos e Aves. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Suinos/SPSuinos/manejoprman.html#topo>> Acesso em: 30 ago 2015. 2003.

EMBRAPA. Manual Brasileiro de Boas Práticas Agropecuárias na Produção de Suínos / Elaboração de Conteúdo Técnico Alexandre César Dias... [et al.] . Brasília, DF : ABCS; MAPA; Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2011. 140 p.; 29,7 cm .

FERNANDEZ, H. Cap. 48 Gênero Helicobacter. In: In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia 4ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2004. p. 353-358.

FOX, J. G. Cap. 25. Spiral Curved Organisms IV: Helicobacter- The Spiral Shaped Microorganisms. In: HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. Veterinary Microbiology. 2nd ed. Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell Publishing Professional, 536p., 2004.

FRIENDSHIP, R. 48. Gastric ulcers. 685-694p. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. Diseases of swine. 8th edition. Iowa State University Press: Ames, Iowa. 1209p. 1999.

GELBERG, H. B. 7 Sistema Alimentar, Peritônio, Omento, Mesentério e Cavidade Peritoneal. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. Bases da Patologia em Veterinária. 5ªEd. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 324-406.

GRASSO, G. M.; RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M. L.; RUBERTO, A.; IANNITTO, G. Prevalence of Helicobacter-like organisms in porcine gastric mucosa: a study of swine slaughtered in Italy. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, v.19, n. 3, p.213-217, 1996.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. O Tegumento. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. Bases da Patologia em Veterinária. 5ªEd. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 975-1087.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; FLAHO, B.; CHIERS, K.; BAELE, M.; MEYNS, T.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R. Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 2, p. 202-223, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/20523-em-2017-cresce-abate-de-bovinos-e-suinos-mas-cai-o-de-frangos>. Acesso em: 04 fev 2019. 2018.

JACOB, M. E. 24 Microrganismos espirais e curvos IV – *Helicobacter*. In: *Microbiologia Veterinária*. MCVEY, S.; KENEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2016.

KÖNIG, H. E.; SAUTET, J.; LIEBICH, H. G. 7 Aparelho Digestório. 15-80p In: KÖNIG, HORST ERICH; LIEBICH, HANS-GEORG. *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. Volume 2. 399p. Porto Alegre: Artmed, 2004

LIU, J.; HE, L.; HAESEBROUCK, F.; GONG, Y.; FLAHO, B.; CAO, Q.; ZHANG, J. Prevalence of Coinfection with Gastric Non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* (NHPH) Species in *Helicobacter pylori*-infected Patients Suffering from Gastric Disease in Beijing, China. *Helicobacter*. 2014.

LOWE, B. A.; MARSH, T. L.; ISAACS-COSGROVE, N.; KIRKWOOD, R. N.; KIUPEL, M.; MULKS, M. H. Microbial communities in the tonsils of healthy pigs. *Veterinary microbiology*, v. 147, n. 3, p. 346-357, 2011.

MARTINEZ, M. B.; UZEDA, M. Outros Bacilos Anaeróbicos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia 4ª Edição*. São Paulo: Editora Atheneu. 2004. p. 395-398.

NAGARAJA, T. G. 34 Anaeróbicos Gram-negativos que não formam esporos. In: Microbiologia Veterinária. MCVEY, S.; KENEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2016.

PARK, J. H.; HONG, J. J.; PARK, J. H. Experimental infection of mice with tightly coiled spiral bacteria (“*Candidatus Helicobacter suis*”) originating from the pig stomach. *Journal Of Comparative Pathology*, v.129, n. 2, p. 154-160, 2003.

QUEIROZ, D. M.; ROCHA, G. A.; MENDES, E. N.; DE MOURA, S. B.; DE OLIVEIRA, A. M.; MIRANDA, D. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. *Gastroenterology*, v.111, n. 1, p. 19-27, 1996.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. ; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Pathogenic anaerobic non-spore-forming Gram-negative bacteria. In: QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. ; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Wiley, 2001, p. 544.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. 35 Doenças de etiologia incerta. 1594-1639p. In: RADOSTITS, O.M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. 9ªEd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.1736p.

RAMOS-VARA, J A ; DURAN, O ; RENDER, J A ; PATTERSON, J S. Necrotising stomatitis associated with *Fusobacterium necrophorum* in three sows. *The Veterinary Record*, v.143, n. 10, p.282-283, 1998.

SOBESTIANSKY, J.; KIECKHÖFER, H. Condições diversas – Úlcera gástrica. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D. *Doença dos Suínos* 2ªEd. Goiânia: Cânone Editorial, 2007. p. 711-836.

SOBESTIANSKY, J.; KIECKHÖFER, H. ÚLCERA GÁSTRICA. In: Doenças dos suínos. 2ª ed. 2012.

SWABY, H.; GREGORY, N.G. A note on the frequency of gastric ulcers detected during post-mortem examination at a pig abattoir. *Meat Science* v.90 p.269–271, 2012.

TAN, Z. L.; NAGARAJA, T. G.; CHENGAPPA, M. M. *Fusobacterium necrophorum* infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Veterinary Research Communications*, v. 20, n. 2, p. 113-140, 1996.

VAN DEN BULCK, K.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DRIESSEN, A.; DEBONGNIE, J. C.; BURETTE, A.; BURETTE, A.; STOLTE, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Identification of non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *Journal Of Clinical Microbiology*, v.43, n. 5, p. 2256-2260, 2005.

ZHOU, H.; DOBBINSON, S.; HICKFORD, J. G. *Fusobacterium necrophorum* variants present on the hooves of lame pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 3, n. 141, p. 390, 2010.