

Úlceras gástricas em suínos de abate: cultivo de *Arcobacter* spp. a partir de estômagos com diferentes graus de lesões

Gastric Ulcers in Fattening Pigs: Isolation of *Arcobacter* spp. from Stomachs with Different Severity of Lesions

Sérgio José de Oliveira¹, Roberto Tesi Bernardi¹, Felipe Inácio Vogt¹, Marília Scartezzini¹, Diego Hepp² & Vagner Ricardo Lunge³

ABSTRACT

Background: Gastric ulcers are found mainly into *pars oesophagea* region of the pig stomach. The lesions occur with different severity degrees. Score 1 consists of paracheratosis; score 2 paracheratosis and mild ulceration; score 3 paracheratosis and 66% ulceration; score 4 strong ulceration. Scores 3 and 4 cause mortality; lesions score 1 and 2 are responsible by performance losses, the animals showing stomach lesions at slaughter. The causes of these lesions are variable, being the most important stress and the adopted nutrition. The role of bacteria in the development of gastric ulcers in pigs has been poorly investigated. This paper reports the evaluation of stomachs taken from slaughter pigs and submitted to bacteriological examination aiming the isolation of *Arcobacter* spp.

Materials, Methods & Results: Stomachs of slaughter pigs (20,792) were evaluated at an abattoir in Rio Grande do Sul, Brazil. Around 600 stomachs were examined daily and a piece from each degree of lesion was collected aseptically, 4 samples each day for 40 days, a total of 160 samples for bacteriological examination. Also were collected materials from oesophagic region of 24 stomachs without visible lesions, for laboratorial examination. Samples were inoculated into liquid EMJH medium and transported to the laboratory, being incubated at 25°C, five days. Cultures were filtered through 0.45 mm membrane over the surface of Blood Agar medium and the plates incubated aerobically at 25-30°C, two days. Colonies suspected of being *Arcobacter* spp. were transferred to Brain Heart Infusion Broth (BHI) medium and incubated as before. Cultures were evaluated by darkfield microscopy. After confirmation of the presence of the bacteria, DNA investigation was performed by polymerase chain reaction to differentiate *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri*. The macroscopic evaluation of 20,792 stomachs showed 12,148 (58.4%) score 1, 5,145 (24.7%) score 2, 1,004 (4.8%) score 3 and 368 (1.8%) score 4, being 2,135 (10.3%) without lesion. Laboratorial examination detected *Arcobacter* spp. into 124 (83.72%) of 148 samples, 98 (79.03%) *A. cryaerophilus* and 26 (20.97%) *A. butzleri*.

Discussion: The presence of different degrees of stomach lesions into 89.7% of the slaughter pigs evaluated is higher than described in previous reports. These results demonstrate a high frequency of gastric ulcers in Brazilian pigs. *Arcobacter* spp. were detected in stomachs with different severity of lesions and also into apparently normal stomachs. There was higher frequency of *A. cryaerophilus* (79.03%). These bacteria were also previously isolated from gastric ulcer of a nursery pig in Brazil. This is the first report of the detection of *Arcobacter* spp. in stomachs of slaughter pigs in Brazil.

Keywords: *Arcobacter* spp., stomachs of pigs, gastric ulcers.

Descritores: *Arcobacter* spp., estômago de suínos, úlceras gástricas.

INTRODUÇÃO

As úlceras gástricas em suínos afetam principalmente a região denominada *pars oesophagea* (quadrilátero esofágico) que não possui glândulas secretórias. As lesões no estômago são classificadas em vários graus [17]: grau 1, quando ocorre paraqueratose, grau 2 paraqueratose e ulceração leve, grau 3 paraqueratose e ulceração até 66% e grau 4 quando há ulceração acima de 66% da região. Os graus 3 e 4 são capazes de provocar morte súbita em suínos nas granjas, enquanto lesões mais leves (1 e 2) provocam perdas no ganho de peso e refugagem. A úlcera gástrica (UG) é mais frequente em suínos criados intensivamente em confinamento, sendo observadas em frigorífico ao exame de estômagos e é uma das principais causas de morte súbita e esporádica de reprodutores [18]. Úlceras gástricas também podem ocorrer em leitões de creche [13]. As causas das lesões estomacais são múltiplas, ligadas a fatores ambientais, de manejo, nutricionais e estressantes, entre outras, conforme revisão de Almeida *et al.* [1]. Suínos que consomem ração com granulometria fina (abaixo de 500 μm) estão mais propensos a apresentar lesões na *pars oesophagea*. Por outro lado, a interrupção da alimentação (o jejum) tem sido relatada como importante causa de lesões ulcerativas [7]. Fatores genéticos também predis põem a ulceração na região esofágica do estômago em suínos [16]. É necessário aprofundar os conhecimentos sobre a etiologia de úlceras gástricas em suínos pois causam grande prejuízo econômico e prejudicam o bem estar dos animais [4]. Em seres humanos, foi comprovado que infecção por *Helicobacter pylori* está relacionada com a ocorrência de úlcera gástrica [17], no entanto, esta bactéria até o momento não foi apontada como agente etiológico de úlceras gástricas em suínos, o mesmo ocorrendo com outras bactérias. Ainda não está definido se o circovirus suíno (PCV2) tem ação direta na formação de úlceras gástricas, embora muitos animais com sinais de definhamento apresentem também úlcera gastroesofágica [5,18].

Através desta pesquisa procurou-se verificar os graus de lesões observadas em suínos abatidos em frigorífico e detectar a presença de bactérias do gênero *Arcobacter*. Estas bactérias foram isoladas de fetos suínos abortados no Rio Grande do Sul [10], de carne de frangos e de suínos [11,12], e provocam enterite em seres humanos [6,8,21]. Em suínos de

abate, *Arcobacter* spp. foram detectadas pela PCR em estômagos somente em um trabalho nos Estados Unidos [20].

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi examinada a *pars oesophagea* de estômagos de suínos abatidos em um frigorífico no Rio Grande do Sul, classificando lesões nos diferentes graus, desde zero (sem lesão) a 4 (paraqueratose e ulceração acima de 66%). Aproximadamente 600 estômagos foram examinados diariamente, anotando-se os graus das lesões. Foi colhido um fragmento de lesão respectivamente de grau 1, grau 2, grau 3 e grau 4, no total de 4, separadas entre os estômagos examinados naquele respectivo dia, no total de 4 amostras de estômagos diários, durante 40 dias, para processamento visando cultivo e realização de testes moleculares, no total de 160 materiais. Além de estômagos com lesões, foram colhidas também 4 amostras diariamente, durante 6 dias da região esofágica de estômagos sem lesão, de vários lotes de suínos, no total de 24 materiais. Teve-se o cuidado de trocar de luvas e lâminas de bisturis para a colheita de cada amostra.

As amostras foram inoculadas em meio de cultura líquido de EMJH em tubos [12], ainda no Frigorífico, e os tubos foram transportados no período de uma hora, ao laboratório. No laboratório os tubos foram incubados a 25°C até 5 dias e as culturas foram examinadas em microscópio em campo escuro para que fossem observados microorganismos com a forma e motilidade de *Arcobacter* spp. Os cultivos em meio líquido foram então filtrados através de membrana de celulose acetato de 0,45 mm sobre a superfície de meio sólido de Ágar Sangue de acordo com o método de Steele & Mcdermott [19], sendo então incubados a 25-30°C em aerobiose por 48 h, para obtenção de cultivo puro. Colônias foram repicadas em tubos com meio de cultura líquido de BHI (Difco) e também incubadas em placas de Ágar Sangue. Após a confirmação da presença de bactérias com morfologia típica de *Arcobacter* em cultivo puro através do exame microscópico em campo escuro, foram colhidas alíquotas em tubos Eppendorf e congeladas, aguardando a realização de testes moleculares.

Para a realização de testes moleculares o DNA foi extraído conforme o protocolo de Boom *et al.* [2]. Alíquotas de 100 μL de cultura foram lisadas em 900 μL de buffer (solução tampão) GuSCN, o ácido nucléico foi aderido a partículas de sílica e lavado duas vezes com o buffer uma vez com solução de etanol a 70% e uma com acetona. O ácido nucléico

DISCUSSÃO

foi então liberado das partículas de sílica em 50 µL de água, sendo mantido a -20°C. Foi amplificado um fragmento de 470 pares de bases (pb) do gene 16S do RNA ribossomal do genoma de bactérias do gênero *Arcobacter*, utilizando-se a técnica de PCR com primers ARC3F e ARC4R, após a extração do DNA pela técnica de sílica [2]. A diferenciação entre as espécies *Arcobacter cryaerophilus* e *Arcobacter butzleri* foi realizada pela clivagem do fragmento amplificado, utilizando-se a enzima de restrição *Ssp1*, procurando-se obter a formação dos fragmentos 420 e 50 pb para *A. butzleri* ou fragmento intacto de 470 pb para *A. cryaerophilus*. Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata [15].

RESULTADOS

Foram examinados macroscopicamente 20.792 estômagos de suínos, de 80 lotes, classificando-se as lesões de úlcera gástrica como 12.148 grau 1 (58,4%), 5.145 grau 2 (24,7%), 1.004 grau 3 (4,8%) e 368 grau 4 (1,8%), sendo 2.135 sem lesões (10,3%). Portanto, 18.657 (89,7%) apresentaram algum grau de lesão. Foram obtidas apenas 31 amostras de grau 4. Assim sendo, estabeleceu-se examinar a mesma quantidade de amostras para todos os graus, 1, 2, 3, e mais 24 amostras de estômagos sem lesão. Entre 148 amostras de estômagos, foram obtidos isolamentos de *Arcobacter* de 124 materiais, perfazendo 83,72%. *Arcobacter* spp foram isolados tanto de amostras com lesões quanto de amostras sem lesão. Os resultados encontram-se na Tabela 1 e Figuras 1, 2 e 3.

No presente trabalho, encontrou-se 89,7% de amostras de estômagos com diferentes graus de lesão na região esofágica e apenas 10,3% sem lesão. A quantidade de estômagos examinados foi acima do que consta em relatos de outros autores [1,3,9], havendo predominância de lesões menos graves do tipo 1 e 2, respectivamente 12.148 (58,4%) e 5.145 (24,7%) como seria esperado, pois os animais chegaram aparentemente sadios ao abate. Suínos com lesões de grau 4 apresentariam sintomas de úlcera gástrica nas granjas e não teriam sido enviados ao matadouro. Através desta pesquisa foi detectado *Arcobacter* spp nos diversos graus de lesão e também em estômagos sem lesão. Estas constatações não são suficientes para deduzir sobre a importância das bactérias em casos de úlcera gástrica, mas constituem-se no primeiro relato em nosso país sobre a presença de *Arcobacter* spp em estômagos de suínos em idade de abate. Até o momento, apenas Suarez *et al.*, [20] nos Estados Unidos haviam investigado sobre a presença das bactérias em estômagos de suínos. nesta faixa etária. Estes autores detectaram pela PCR o domínio de *A. butzleri* em 77% dos materiais. No presente trabalho verificou-se maior porcentagem de *A. cryaerophilus* (79,03%) em suínos abatidos no Brasil. *A. cryaerophilus* anteriormente foi isolado de lesão de grau 1 em estômago de leitão de creche no Rio Grande do Sul [13] concluindo-se que os microorganismos, bem como lesões em estômago de suínos, podem ocorrer bem cedo, na creche.

Tabela 1. Resultados dos exames macroscópicos, bacteriológicos e moleculares realizados em amostras de estômagos de suínos de abate com diferentes graus de lesões gástricas em frigorífico, RS-Brasil.

Graus de Lesões	Materiais examinados	Cultivo de <i>arcobacter</i>	PCR <i>arcobacter</i>	PCR <i>A.cryaerophilus</i>	PCR <i>A.utzleri</i>
0*	24	21 (87,5%)	21	18 (85,70%)	3 (14,30%)
1	31	26 (83,87%)	26	21 (80,76%)	5 (19,24%)
2	31	27 (87,10%)	27	19 (70,37%)	8 (29,63%)
3	31	26 (83,87%)	26	21 (80,76%)	5 (19,24%)
4	31	24 (77,42%)	24	19 (79,16%)	5 (20,84%)
Totais	148	124 (83,72%)	124	98 (79,03%)	26 (20,97%)

* Estômagos sem lesão.

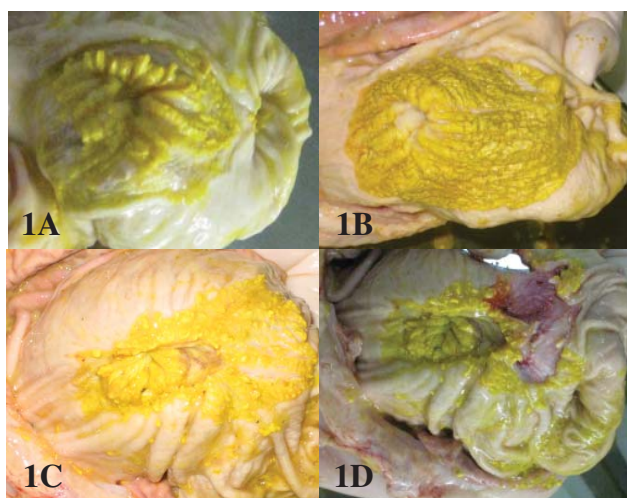


Figura 1. Graus de lesões em estômagos de suínos: **1A** - grau 1 (paraqueratose). **1B** - grau 2 (paraqueratose e presença de sulcos). **1C** - grau 3 (presença de erosões). **1D** - grau 4 (ulceração, hemorragia).



Figura 2. Estômago normal de suíno, sem lesões.

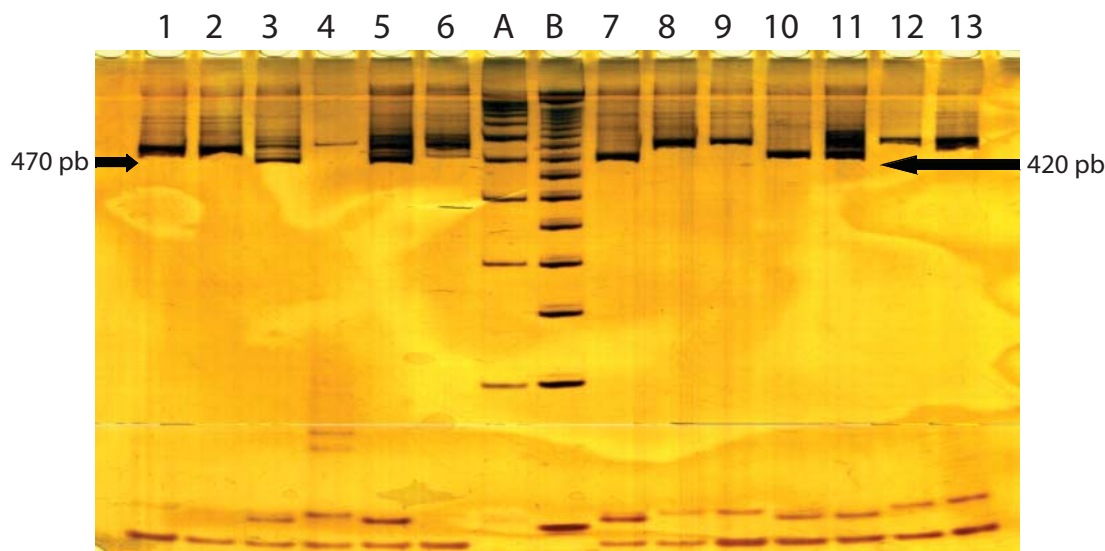


Figura 3. Gel de poliacrilamida 10% mostrando os diferentes fragmentos obtidos após amplificação com primers Arc-3F e Arc-4R e digestão com a enzima de restrição *Ssp I*. Os números 1, 2, 4, 6, 8, 9, 12 e 13 são de amostras que apresentaram o fragmento de 470 pares de bases, sendo identificadas como *A. cryaerophilus*. Os números 3, 5, 7, 10 e 11 são de amostras que apresentaram o fragmento de 420 pares de bases, sendo identificadas como *A. butzleri*. As letras A e B indicam marcadores de peso molecular de 100 e 50 pares de bases, respectivamente.

Os resultados do presente trabalho poderiam descartar a possibilidade de *Arcobacter* spp. serem agentes etiológicos de úlcera gástrica em suínos, visto que as bactérias foram também detectadas em estômagos sem lesão. Por outro lado a presença das mesmas em estômagos normais poderia constituir-se numa fase inicial predispondo à ocorrência de lesões. Isto até o momento não está comprovado. No entanto não se pode descartar a hipótese de os

microorganismos serem componentes da microbiota normal do estômago de suínos.

Em suínos, ao contrário do que ocorre em seres humanos, as úlceras esofago-gástricas não têm sido atribuídas a causas infecciosas [9]. No entanto, em um estudo sobre úlceras gástricas em suínos que apresentavam a síndrome multissistêmica do definhamento [5] foi detectado antígeno de PCV2 em todos os linfonodos gástricos, sendo sugerido que o

circovirus seria um fator adicional no desenvolvimento de úlceras gástricas. A presença de *Arcobacter* spp na mucosa do estômago de suínos é sugestiva de que devem ser investigados os possíveis efeitos no mecanismo das úlceras gástricas, talvez pela realização de exames histopatológicos e determinação do local em que estejam alojados os microorganismos.

CONCLUSÕES

Foi observada elevada porcentagem de estômagos com lesões, incluindo os quatro graus com formação de úlcera gástrica, em suínos de diferentes lotes com idade de abate, demonstrando a importância desta pato-

logia. Através do presente trabalho conclui-se que *Arcobacter* spp. estavam presentes em elevada porcentagem de estômagos de suínos abatidos em um frigorífico, com e sem lesões de úlcera gástrica. Houve maior porcentagem de *Arcobacter cryaerophilus* através de cultivo e identificação por PCR. Estas são as primeiras observações sobre a presença de *Arcobacter* spp. em estômagos de suínos de abate no Brasil.

Agradecimentos. Os autores agradecem à Técnica de Laboratório Jane Mendes Brasil pelos serviços prestados na elaboração de meios de cultura e inoculações de materiais.

REFERÊNCIAS

- 1 Almeida M.N., Vearick G., Lippke R.T., Lagemann F.L., Correa A.M.R. & Barcellos D.E.S.N. 2006. Úlceras gástricas em suínos. *A Hora Veterinária*. 26(153): 62-66.
- 2 Boom R., Sol C.J.A. & Salimans M.M.M. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(3): 495-503.
- 3 Carvalho L.F.O.S., Oliveira C.J.B., Martinez P.A.O., Mazzucato B.C. & Alessi A.C. 1999. Frequência de lesões gástricas em suínos destinados ao abate na região de Ribeirão Preto, SP. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 51(3): 223-228.
- 4 Correa A.M.R., Santos A.S., Guagnini F.S., Bandarra P.M., Pavarini S.P., Driemeier D. & Barcellos D.E.S.N. 2007. Úlceras gástricas em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(Supl 1): s101-s104.
- 5 Correa A.M.R., Zlotowski P., Barcellos D.E.S.N., Cruz C.E.F. & Driemeier, D. 2008. Gastric ulcers in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(12): 601-605.
- 6 Fernandez H., Krause S. & Villanueva M.P. 2004. *Arcobacter butzleri* an emerging enteropathogen: communication of two cases with chronic diarrhea. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35(3): 216-218.
- 7 Friendship R. 1999. Gastric ulcers. In: Straw B.E., Dallaire S., Mengeling L. & Taylor D.J. (Eds). *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University Press, pp.685-694.
- 8 Lauwers S., Breynaert J. & Van Etterijk H. 1996. *Arcobacter butzleri* in the elderly in Belgium. In: Newell D.G., Ketley J.M. & Feldman R.A. (Eds). *Campylobacters, Helicobacters and related organisms*. New York: Plenum Press, pp.515-517.
- 9 Melnichouk S.I. 2002. Mortality associated with gastric ulceration in swine. *Canadian Veterinary Journal*. 43(3): 223-225.
- 10 Oliveira S.J., Baetz A.L., Wesley I.V. & Harmon K.M. 1997. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Veterinary Microbiology*. 57(4): 347-354.
- 11 Oliveira S.J., Moraes H.L.S., Kuchenbecker B.S. & Ikuta N. 2001. Isolation of *Arcobacter* spp. from poultry carcasses, in Brazil. *Ciência Rural*. 31(4): 639-643.
- 12 Oliveira S.J., Ikuta N., Lunge V.R., Fonseca A. & Moraes H.L.S. 2003. Isolamento de *Arcobacter butzleri* de músculos de carcaças de suínos de terminação e de matrizes descartadas abatidos em um matadouro no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. 33(5): 889-892.
- 13 Oliveira S.J., Bernardi R.T., Mottin V.D., Hepp D. & Passos D.T. 2009. Observação de diferentes graus de lesões em estômagos e úlcera gástrica em leitões de creche, Isolamento de *Arcobacter cryaerophilus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(2):119-123.
- 14 Queiroz D.M.M., Rocha G.A. & Mendes E.N. 1996. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the *pars oesophagea* in swine. *Gastroenterology*. 111(1): 19-27.
- 15 Sanguinetti C.J., Dias-Neto E. & Simpson A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17(5): 914-921.

- 16 Sobestiansky J., Barcellos D.E.S.N., Mores N., Oliveira S.J. & Carvalho L.F. 1999.** *Clínica e Patologia Suína*. 2.ed. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 463p.
- 17 Sobestiansky J., Matos M.P.C. & Souza C.M. 2001.** *Monitoria patológica de suínos em matadouro*. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 52p.
- 18 Sobestiansky J. & Barcellos D.E.S.N. 2007.** *Doenças de Suínos*. Goiânia: Câne Editorial, 767p.
- 19 Steele T.W. & MCDermott S.N. 1984.** Technical note: the use of membrane filters applied directly to the surface of Agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*. 16(3): 263-265.
- 20 Suarez D.L., Wesley I.V. & Larson D.J. 1997.** Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine. *Veterinary Microbiology*. 57(4):325-336.
- 21 Vandenberg O. Dediste A., Houf K. & Ibeckwen S. 2004.** *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Diseases*. 10(10):1863-1867.