

FÁBIO ANTÔNIO TIRONI

**ESPIROQUETOSE INTESTINAL HUMANA EM JOINVILLE (BRASIL):  
ESTUDO PATOLÓGICO DE 24 CASOS**

JOINVILLE

2015

FÁBIO ANTÔNIO TIRONI

**ESPIROQUETOSE INTESTINAL HUMANA EM JOINVILLE (BRASIL):  
ESTUDO PATOLÓGICO DE 24 CASOS**

Dissertação de mestrado apresentada  
como requisito para obtenção do título  
de Mestre em Saúde e Meio  
Ambiente, na Universidade da Região  
de Joinville. Orientador: Prof. Dr.  
Paulo Henrique Condeixa de França.

JOINVILLE

2015

Catalogação na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Tironi, Fábio Antônio

T597e Espiroquetose intestinal humana em Joinville (Brasil): estudo patológico de 24 casos / Fábio Antônio Tironi; orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França – Joinville: UNIVILLE, 2015.

39 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Espiroquetose intestinal humana. 2. Brachyspira. 3. Epidemiologia. 4. Patologia. 5. Colonoscopia I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Título.

CDD 616.34

**Termo de Aprovação**

**"Espiroquetose Intestinal Humana em Joinville (Brasil): Estudo Patológico de 24 Casos"**

por

Fabio Antônio Tironi

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Orientador (UNIVILLE)

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

**Banca Examinadora:**

  
Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii  
(PUC-PR/UFPR)

  
Prof. Dr. Carlos José Serapião  
(UNIVILLE)

Joinville, 21 de julho de 2015

## RESUMO

**Introdução:** A espiroquetose intestinal humana (EIH) é caracterizada pela colonização da mucosa colônica por espiroquetas do gênero *Brachyspira*. Seu potencial patogênico no homem é desconhecido, sendo achada em pessoas assintomáticas ou com sintomas inespecíficos como dor abdominal, diarreia aquosa, entre outros. Embora estudos sugiram que sejam encontradas em mais de 1% das biópsias colônicas, foram publicados apenas dois estudos no Brasil, relatando 4 casos no estado de São Paulo e um em Minas Gerais. **Objetivo:** Descrever aspectos epidemiológicos e patológicos dos casos de EIH diagnosticados em biópsias colônicas de um hospital geral em Joinville. **Metodologia:** Foram pesquisados 24 casos de EIH diagnosticados em biópsias obtidas por colonoscopia no Hospital Dona Helena, no período 3 anos compreendido entre março de 2012 e fevereiro de 2015. Os casos foram revisados com foco na descrição dos seus aspectos epidemiológicos e patológicos. **Resultado:** A EIH foi diagnosticada em 1,51% dos casos de biópsias colônicas. Apresentavam aspectos histológicos já descritos, como colonização focal ou difusa no cólon, o interrompimento da aderência dos microrganismos sobre o epitélio colônico de dez adenomas e cinco pólipos hiperplásicos em nove dos casos. O estudo descreve uma tendência de colonização dos segmentos proximais do cólon, observada em 5 (20,8%) dos 24 casos da série, e discute sua relevância clínica.

**Palavras-chave:** *Brachyspira*; espiroquetose intestinal humana; colonoscopia; biópsia de cólon; pólipos de cólon.

## ABSTRACT

**Introduction:** The human intestinal spirochetosis (HIS) is characterized by colonization of the colonic mucosa by spirochetes of the genus *Brachyspira*. Its pathogenic potential in humans is unknown. HIS is found in asymptomatic people or in patients with nonspecific symptoms such as abdominal pain, watery diarrhea, among others. Although studies suggest that they are found in more than 1% of colonic biopsies, only two previous studies were conducted in Brazil, that reports 4 cases in the state of São Paulo and one in Minas Gerais. **Objective:** To describe epidemiological and pathological characteristics on cases of EIH diagnosed in colonic biopsies of a general hospital in Joinville (Brazil). **Methods:** We surveyed 24 cases of EIH diagnosed in biopsies obtained by colonoscopy in Hospital Dona Helena in a period of three years, between March 2012 and February 2015. The cases were reviewed focusing on its epidemiological and pathological characteristics. **Results:** HIS was diagnosed in 1.51% of cases of colonic biopsies. We observed histological features previously described, such as the focal or diffuse colonization in the colon, disrupting the adherence of microorganisms over the epithelia of ten adenomas and five hyperplastic polyps, in nine cases. The study describes a trend of colonization in the proximal colon segments, observed in 5 (20.8%) of 24 cases of the series, and discuss its clinical relevance.

**Key words:** *Brachyspira*; human intestinal spirochetosis; colonoscopy; colon biopsy, colon polyp.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 – Fotomicrografia de mucosa do cólon apresentando EIH e seu característico aspecto felpudo na superfície dos enterócitos (HE 1.000x).

Figura 2 – Fotomicrografia de mucosa do cólon apresentando espiroquetas (seta) realçadas pela precipitação de prata (Warthin-Stary 1.000x).

Figura 3 – Fotomicrografia de mucosa do cólon apresentando EIH negativas à coloração do Gram (Gram 1.000x).

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Patients characteristics, types of sample examined and concomitant histopathological diagnosis in the HIS cases.

Tabela 2 – Colonization by spirochetes in different segments of the colon of the examined cases.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- CEP – Comitê de ética em pesquisa  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
EIH – Espiroquetose intestinal Humana  
FISH – Hibridação *in situ* fluorescente  
HDH – Hospital Dona Helena  
HIS – Human intestinal spirochetosis  
HIV – Vírus da imunodeficiência humana  
LAP – Laboratório de Anatomia Patológica  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
UNIVILLE – Universidade da Região de Joinville

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	OBJETIVOS .....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
3	REVISÃO DA LITERATURA .....	14
3.1	DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA DA ESPIROQUETOSE INTESTINAL HUMANA	14
3.2	EPIDEMIOLOGIA .....	14
3.3	FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS.....	15
3.4	PATOGENIA.....	16
3.5	APRESENTAÇÃO CLÍNICA.....	17
3.6	ASPECTOS ENDOSCÓPICOS.....	18
3.7	DIAGNÓSTICO .....	18
3.8	TRATAMENTO .....	21
4	METODOLOGIA.....	21
4.1	TIPO DE ESTUDO .....	21
4.2	CASOS .....	21
4.3	REVISÃO DOS LAUDOS E FICHAS DE SOLICITAÇÃO .....	22
4.4	REVISÃO DE LÂMINAS.....	22

4.5 TABULAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS.....	22
4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DOS CASOS .....	22
4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O MÉTODO .....	22
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
6 CONCLUSÃO.....	35
7 REFERÊNCIAS.....	36
ANEXO 1 - FICHA DE COLETA.....	40
ANEXO 2 .....	41

## **1 INTRODUÇÃO**

A espiroquetose intestinal humana (EIH) é caracterizada pela colonização da mucosa colônica por espiroquetas do gênero *Brachyspira*. Seu potencial patogênico no homem é desconhecido, sendo achada em pessoas assintomáticas ou com sintomas inespecíficos como diarreia aquosa. Incide em todas as faixas etárias, mais frequentemente nos habitantes de países em desenvolvimento.

Embora estudos sugiram que sejam encontradas em mais de 1% das biópsias colônicas, foram publicados apenas dois estudos no Brasil, relatando 4 casos no estado de São Paulo e um em Minas Gerais.

Objetivou-se com a presente pesquisa descrever aspectos epidemiológicos e patológicos dos casos identificados de EIH em biópsias colônicas, em um período de três anos, no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP) do Hospital Dona Helena (HDH), em Joinville.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Descrever aspectos patológicos dos casos de espiroquetose intestinal humana identificados em biópsias colônicas no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Dona Helena, em Joinville (Brasil).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Descrever:

- a) O perfil demográfico dos pacientes com espiroquetose intestinal;
- b) A frequência do diagnóstico de espiroquetose intestinal nas biópsias colônicas;
- c) A topografia das amostras disponíveis, quanto à colonização por *Brachyspira*;
- d) Os diagnósticos histopatológicos concomitantes ao de EIH nas biópsias colônicas;
- e) A colonização por espiroquetas sobre o epitélio de pólipos colônicos.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA DA ESPIROQUETOSE INTESTINAL HUMANA**

A espiroquetose intestinal humana (EIH) consiste na colonização da mucosa colônica por bactérias de formato helicoidal, anaeróbias obrigatórias. Embora sua presença nas fezes fosse conhecida décadas antes (SHERA, 1953), a colonização da mucosa foi descrita apenas em 1967 (HARLAND & LEE, 1967).

As bactérias causadoras da EIH pertencem ao filo *Spirochaetes*, classe *Spirochaetes*, ordem *Spirochaetales*, família *Brachyspiraceae*, gênero *Brachyspira*. O gênero possui sete espécies, duas das quais foram identificadas em humanos, a *B. aalborgi* e a *B. pilosicoli* (TSINGANOU & GEBBERS, 2010).

A *B. aalborgi* é a mais prevalente nos humanos (mais de 80% dos casos de espiroquetose intestinal). Também foi identificada em primatas e é considerada por alguns autores apenas como um comensal (MIKOSZA et al., 1999).

A *B. pilosicoli* está presente em uma diversidade grande de mamíferos e pássaros (MIKOSZA & HAMPSON, 2001). Possui papel patogênico e zoonótico sugerido, mas não estabelecido (OXBERRY et al., 1998).

#### **3.2 EPIDEMIOLOGIA**

A incidência de EIH foi relatada em diversas partes do mundo e em todos os grupos etários (MIKOSZA & HAMPSON, 2001). Varia conforme o método diagnóstico, a população estudada e a seleção da amostra. Dois principais tipos de estudo objetivaram abordar a questão: aqueles onde foram estudadas fezes e aqueles onde foram examinadas biópsias intestinais (MIKOSZA & HAMPSON, 2001).

Foram relatadas prevalências aumentadas em subgrupos como homens homossexuais, portadores de HIV, moradores em zonas de pobreza, disponibilidade de água potável e coexistência com infecção gonocócica, entre outros, e que variam conforme a região estudada (LIMA et al., 2005).

A prevalência atingiu as proporções de 22,8% das culturas fecais em vilarejos da Papua Nova Guiné, 32,6% das culturas fecais em aborígenes

australianos (LEE & HAMPSON, 1992), 41,5% das amostras fecais em um centro peri-urbano da ilha de Bali (MUNSHI et al., 2008), e 64% das biópsias retais em populações na Índia (MATHAN & MATHAN, 1985). Em populações selecionadas como homens homossexuais a EIH foi demonstrada em 21 a 53% das culturas fecais ou biópsias retais (MIKOSZA & HAMPSON, 2001).

Nos países desenvolvidos, são registrados casos em cerca de 2,5% das biópsias colônicas (LINDBOE et al., 1993). Em São Paulo, a revisão retrospectiva em uma série semelhante evidenciou uma frequência de 1,41% nos casos de rotina. Além do citado, periódicos indexados registram apenas uma publicação brasileira adicional, o relato de um caso isolado (LIMA et al., 2005).

### 3.3 FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS

Acredita-se que fatores ambientais podem estar relacionados a uma predisposição à infecção (LEE & HAMPSON, 1992). Embora pouco se conheça sobre sua relação com EIH, algumas evidências foram exploradas.

O papel zoonótico da espiroquetose intestinal foi sugerido por um estudo epidemiológico em Papua Nova Guiné, onde *B. pilosicoli* foi isolada de pessoas e de diversos animais presentes nos vilarejos, como cães e patos, sugerindo a possibilidade de transmissão cruzada entre humanos e animais (TROTT et al., 1997).

Aspectos nutricionais diversos podem influenciar o curso da espiroquetose, como documentado em suínos com deficiência de selênio ou de outros componentes nutricionais (LEE & HAMPSON, 1992).

Em relação à flora intestinal, a presença de lactobacilos vivos ou inativados reduz显著mente a motilidade *in vitro* de *B. pilosicoli*, reduzindo também sua aderência e a invasão de células epiteliais de aves (MAPPLEY et al., 2011).

A radiação ultravioleta possui efeitos documentados sobre microrganismos e pode exercer fator modulador sobre comunidades microbiotas ao nível do solo e na microfauna presente em turfas ou sobre folhagens (BALLARÉ et al., 2011). Pode também produzir efeitos indiretos, favorecendo bactérias dominantes que suprimam outras bactérias. É possível ainda que alterações em ecossistemas terrestres possam influenciar o ambiente intestinal humano ou da fauna que o cerca.

### 3.4 PATOGENIA

Sua patogenia em humanos é pouco compreendida. As espiroquetas se transmitem por via fecal-oral, sendo aparentemente dependentes de higiene, alimentação, comportamento e estado imunológico (KOTHARI et al., 2006; LEE; HAMPSON, 1992). A EIH é caracterizada pela colonização da mucosa colônica de maneira multifocal ou difusa, podendo abranger toda a extensão do intestino grosso (LINDBOE et al., 1993). Essa colonização pode atingir a densidade de 1.700 microrganismos/mm<sup>2</sup> (TAKEUCHI et al., 1974).

Diversos substratos anatomo-patológicos foram enumerados na tentativa de justificar sua apresentação clínica. Há autores que relacionaram a patogenicidade dos microrganismos à intensidade da infecção e sugerem que a presença da camada espessa de parasitas sobre o epitélio atue como uma barreira mecânica à reabsorção e cause a diarreia aquosa (GAD et al., 1977).

À microscopia eletrônica as espiroquetas se invaginam na membrana citoplasmática do enterócito, formando uma depressão elétron-lúcida com uma zona elétron-densa sob a membrana no ponto de contato entre a espiroqueta e a célula (NEUTRA, 1980; TEGLBJAERG, 1990). Ocorre a perda das microvilosidades e desarranjo na rede terminal de microfilamentos do enterócito (COOPER et al., 1986; LINDBOE et al., 1993; MUNIAPPA et al., 1996). Acredita-se que esse aplanamento das microvilosidades dos enterócitos e as alterações no seu citoesqueleto constituam um efeito citopatológico das espiroquetas (Rodgers, 1986).

A camada de microrganismos que recobre o epitélio de superfície não se estende às glândulas (Brito, 1996). Esse atapetamento também é interrompido sobre as células caliciformes (LOZANO & ARELLANO, 2012) e sobre o epitélio colônico neoplásico, sugerindo que o processo envolva receptores celulares específicos (COYNE et al., 1995). Embora aparentem ter grande relevância à compreensão da patogenia da EIH, essas observações não foram profundamente exploradas.

Estudos com *B. pilosicoli* falharam em demonstrar genes homólogos àqueles envolvidos nos processos de aderência e invasão de *Yersinia enterocolica* e

*Escherichia coli* (HARTLAND et al., 1998), mas observou-se que essas cepas induzem apoptose, ruptura de membranas celulares e produção de IL-1 e IL-8 em culturas celulares de adenocarcinoma humano (NARESH et al., 2009).

A reação tecidual à EIH geralmente é mínima e inespecífica. Descreve-se escasso infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria, na ausência de alterações vasculares (LEE et al., 1971; LOZANO & ARELLANO, 2012), a presença de mastócitos intraepiteliais parcialmente degranulados, e proporção aumentada de plasmócitos produtores de IgE na lâmina própria em dois casos de espiroquetose intestinal com características invasivas (GEBBERS et al., 1987).

A invasão da mucosa pelas espiroquetas é descrita em diversos relatos (ANTONAKOPOULOS et al., 1982; GEBBERS et al., 1987; PADMANABHAN et al., 1996). Embora essa invasão seja infrequente (VAN MOOK, 2004), ocorre particularmente nos estágios avançados de infecção pelo HIV (GUCCION, 1995; Kostman, 1995). A invasão é geralmente descrita como a presença de espiroquetas entre os enterócitos ou no seu interior, em células caliciformes, em macrófagos da lâmina própria e em células de Schwann (Antonakopoulos, 1982). Adicionalmente foram isoladas espiroquetas do sangue de pacientes criticamente enfermos na França e nos Estados Unidos (FOURNIÉ-AMAZOUZ, 1995; TROTT, 1997).

A invasão de espiroquetas além da superfície epitelial associa-se a sintomas que respondem ao tratamento antibiótico (metronidazol), enquanto pacientes sem essa característica são geralmente assintomáticos (KÖRNER & GEBBERS, 2003).

### 3.5 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A expressão clínica da EIH é bastante variável e até mesmo questionada (GEBBERS, 1987). A condição é encontrada em pessoas assintomáticas e muitas vezes constitui apenas um achado de exame (GOKAK, 2009). Os sintomas dos pacientes com EIH são frequentemente provocados por uma doença de base conhecida (HARLAND, 1971). Por vezes, a EIH é acompanhada de queixas inespecíficas na ausência de outras condições que se associem ou expliquem os sintomas (HENRIK-NIELSEN, 1985).

Nos casos com sintomas atribuídos à EIH, a apresentação abrange dor abdominal, diarreia crônica, geralmente aquosa, e sangramento retal (ALSAIGH, 2002; GOKAK, 2009; GUCCION, 1995; KOSTMAN, 1995).

A associação entre EIH e os sintomas é corroborada por casos onde o tratamento antibiótico provocou a remissão do quadro (KAPLAN E TAKEUCHI 1979, DOUGLAS 1981, COTTON 1984, COOPER 1986; ESTEVE 2006). Entretanto, em um estudo com 209 pacientes, a melhora dos sintomas não ocorreu em quase metade deles, mesmo nos quais a erradicação da espiroquetose foi comprovada por exame de controle (WEISHEIT, 2007).

Chama atenção a associação entre a colonização do apêndice cecal e uma forma de apresentação clínica similar à apendicite, denominada por alguns autores como pseudoappendicite (HENRIK-NIELSEN et al., 1985).

Essa forma de colonização é显著mente mais frequente em pacientes com sintomas similares a apendicite na ausência de achados histopatológicos de apendicite aguda (12.6%), do que em pacientes com apendicite aguda comprovada (0.7%) (HARLAND, 1971; HENRIK-NIELSEN et al., 1985)

### 3.6 ASPECTOS ENDOSCÓPICOS

O aspecto endoscópico da mucosa colônica em pacientes com EIH é frequentemente normal, relatando-se também aspecto polipóide, eritematoso, ou de “lesão” (ALSAIGH & FOGT, 2002).

São observados endoscopicamente em concomitância com pólipos, tumores, colite crônica, colite ulcerativa e colite isquêmica (AKIYAMA, 2015; HARLAND, 1971).

### 3.7 DIAGNÓSTICO

Pode-se identificar a espiroquetose intestinal através da biópsia de segmentos colônicos ou na avaliação das fezes (KOTHARI, 2006).

À microscopia óptica comum, os microrganismos se apresentam como uma borda basofílica felpuda recobrindo a superfície do epitélio colônico de superfície, interrompida sobre as células caliciformes (figura 1). São positivos às colorações de

Warthin-Stary (figura 2), Grocott e PAS, e negativas ao Gram (figura 3) (BRITO, 1996).

Figura 1 – Fotomicrografia de mucosa do cólon apresentando EIH e seu característico aspecto felpudo (seta) na superfície dos enterócitos (HE 1.000x).

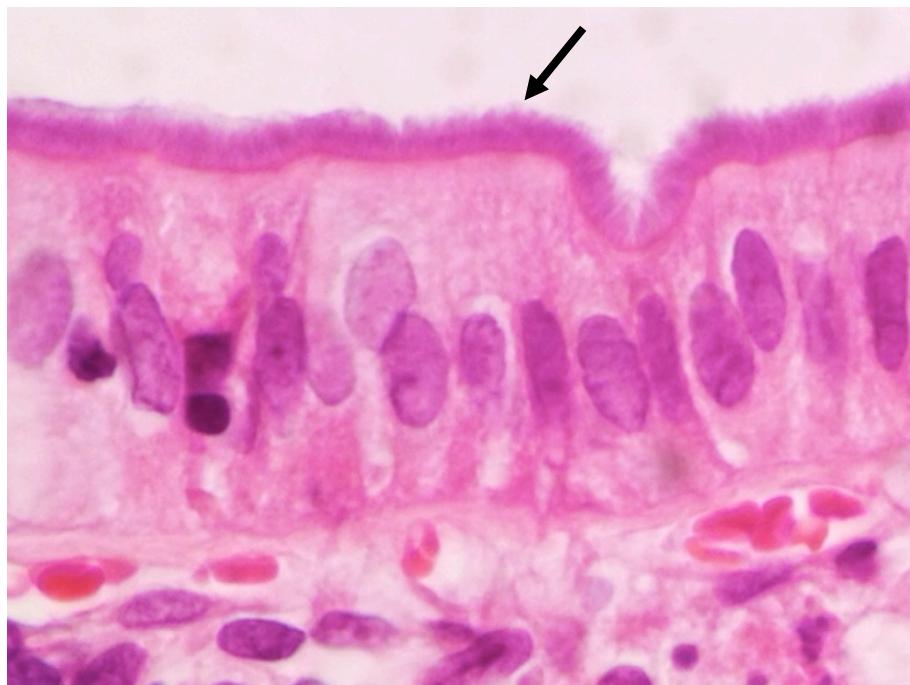
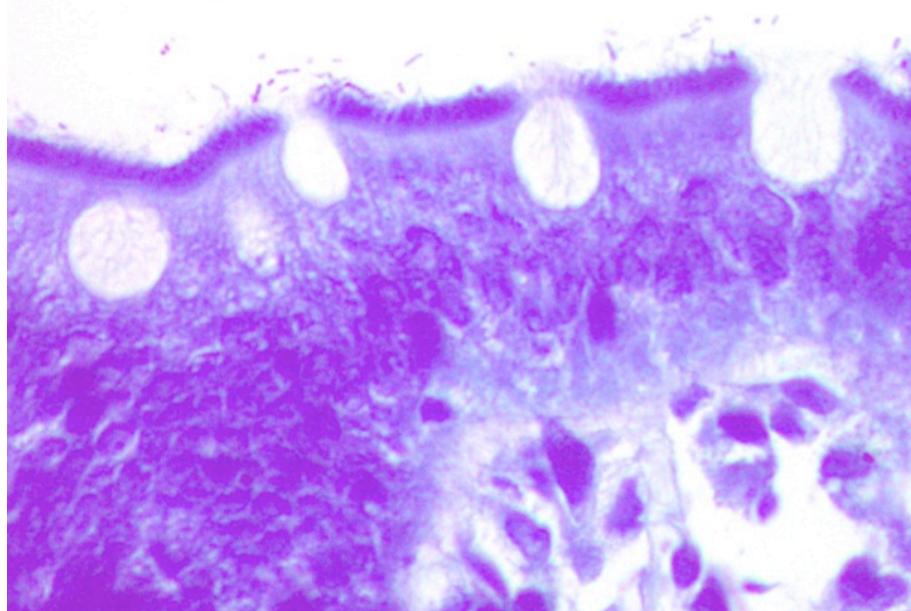


Figura 2 – Fotomicrografia de mucosa do cólon apresentando espiroquetas (seta) realçadas pela precipitação de prata (Warthin-Stary 1.000x).



Figura 3 – Fotomicrografia de mucosa do cólon apresentando EIH negativas à coloração do Gram (Gram 1.000x).



A observação ultraestrutural original mostrou que “aderidos à superfície do epitélio havia uma floresta de organismos orientados ao longo do eixo das células. Os organismos eram curtos e finos, e apresentavam duas ou três curvaturas curtas. Eles mediam até 3 micrômetros de comprimento e em geral apenas 0,15 micrômetros de diâmetro. Eram muito curtos para corresponder a bacilos. Sob grande aumento, alguns microrganismos cortados transversalmente exibiam feixes de filamentos espirais. Esses achados, junto com a forma e tamanho dos organismos, indicava que eram espiroquetas. (HARLAND; LEE, 1967).

A imunoistoquímica com anticorpos anti-*Treponema* e anti-*Leptospira* mostra reação cruzada com espiroquetas do gênero *Brachyspira*, podendo ser utilizada para identificar o agente (Brito 1996). Foram descritos ainda protocolos para a detecção das espiroquetas em biópsias e amostras embebidas em parafina utilizando-se as técnicas de PCR (MIKOSZA, 1999; WESTERMAN, 2012) e FISH (SCHMIEDEL, 2009).

### **3.8 TRATAMENTO**

Pacientes assintomáticos podem ser observados. Os sintomáticos e imunodeprimidos respondem a tratamento com diversos antibióticos (ANWAR, 2013), sendo mais utilizado o metronidazol 400mg a cada 8 horas por duas semanas, com alívio dos sintomas nos primeiros dias (ANWAR, 2013; ESTEVE, 2006; WEISHEIT, 2007).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 TIPO DE ESTUDO**

Foi realizado um estudo quantitativo descritivo do tipo observacional retrospectivo.

### **4.2 CASOS**

Foram pesquisados 24 casos de EIH previamente diagnosticados em biópsias de mucosa colônica obtidas por colonoscopia no HDH, no período 36 meses compreendido entre 01 de março de 2012 e 28 de fevereiro de 2015. Todos os casos foram diagnosticados pelo pesquisador por ocasião da avaliação histopatológica das biópsias.

Foi aplicada a definição de caso para cada pessoa que apresentou resultado compatível com espiroquetose intestinal no exame anatomapatológico de amostras colônicas obtidas por colonoscopia no HDH, analisadas no LAP do hospital. Casos onde a pessoa apresentou mais de um resultado de biópsia positivo durante o período da pesquisa foram considerados apenas um caso. A amostra correspondia ao grupo de fragmentos recebidos em um único frasco, sendo representativa do segmento ou dos segmentos anatômicos indicados no laudo. Considerou-se segmento colônico cada uma das regiões anatômicas denominadas como ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, sigmoide e reto.

#### **4.3 REVISÃO DOS LAUDOS E FICHAS DE SOLICITAÇÃO**

Foi realizada a revisão dos laudos das biópsias colônicas dos pacientes com EIH. Foram observados os dados de sexo, data de nascimento, data da emissão do laudo e idade preenchendo-se formulário específico (anexo 1).

#### **4.4 REVISÃO DE LÂMINAS**

Todas as lâminas de microscopia arquivadas referentes aos diagnósticos de espiroquetose intestinal dos casos selecionados foram revistas pelo pesquisador, orientando o preenchimento de formulário específico (anexo 1).

#### **4.5 TABULAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS**

Os dados obtidos foram transcritos para formulário eletrônico Microsoft Excel for Mac 2011 v14.4.3 (140616) e analisados com auxílio do software SPSS v13.0.

#### **4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DOS CASOS**

Foi prevista a exclusão dos casos onde a revisão das lâminas revelaria discordância com o diagnóstico de espiroquetose intestinal.

#### **4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O MÉTODO**

Nenhum procedimento invasivo complementar foi realizado especificamente para fins da pesquisa, visto que as amostras estudadas já foram obtidas por ocasião do diagnóstico, e encontram-se arquivadas na forma de lâminas de microscopia e blocos de parafina. Todas as lâminas foram revisadas dentro das dependências do laboratório, permanecendo à disposição do corpo clínico durante todo o período do estudo, sendo devolvidas ao arquivo imediatamente após a revisão. Os blocos de parafina foram igualmente processados nas dependências do laboratório de forma a se obter amostras para a realização dos exames de imunoistoquímica, as quais passarão a ser identificadas por um número de registro do projeto,

descaracterizando sua relação com o registro do exame e a identidade dos pacientes.

#### 4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), conforme diretrizes estabelecidas na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e complementares, sendo aprovado pelo parecer número 870.240.

Nenhum procedimento realizado exclusivamente para os fins da pesquisa teve qualquer impacto aos pacientes no período de condução do estudo, não influenciando a conduta clínica. Não foram previstos benefícios diretos aos pacientes incluídos na pesquisa.

O banco de dados necessário à pesquisa foi criado e utilizado exclusivamente para a elaboração da produção científica e permanecerá sob responsabilidade dos pesquisadores nas instituições proponentes (UNIVILLE) e coparticipante (Hospital Dona Helena) por cinco anos após a conclusão da pesquisa, em locais de acesso controlado. Ao término deste período, todos os registros eletrônicos e impressos serão apropriadamente destruídos, garantindo-se a continuidade do anonimato dos pacientes associados aos dados analisadas no presente estudo.

Toda publicação ou divulgação associada à pesquisa será realizada sem a identificação dos pacientes. A identidade de cada indivíduo será mantida em absoluto sigilo.

Todos os preceitos éticos e os requisitos dispostos na Resolução CNS 466/2012 e complementares, que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, serão estritamente observados pelos pesquisadores.

Considerando o exposto acima e o compromisso com a não utilização de dados que possam identificar os pacientes cujos dados laboratoriais, clínicos e epidemiológicos serão analisados, solicitou-se a dispensa de proposição e utilização de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação em Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo será apresentado na forma de artigo científico, conforme submetido ao periódico Human Pathology (Anexo 2).

**HUMAN INTESTINAL SPIROCHETOSIS IN JOINVILLE (BRAZIL):  
PATHOLOGICAL ANALYSIS OF 24 CASES**

**Abstract**

The aim of this study was to describe the pathological findings in a series of 24 cases of human intestinal spirochetosis (HIS). The cases were diagnosed in a general hospital in the city of Joinville (Brazil) between March 2012 and February 2015. HIS was observed in 1.51% of consecutive biopsy specimens obtained by colonoscopy. It presented in focal and diffuse patterns of colonization, with a sharp disruption of microbial adherence over the epithelium of ten adenomas and five hyperplastic polyps. A trend on the colonization of proximal colonic segments was observed in 5 (20.8%) cases of this series.

**Key words:** *Brachyspira*; human intestinal spirochetosis; colonoscopy; colon mucosa, colon polyp.

## **1. Introduction**

The human intestinal spirochaetosis (HIS) was first described in 1967 by Harland and Lee [1]. In humans, spirochaetosis is characterized by the colonization of the large intestine and appendix mucosas by two bacteria species of the genus *Brachyspira*, the *B. aalborgi* and *B. pilosicoli* [2]. It occurs in several regions of the world, in all age groups [3]. An increased prevalence was reported in subgroups, including lower socioeconomic strata, homosexual men and Human Immunodeficiency Virus (HIV) infected people [4]. Spirochetes were identified in 22.8 to 64% of the fecal cultures in Papua New Guinea, Bali, India and among Australian aborigines, while developed countries recorded cases in only 2.5% of colonic biopsies [5-8].

The pathogenesis of HIS is poorly understood, although the fecal-oral transmission of the causative agent is recognized [9]. Several pathological substrates were considered in an attempt to justify its clinical presentation, but explaining mechanisms were not established. It is suggested that the intensity of the colonization, characterized by the thick layer of parasites on the epithelium impairs intestinal absorption, producing watery diarrhea [10]. Cytopathic effects of *Brachyspira* on the enterocytes, invasion of the mucosa by spirochetes and a tissue reaction to HIS were identified [8,11-19]. It was also recently observed a curious and counterintuitive association between HIS and polyps / serrated sessile adenomas [20].

The endoscopic appearance of colonic mucosa in patients with HIS is often normal, but erythematous, polypoid or "injury" aspects are reported [21]. HIS is endoscopically observed concomitantly with polyps, tumors, chronic colitis, ischemic colitis and ulcerative colitis [22,23]. Histopathological study of the colonic mucosa presents spirochetes adhered to the luminal border of enterocytes, identified as a fuzzy basophilic rim that covers the surface epithelium. The colonization does not occur deep in the glands, and is interrupted over goblet cells and transformed neoplastic epithelia. The spirochetes are highlighted by Warthin-Stary, Grocott and PAS staining, and are negative to Gram [24]. It is additionally possible the use of ancillary studies such as scanning and transmission electron microscopy, immunohistochemical examination with anti-Treponema and anti-Leptospira

antibodies, which cross-react with the spirochete *Brachyspira* genre, PCR and FISH [1,24-27].

The clinical presentation of HIS ranges from absent to nonspecific symptoms. Abdominal pain, chronic diarrhea, usually watery, rectal bleeding and a similar clinical picture for appendicitis were previously reported [21,28-30].

The current study aims to describe pathological aspects of 24 cases of intestinal spirochaetosis diagnosed in a general hospital in Joinville.

## **2. Methods**

An observational, retrospective, quantitative and descriptive study was performed. This study was approved by the research ethics committee of a local university.

The cases were selected from endoscopic biopsies specimen from colon and rectum, in the laboratory of the Dona Helena Hospital, between March 2012 and February 2015. All cases were previously diagnosed during the routine examination of histological sections stained with hematoxylin and eosin. Information regarding the sex, age, sample type, topography and concomitant histopathological diagnosis of the cases were studied. All the HIS case slides were reviewed by the same pathologist (F.T.). The analysis included the study of polyps and its adjacent non-neoplastic mucosa.

The obtained data were registered in the Microsoft Excel spreadsheet for Mac 2011 v14.4.3 and the statistical analysis was performed using the software SPSS v13.

## **3. Results**

During the study period were analyzed 1,894 colonic biopsies from 1,655 colonoscopy exams. HIS was identified 24 cases, corresponding to 1.51% of colonoscopy exams with biopsies.

The results for gender, age, type of sample and concomitant histopathological diagnosis are shown in Table 1. There was an equal distribution of cases between

genders. The age ranged from 14 to 71 years, with a mean of 43.2 years and standard deviation of 13.8.

Table 1 – Patients characteristics, types of sample examined and concomitant histopathological diagnosis in the HIS cases.

<b>Case</b>	<b>Sex</b>	<b>Age</b> <b>(Years)</b>	<b>Type of Sample</b>	<b>Concomitant histopathological diagnosis</b>
<b>1</b>	M	47	Lesion (erosion and granulation)	Normal mucosa
<b>2</b>	M	43	Colonic biopsy	Normal mucosa
<b>3</b>	M	19	Serial biopsies	Normal mucosa
<b>4</b>	F	28	Colonic biopsy	Normal mucosa
<b>5</b>	M	31	Rectal polyp	Hyperplastic polyp
<b>6</b>	M	59	Serial biopsies	Normal mucosa
<b>7</b>	F	19	Serial biopsies	Normal mucosa
<b>8</b>	F	49	Serial biopsies	Normal mucosa
<b>9</b>	M	71	Colonic polyps (4 polyps)	Adenomas (LG)
<b>10</b>	F	58	Colonic biopsy and colonic polyp	Normal mucosa; adenoma (LG)
<b>11</b>	M	47	Colonic polyps (2 polyps)	Adenomas (LG)
<b>12</b>	F	14	Serial biopsies	Normal mucosa
<b>13</b>	F	50	Lesion (rectal polyps)	Lymphoid follicular hyperplasia
<b>14</b>	F	36	Colonic biopsy	Normal mucosa
<b>15</b>	M	49	Colonic biopsy and colonic polyp	Normal mucosa; adenoma (LG)
<b>16</b>	M	32	Colonic biopsy	Normal mucosa
<b>17</b>	F	40	Colonic biopsy	Normal mucosa
<b>18</b>	M	55	Colonic biopsy and colonic polyp	Normal mucosa; adenoma (LG)
<b>19</b>	M	52	Colonic biopsy	Normal mucosa
<b>20</b>	F	41	Colonic polyp (3 polyps)	Hyperplastic polyps
<b>21</b>	F	46	Colonic biopsies	Normal mucosa
<b>22</b>	M	51	Colonic biopsy	Normal mucosa
<b>23</b>	F	51	Colonic polyp	Sessile Serrated Polyp
<b>24</b>	F	49	Colonic biopsy and colonic polyp	Normal mucosa; adenoma (LG)

Abbreviations: F = Female; LG = Low grade dysplasia; M = Male

The types of sample include serial intestinal biopsies, colonic biopsies from one or more topographies, biopsies of a lesions (erosion and granulation) and intestinal polyps.

The sampled topographies and the presence or absence of colonization is shown in Table 2.

Table 2 – Colonization by spirochetes in different segments of the colon of the examined cases.

Case	Ce	AC	TC	DC	SC	Re
1			+			
2	+	+				
3	+	+	+	-	+	
4	+	+	+			
5						+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+
9	+		+	+		+
10					+	+
11		+				-
12	+	+	-	-	-	
13						+
14	+	+				
15	+	+				+
16						+
17	+	+				
18	+	+	+	+	+	
19	+	+				
20			+		+	+
21	+	+	+			
22	+	+				
23		+				
24	+	-	-			
TP	16	16	10	5	8	7
TN	0	1	2	2	3	1

Abbreviations: Ce = cecum; AC= ascending colon; TC = transverse colon; DC = descending colon; SC = sigmoid colon; Re = rectum; TP = total number of positive cases; TN = total number of negative cases; + = colonization; - = absence of colonization.

All cases had at least one sampled colonic topography, corresponding to fragments of mucosa or the mucosa immediately adjacent to an excised polyp. A total of 71 colonic segments were examined, 62 (87.3%) of which showed colonized.

Five (20.8%) cases had microorganisms adhered only to a part of the intestine. All these cases had free colonic samples preceded by mucosal colonization of their respective proximal segments. One of these cases consisted of spirochetes colonizing the mucosa adjacent to a polyp of the cecum, but with cecum and ascending colon biopsies in normal samples collected separately during the same colonoscopy. In only one of the five cases colonization was identified distal to a negative mucosal sample. In this case the descending colon mucosa was colonization free, but spirochaetosis was demonstrated upstream (cecum, descending colon and transverse colon) and downstream (sigmoid) of this negative sample. Statistical analysis using the McNemar changes significance test and by the Cochran Q test showed no statistically significant difference in colonization between the topographies.

Regarding polyps, nine (37.5%) patients had 15 polyps. The histological types were 10 adenomas and 5 hyperplastic polyps, distributed in 6 (25%) cases with adenomas and 3 (12.5%) with hyperplastic polyps. The polyps had spirochetes in the adjacent mucosa but none showed microorganisms adhering to the epithelial surface of the polyp.

#### **4. Discussion**

This is the first description of HIS cases in southern Brazil, in a scientific context that records only two other previous reports of the disease in the country. It describes a series of 24 cases with the demographic characteristics of sex and age related.

In a similar Brazilian series, four cases reported in São Paulo accounted for 1.41% of biopsies, an equivalent frequency to 1.51% observed in our series [24]. The report of a single case in Uberaba configures additional Brazilian publication [4].

The present study demonstrates histological features already described, such as colonization, both in focal or diffuse manner in the colon [8]. It also describes the interruption of adherence of microorganisms on the colonic epithelium adenomas,

supporting the suggestion that adherence to enterocytes involves specific cell receptors [31]. Little, however, is published on this fact in hyperplastic polyps, as described here [22]. Although these seem to have great relevance to the understanding of the HIS pathogenesis, these observations were not deeply explored.

A tendency to colonize the proximal colon segments was observed in 5 (20.8%) cases of the series. Colonization restricted to the proximal colon was also observed but little discussed, in at least one previously reported case [32]. The statistical significance of this fact could not be demonstrated, probably due to the small size of the sample. However, the finding may be of clinical value. It is possible that rectal biopsies or biopsies restricted to distal portions of the intestine, such as the sigmoid, may fail to diagnose the HIS.

This trend may explain a Japanese study that observed a higher prevalence of HIS in biopsies of serrated sessile polyps and serrated sessile adenomas, lesions peculiarly originated in the right colon [20]. Although the referred study showed no difference in the prevalence of HIS between different colonic segments examined, methodological parameters might have obfuscated it, since the topographies seemed not to have been analyzed individually, but in pool topography samples.

The finding may also be related to pathogenic mechanisms, suggesting that the colonization process by *Brachyspira* may start in the right colon and extends distally through the large intestine mucosa. This could be explained by the histological, physiological, environmental and pathological differences between the proximal and the distal colon, facilitating the proliferation and adherence of spirochetes in the first. This hypothesis is supported by the classic description of a bowel syndrome associated to the intestinal spirochetosis, more than a decade before pathological finding of HIS were described. Shera cited the appearance of cecal ulcers in guinea pigs fed with microorganisms, referring to them as "primary spirochetosis", which would contrast with its evolution characterized by diarrhea, giardiasis and tumors, called "secondary spirochetosis" [33].

Future studies using larger series, clinical information, ancillary techniques and meta analysis could contribute to the investigation of the pathogenesis and clinical significance of HIS.

## References

- [1] Harland WA, Lee FD. Intestinal Spirochaetosis. *British Medical Journal* 1967;3:718–9.
- [2] Tsinganou E, Gebbers J-O. Human intestinal spirochetosis – a review. *German Medical Science* 2010;8:1–7.
- [3] Mikosza ASJ, Hampson DJ. Human intestinal spirochetosis: *Brachyspira aalborgi* and/or *Brachyspira pilosicoli*? *Animal Health Research Reviews* 2001;2:101–10.
- [4] Lima MA de, Barbosa AL, Modesto V, Misiara FP. Intestinal spirochetosis and colon diverticulosis Espiroquetose intestinal e diverticulose do cólon. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2005;38:56–7.
- [5] Lee JI, Hampson J. Intestinal spirochaetes colonizing Aborigines from communities in the remote north of Western Australia 1992.
- [6] Mathan MM, Mathan VI. Rectal mucosal morphologic abnormalities in normal subjects in southern India : a tropical colonopathy ? *Gut* 1985;710–7.
- [7] Munshi MA, Margawani KR, Robertson ID, Hampson DJ. An unexpectedly high prevalence of colonization with the intestinal spirochaete *Brachyspira aalborgi* amongst residents of the Indonesian island of Bali. *Journal of Medical Microbiology* 2008;57:1234–7.
- [8] Lindboe CF, Tostrup NE, Nersund R, Rekkavik G. Human intestinal spirochaetosis in mid-Norway . A retrospective histopathological study with clinical correlations. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 1993;101:858–64.
- [9] Kothari TH, Mateo R, Kothari DB, Karnath B, Rouan GW. Intestinal Spirochetosis. *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine* 2006;6:240–2.
- [10] Gad A, Willén R, Furugard K, Fors B, Hradsky M. Intestinal spirochetosis as a cause of long standing diarrhea. *Upsala J Med Sci* 1977;82:49–54.
- [11] Cooper C, Cotton DWK, Hudson MJ, Kirkham N, Wilmott FEW. Rectal spirochaetosis in homosexual men : characterisation of the organism and pathophysiology. *Genitourinary Medicine* 1986;47:47–52.
- [12] Muniappa N, Duhamel GE, Mathiesen MR, Bargar TW. Light Microscopic and Ultrastructural Changes in the Ceca of Chicks Inoculated with Human and Canine *Serpulina pilosicoli* 1996;550:542–50.
- [13] Neutra MR. Prokaryotic-eukaryotic cell junctions : attachment of spirochetes and flagellated bacteria to primate large intestinal cells. *Journal of Ultrastructural Research* 1980;70:186–203.
- [14] Teglbaerg PS. Intestinal spirochaetosis. *Current Topics in Pathology* 1990;81:247–56.
- [15] Rodgers FG, Rodgers C, Shelton AP, Hawkey CJ. Proposed pathogenic mechanism for the diarrhea associated with human intestinal spirochetes. *American Journal of Clinical Pathology* 1986;86:679–82.

- [16] Gebbers J-O, Ferguson DJ, Mason C, Cruciolli V, Jewell DP. Local immune reaction in human intestinal spirochetosis. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1987;117:1087–91.
- [17] Lozano C, Arellano L. Espiroquetosis intestinal humana: serie clínica y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología* 2012;29:449–52.
- [18] Antonakopoulos G, Newman J, Wilkinson M. Intestinal spirochaetosis : an electron microscopic study of an unusual case. *Histopathology* 1982;6:477–88.
- [19] Padmanabhan V, Dahlstrom J, Maxwell L, Kaye G, Clarke A, Pj B. Invasive intestinal spirochetosis : a report of three cases. *Pathology* 1996;28:283–6.
- [20] Omori S, Mabe K, Hatanaka K, et al. Human intestinal spirochetosis is significantly associated with sessile serrated adenomas / polyps . PubMed Commons. *Pathology Research Practice* 2014;210:440–3.
- [21] Alsaigh N, Fogt F. Intestinal spirochetosis : clinicopathological features with review. *Colorectal Disease* 2002;4:97–100.
- [22] Lee FD, Kraszewski J, Gordon J, Howie JGR, McSeveney D, Harland WA. Intestinal spirochaetosis. *Gut* 1971;126–33.
- [23] Akiyama S, Kikuchi D, Mitani T, et al. A case of mucinous adenocarcinoma in the setting of chronic colitis associated with intestinal spirochetosis and intestinal stricture. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e493.
- [24] Brito T de, Sandoval MP, Silva AG, Saad RC, Colaiacovo W. Intestinal spirochetosis: first cases reported in Brazil and the use of immunoistochemistry as an aid in histopathological diagnosis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1996;38:45–53.
- [25] Westerman LJ, Stel H V, Schipper MEI, et al. Development of a real-time PCR for identification of brachyspira species in human colonic biopsies. *PloS One* 2012;7:e52281.
- [26] Mikosza ASJ, La T, Brooke CJ, et al. PCR Amplification from Fixed Tissue Indicates Frequent Involvement of Brachyspira aalborgi in Human Intestinal Spirochetosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:2093–8.
- [27] Schmiedel D, Epple H, Ignatius R, et al. Rapid and Accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence In Situ Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47:1393–401.
- [28] Gokak VP, Mitnala S, Cheemalkonda R, Banarjee R, Padaki NR, Reddy DN. Intestinal Spirochetosis : Do We Always Treat It or Is It a Self-Limiting Disease ? *The Saudi Journal of Gastroenterology* 2009;15:139–41.
- [29] Guccion JG, Benator DA, Zeller J, Termanini B, Saini N. Intestinal spirochetosis and acquired immunodeficiency syndrome : ultrastructural studies of two cases. *Ultrastructural Pathology* 1995;19:15–22.

- [30] Kostman JR, Patel M, Catalano E, Camacho J, Hoffpauir J, DiNubile MJ. Invasive colitis and hepatitis due to previously uncharacterized spirochetes in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Disease* 1995;21:1159–65.
- [31] Coyne JD, Curry A, Purnell P, Haboubi NY. Colonic tubular adenomas and intestinal spirochaetosis : an incompatible association. *Histopathology* 1995;27:1995.
- [32] Lo TCN, Heading RC, Gilmour HM. Intestinal spirochaetosis. *Postgraduate Medical Journal* 1994;70:134–7.
- [33] Shera AG. A syndrome associated with intestinal spirochaetosis. *Journal of Clinical Pathology* 1953;6:326–31.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados acerca das características epidemiológicas e patológicas dos casos estudados permitem concluir:

- A constatação de casos de EIH em Joinville;
- A presença de EIH em 1,51% dos casos em biópsias obtidas por colonoscopia no LAP do HDH;
- A observação de EIH em pacientes com características demográficas de gênero e idade correlatas;
- A colonização da mucosa colônica por espiroquetas de maneira focal ou difusa;
- A descontinuidade da aderência dos microrganismos sobre o epitélio colônico de adenomas e de pólipos hiperplásicos;
- Uma tendência de colonização dos segmentos proximais do cólon nos casos de EIH analisados.

## 7 REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, S. et al. A case of mucinous adenocarcinoma in the setting of chronic colitis associated with intestinal spirochetosis and intestinal stricture. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 4, p. e493, 2015.
- ALSAIGH, N.; F FOGT. Intestinal spirochetosis: clinicopathological features with review. **Colorectal Disease**, v. 4, n. 2, p. 97–100, 2002.
- ANTONAKOPOULOS, G.; NEWMAN, J.; WILKINSON, M. Intestinal spirochaetosis : an electron microscopic study of an unusual case. **Histopathology**, v. 6, n. 4, p. 477–488, 1982.
- ANWAR, M. A. et al. Intestinal Spirochetosis : Symptomatic Patients in the Presence of No Risk Factors and Improvement with Metronidazole Therapy. **Journal of Pakistan Medical Students**, v. 3, n. 2, p. 115–117, 2013.
- BALLARÉ, C. L. et al. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems . Patterns , mechanisms , and interactions with climate change . **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 226–241, 2011.
- BRITO, T. DE et al. Intestinal spirochetosis: first cases reported in Brazil and the use of immunoistochemistry as an aid in histopathological diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 1, p. 45–53, 1996.
- COOPER, C. et al. Rectal spirochaetosis in homosexual men : characterisation of the organism and pathophysiology. **Genitourinary Medicine**, n. 62, p. 47–52, 1986.
- COYNE, J. D. et al. Colonic tubular adenomas and intestinal spirochaetosis : an incompatible association. **Histopathology**, v. 27, n. 4, p. 1995, 1995.
- ESTEVE, M. et al. Intestinal spirochetosis and chronic watery diarrhea : clinical and histological response to treatment and long-term follow up. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 8, p. 1326–1333, 2006.
- FOURNIÉ-AMAZOUZ, E. et al. Isolations of intestinal spirochaetes from the blood of human patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 30, n. 2, p. 160–162, 1995.
- GAD, A. et al. Intestinal spirochetosis as a cause of long standing diarrhea. **Upsala J Med Sci**, v. 82, p. 49–54, 1977.
- GEBBERS, J.-O. et al. Spirochaetosis of the human rectum associated with an intraepithelial mast cell and IgE plasma cell response. **Gut**, v. 28, p. 588–593, 1987.
- GEBBERS, J.-O. et al. Local immune reaction in human intestinal spirochetosis. **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, v. 117, n. 29, p. 1087–1091, 1987.

GOKAK, V. P. et al. Intestinal Spirochetosis : Do We Always Treat It or Is It a Self-Limiting Disease ? **The Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 2, p. 139–141, 2009.

GUCCION, J. G. et al. Intestinal spirochetosis and acquired immunodeficiency syndrome : ultrastructural studies of two cases. **Ultrastructural Pathology**, v. 19, n. 1, p. 15–22, 1995.

HARLAND, W. A.; LEE, F. D. Intestinal Spirochaetosis. **British Medical Journal**, v. 3, n. September, p. 718–719, 1967.

HARTLAND, E. L. et al. Examination of *Serpulina pilosicoli* for attachment and invasion determinants of Enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 165, p. 59–63, 1998.

HENRIK-NIELSEN, R. et al. Intestinal spirochetosis of the vermiform appendix. **Gastroenterology**, v. 88, n. 4, p. 971–977, 1985.

KÖRNER, M.; GEBBERS, J.-O. Clinical significance of human intestinal spirochetosis--a morphologic approach. **Infection**, v. 31, n. 5, p. 341–349, 2003.

KOSTMAN, J. R. et al. Invasive colitis and hepatitis due to previously uncharacterized spirochetes in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 21, n. 5, p. 1159–1165, 1995.

KOTHARI, T. H. et al. Intestinal Spirochetosis. **Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine**, v. 6, n. 5, p. 240–242, 2006.

LEE, F. D. et al. Intestinal spirochaetosis. **Gut**, n. 12, p. 126–133, 1971.

LEE, J. I.; HAMPSON, D. J. Intestinal spirochaetes colonizing Aborigines from communities in the remote north of Western Australia. **Epidemiological Infectology**, v. 109, p. 133–141, 1992.

LIMA, M. A. DE et al. Intestinal spirochetosis and colon diverticulosis Espiroquetose intestinal e diverticulose do cólon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 56–57, 2005.

LINDBOE, C. F. et al. Human intestinal spirochaetosis in mid-Norway . A retrospective histopathological study with clinical correlations . PubMed Commons. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 101, n. 11, p. 858–864, 1993.

LOZANO, C.; ARELLANO, L. Espiroquetosis intestinal humana: serie clínica y revisión de la literatura. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 4, p. 449–452, 2012.

MAPPLEY, L. J. et al. Lactobacilli antagonize the growth, motility, and adherence of *Brachyspira pilosicoli*: a potential intervention against avian intestinal spirochetosis. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5402–5411, ago. 2011.

MATHAN, M. M.; MATHAN, V. I. Rectal mucosal morphologic abnormalities in normal subjects in southern India : a tropical colonopathy? **Gut**, n. 26, p. 710–717, 1985.

MIKOSZA, A. S. J. et al. PCR Amplification from Fixed Tissue Indicates Frequent Involvement of *Brachyspira aalborgi* in Human Intestinal Spirochetosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 2093–2098, 1999.

MIKOSZA, A. S. J.; HAMPSON, D. J. Human intestinal spirochetosis: *Brachyspira aalborgi* and/or *Brachyspira pilosicoli*? **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 101–110, 2001.

MUNIAPPA, N. et al. Light Microscopic and Ultrastructural Changes in the Ceca of Chicks Inoculated with Human and Canine *Serpulina pilosicoli*. **Veterinary Pathology** v. 550, p. 542–550, 1996.

MUNSHI, M. A. et al. An unexpectedly high prevalence of colonization with the intestinal spirochaete *Brachyspira aalborgi* amongst residents of the Indonesian island of Bali. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1234–1237, out. 2008.

NARESH, R.; SONG, Y.; HAMPSON, D. J. The intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* attaches to cultured Caco-2 cells and induces pathological changes. **PLoS one**, v. 4, n. 12, p. e8352, 2009.

NEUTRA, M. R. Prokaryotic-eukaryotic cell junctions : attachment of spirochetes and flagellated bacteria to primate large intestinal cells. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 70, n. 2, p. 186–203, 1980.

OXBERRY, S. I.; Trott, D. J.; HAMPSON, D. J. *Serpulina pilosicoli*, waterbirds and water: Potential sources of infection form humans and other animals. **Epidemiol Infect**, v. 121, p. 219–225, 1998.

PADMANABHAN, V. et al. Invasive intestinal spirochetosis : a report of three cases. **Pathology**, v. 28, n. 3, p. 283–286, 1996.

RODGERS, F. G. et al. Proposed pathogenic mechanism for the diarrhea associated with human intestinal spirochetes. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 86, n. 5, p. 679–682, 1986.

SCHMIEDEL, D. et al. Rapid and Accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence In Situ Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1393–1401, 2009.

SHERA, A. G. A syndrome associated with intestinal spirochaetosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 6, n. 4, p. 326–331, 1953.

TAKEUCHI, A.; JERVIS, H. R.; ROBINSON, D. M. Spiral-shaped organisms on the surface colonic epithelium of the monkey and man1. p. 1287–1296, 1974.

TEGLBJAERG, P. S. Intestinal spirochaetosis. **Current Topics in Pathology**, v. 81, p. 247–256, 1990.

TROTT, D. J. et al. Identification and Characterization of *Serpulina pilosicoli* Isolates Recovered from the Blood of Critically Ill Patients. v. 35, n. 2, p. 482–485, 1997.

TSINGANOU, E.; GEBBERS, J.-O. Human intestinal spirochetosis – a review. **German Medical Science**, v. 8, p. 1–7, 2010.

VAN MOOK, W. N. et al. Human intestinal spirochaetosis : any clinical significance. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 83–87, 2004.

WEISHEIT, B.; BETHKE, B.; STOLTE, M. Human intestinal spirochetosis : analysis of the symptoms of 209 patients. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 12, p. 1422–1427, 2007.

WESTERMAN, L. J. et al. Development of a real-time PCR for identification of *brachyspira* species in human colonic biopsies. **PLoS one**, v. 7, n. 12, p. e52281, jan. 2012.

## ANEXO 1 - FICHA DE COLETA

Número do caso \_\_\_\_\_

<b>Número de registro do exame (LAP)</b>	
_____ - _____	
<b>Informações demográficas (1)</b>	
Sexo (1.1)	( <input type="checkbox"/> ) Masculino / ( <input type="checkbox"/> ) Feminino
Data de nascimento (1.2)	/      /
Data da coleta da amostra (1.3)	/      /
Idade na data da coleta da amostra (1.4)	anos completos
<b>Informações histológicas e microbiológicas (2)</b>	
<b>Tipo de amostra coletada e resultado</b>	
( <input type="checkbox"/> ) Ceco (2.1)	<input type="checkbox"/> Presença de EI (revisão) 2.1.1 <input type="checkbox"/> Ausência de EI (revisão) 2.1.2 <input type="checkbox"/> IHQ Positiva 2.1.3 <input type="checkbox"/> IHQ negativa 2.1.4 <input type="checkbox"/> PCR positivo Ba 2.1.5 <input type="checkbox"/> PCR positivo Bp 2.1.6 <input type="checkbox"/> PCR negativo para EI 2.1.7
( <input type="checkbox"/> ) Côlon ascendente (2.2)	<input type="checkbox"/> Presença de EI (revisão) 2.2.1 <input type="checkbox"/> Ausência de EI (revisão) 2.2.2 <input type="checkbox"/> IHQ Positiva 2.2.3 <input type="checkbox"/> IHQ negativa 2.2.4 <input type="checkbox"/> PCR positivo Ba 2.2.5 <input type="checkbox"/> PCR positivo Bp 2.2.6 <input type="checkbox"/> PCR negativo para EI 2.2.7
( <input type="checkbox"/> ) Côlon transverso (2.3)	<input type="checkbox"/> Presença de EI (revisão) 2.3.1 <input type="checkbox"/> Ausência de EI (revisão) 2.3.2 <input type="checkbox"/> IHQ Positiva 2.3.3 <input type="checkbox"/> IHQ negativa 2.3.4 <input type="checkbox"/> PCR positivo Ba 2.3.5 <input type="checkbox"/> PCR positivo Bp 2.3.6 <input type="checkbox"/> PCR negativo para EI 2.3.7
( <input type="checkbox"/> ) Côlon descendente (2.4)	<input type="checkbox"/> Presença de EI (revisão) 2.4.1 <input type="checkbox"/> Ausência de EI (revisão) 2.4.2 <input type="checkbox"/> IHQ Positiva 2.4.3 <input type="checkbox"/> IHQ negativa 2.4.4 <input type="checkbox"/> PCR positivo Ba 2.4.5 <input type="checkbox"/> PCR positivo Bp 2.4.6 <input type="checkbox"/> PCR negativo para EI 2.4.7
( <input type="checkbox"/> ) Côlon <u>sigmóide</u> (2.5)	<input type="checkbox"/> Presença de EI (revisão) 2.5.1 <input type="checkbox"/> Ausência de EI (revisão) 2.5.2 <input type="checkbox"/> IHQ Positiva 2.5.3 <input type="checkbox"/> IHQ negativa 2.5.4 <input type="checkbox"/> PCR positivo Ba 2.5.5 <input type="checkbox"/> PCR positivo Bp 2.5.6 <input type="checkbox"/> PCR negativo para EI 2.5.7
( <input type="checkbox"/> ) Reto (2.6)	<input type="checkbox"/> Presença de EI (revisão) 2.6.1 <input type="checkbox"/> Ausência de EI (revisão) 2.6.2 <input type="checkbox"/> IHQ Positiva 2.6.3 <input type="checkbox"/> IHQ negativa 2.6.4 <input type="checkbox"/> PCR positivo Ba 2.6.5 <input type="checkbox"/> PCR positivo Bp 2.6.6 <input type="checkbox"/> PCR negativo para EI 2.6.7

Legenda: EI = espiroquetose intestinal IHQ = imunoistoquímica; PCR = resultado da amplificação gênica por reação da polimerase em cadeia; Ba = *Brachyspira aalborgi*; Bp = *Brachyspira pilosicoli*.

## ANEXO 2

**De:** "Human Pathology" <cmreyes@wisc.edu>

**Data:** 3 de julho de 2015 11:36:59 BRT

**Para:** [fat.univille@gmail.com](mailto:fat.univille@gmail.com)

**Assunto: A manuscript number has been assigned to "HUMAN INTESTINAL SPIROCHETOSIS IN JOINVILLE (BRAZIL): PATHOLOGICAL ANALYSIS OF 24 CASES"**

Ms. Ref. No.: YHUPA-D-15-00446

Title: HUMAN INTESTINAL SPIROCHETOSIS IN JOINVILLE (BRAZIL):  
PATHOLOGICAL ANALYSIS OF 24 CASES

Human Pathology

Dear Dr. TIRONI,

Your submission entitled "HUMAN INTESTINAL SPIROCHETOSIS IN JOINVILLE (BRAZIL): PATHOLOGICAL ANALYSIS OF 24 CASES" has been assigned the following manuscript number: YHUPA-D-15-00446.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System of Human Pathology as an author. The URL is  
<http://ees.elsevier.com/yhupa/>.

Your username is: [fat.univille@gmail.com](mailto:fat.univille@gmail.com)

If you need to retrieve password details,  
please go to: [http://ees.elsevier.com/yhupa/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/yhupa/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to the journal.

Kind regards,