TANIA ALEN COUTINHO

Caracterização de amostras de
Erysipelothrix spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos

São Paulo
2010

TANIA ALLEN COUTINHO

Caracterização de amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2279
FMVZ

Coutinho, Tania Alen

Caracterização de amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos / Tania Alen Coutinho. -- 2010.
190 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. *Erysipelothrix* spp. 2. Suínos. 3. PFGE. 4. AFLP. 5. Susceptibilidade antimicrobiana. I. Título.

ERRATA

isoladas de suínos nos últimos 30 anos]. 2010. 190 f. Tese (Doutorado em

Leia-se

isoladas de suínos nos últimos 30 anos. [Characterization of *Erysipelothrix* spp. strains isolated from swine in last 30 years]. 2010. 190 f.
Tese (Doutorado em

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização de amostras de *Erysipelothrix* spp isoladas de suínos nos últimos trinta anos", protocolado sob o nº 1119/2007, utilizando 100 (cem) suínos (peças de matadouro), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/06/09.

(We certify that the Research "Characterization of *Erysipelothrix* spp. strains isolated from swine in the last thirty years" samples isolated from swine in the last thirty years, protocol number 1119/2007, utilizing 100 (one hundred) swine, under the responsibility Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/10/2009.

São Paulo, 10 de junho de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: COUTINHO, Tania Alen

Título: Caracterização de amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu avó, Prof. Dr. José Moacyr Vianna Coutinho, exemplo de dedicação à pesquisa.

À minha mãe, mais preciosa jóia.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo pelas condições de trabalho proporcionadas e contribuição significativa à minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para que este estudo fosse realizado – **PROCESSO N° 06/55502-7**.

À Profa. Dra. Andrea Micke Moreno pelas oportunidade e orientação.

Ao Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) pelo envio de amostras de *Erysipelothrix* spp., que tanto contribuíram para realização deste trabalho.

Ao querido amigo Prof. Dr. David Emílio Santos Neves de Barcellos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo envio de amostras de *Erysipelothrix* spp. e, principalmente, pelos apoio e otimismo, que sempre me incentivaram.

À Dra. Yumiko Imada do “National Institute of Animal Health” Tsukuba/Japão pela gentileza de proceder a sorotipagem das amostras e pelos valiosos “e-mails” trocados.

Ao querido Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain pelos preciosos conselhos e apoio, cedidos sempre de forma desinteressada e sincera.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão pelas disposição em esclarecer dúvidas e amizade.

Ao veterinário Rodrigo de Barros Nogueira, responsável técnico pelo Frigorí Rajá Ltda – Carapicuíba/SP, por toda atenção, disposição em ajudar e amizade.

Aos queridos secretários do Departamento de Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Ana Virgínia P. Almeida Prado, Danival Lopes Moreira e Maria Cristina

Paick, por serem sempre tão gentis e atenciosos às minhas mais diversas solicitações.

Às ex-bolsitas, Cristina Ramon Amigo e Lígia Sader, pelas preciosas amizades e pelo auxílio na rotina bacteriológica do laboratório.

À amiga Ana Paula Santos da Silva pelo auxílio na rotina bacteriológica do laboratório e por tornar os últimos meses no laboratório mais alegres e leves.

Aos amigos “zoonóticos” Amane Paldês Gonçalves, Cássia Yumi Ikuta, Gisele Oliveira de Souza, Ricardo Pinho Gomez Lopez e Viviane Cambuí Mesquita Rocha, pelos constantes estímulos e carinho.

Aos queridos amigos Márcia Russo e Sergio Mello Teixeira Novita pela amizade e pelos momentos mais hilários do doutorado.

Ao querido amigo Alexandre Abelardo Sanchez pela paciência, pelos conselhos e estímulos.

À querida Vó Lila (Maria de Lourdes Coutinho) pelo apoio e pelas divertidas e calorosas acolhidas na Antônio de Gouveia Giudice, 958.

Aos meus queridos irmãos, Cíntia Alen Zimmermann e Felipe Alen Coutinho pelo apoio e carinho.

À querida irmã e excepcional profissional gráfica, Iara Coutinho Pasetchny, pelo lindo trabalho executado na capa desta tese e por todo apoio.

À “mamita linda”, Juana Alen Coutinho, por todo amor, dedicação, paciência e companherismo de uma vida inteira, mas principalmente nestes últimos quatro anos em São Paulo.

*Don't worry about a thing,
Cause every little thing is gonna be all right*

Three little birds - Bob Marley

RESUMO

COUTINHO, T. A. **[Caracterização de amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos]**. 2010. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Erysipelothrix rhusiopathiae é um importante patógeno em suinocultura e apesar do uso freqüente de vacinas contra o mesmo na maior parte das propriedades produtoras do país, a ocorrência de quadros clínicos da infecção tem sido amplamente observada e diagnosticada. Tendo em vista o ressurgimento deste agente como causa de prejuízos econômicos para a indústria suinícola nacional e seu potencial risco à saúde pública, este estudo teve como objetivo caracterizar 151 amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos por meio de sorotipagem, determinação da susceptibilidade antimicrobiana, AFLP e PFGE. Dentre os 151 isolados, 139 foram classificados em 18 sorotipos diferentes (1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 21, 24 e 25), sendo que o sorotipo 2b foi o mais freqüente. Os perfis de susceptibilidade antimicrobiana foram muito semelhantes entre os isolados, o que impossibilitou a subtipagem dos isolados de *Erysipelothrix* spp. pelos testes de sensibilidade. Dentre os *primers* testados no AFLP, o HI-G foi o mais adequado à tipagem molecular de *Erysipelothrix* spp. Apesar do AFLP/HI-G e da PFGE apresentarem o mesmo índice discriminatório (0,98), a PFGE apresentou melhor relação com os dados epidemiológicos que o AFLP/HI-G, tendo em conta os agrupamentos por ela gerados. Independente da técnica molecular empregada, não foi observado a discriminação entre isolados recentes e históricos, bem como um padrão epidemiológico fixo de agrupamento dos mesmos. Contudo, o AFLP/HI-G pode ser uma alternativa interessante para diferenciar as espécies de *Erysipelothrix*, assim como a PFGE tem grande potencial para agrupar isolados deste gênero de acordo com os sorotipos.

Palavras-chave: *Erysipelothrix* spp. Suínos. PFGE. AFLP, Susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

COUTINHO, T. A. **Characterization of *Erysipelothrix* spp. strains isolated from swine in last 30 years.** [Caracterização de amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos]. 2010. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Erysipelothrix rhusiopathiae is an important pathogen in swine production and even with the frequent use of vaccines against it in most of Brazilian pig farms, the occurrence of clinical manifestations of its infection has been widely observed and diagnosed. Given the resurgence of this agent as a cause of economic losses to the national pig industry and its potential risk to public health, this study aimed to characterize 151 samples of *Erysipelothrix* spp. isolated from swine in last 30 years by serotyping, determination of antimicrobial susceptibility, AFLP and PFGE. Among the 151 isolates, 139 were classified in 18 different serotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 21, 24 and 25) and serotype 2b was the most frequent. The susceptibility profiles were very similar among the isolates, which precluded the subtyping of *Erysipelothrix* spp. isolates by sensitivity tests. Among the *primers* tested in AFLP, the HI-G was the most suitable for molecular typing of *Erysipelothrix* spp. Despite AFLP/HI-G and PFGE provided the same discriminatory index (0.98), PFGE presented better relationship with epidemiological data than AFLP/HI-G, given the types of groups generated by it. Regardless of the molecular technique employed, there was no discrimination between recent and historical isolates as well as a fixed epidemiological pattern of grouping them. Nevertheless AFLP/HI-G could be an interesting alternative for *Erysipelothrix* species discrimination, even as PFGE has a good potential to differentiate this genus according to serotypes.

Key words: *Erysipelothrix* spp. Swine. PFGE. AFLP. Antimicrobial susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Filogenia de <i>Erysipelothrix</i> spp.	27
Figura 2 -	Cultivo de 48 horas de <i>Erysipelothrix</i> spp. em ágar sangue ázida (Fonte: Arquivo pessoal)	28
Figura 3 -	Morfologia celular e colonial de <i>E. rhusiopathiae</i> (Fonte: WOOD, 1999)	29
Figura 4 -	Lesão em pele de camundongo após seis horas de infecção com cepa Fujysawa-SmR de <i>E. rhusiopathiae</i> . No interior das células fagocíticas existem microorganismos morfologicamente intactos, alguns ainda sob divisão. Micrografia eletrônica preparada pelo Dr. Shogo Tanaka. (Fonte: SHIMOJI, 2004)	37
Figura 5 -	Lesões cutâneas em forma de losângos por toda a carcaça (Fonte: FURIATTI, 2009)	46
Figura 6 -	Endocardite vegetativa por <i>E. rhusiopathiae</i> (Fonte: FURIATTI, 2009)	47
Figura 7 -	Artrite por <i>E. rhusiopathiae</i> em superfície articular de fêmur (Fonte: ALBERTON et al.; 2003)	48
Figura 8 -	Fetos mumificado e abortado por infecção de <i>E. rhusiopathiae</i> . Diagnóstico por PCR (Fonte: Arquivo pessoal)	49
Figura 9 -	Produção de H ₂ S por amostra de <i>Erysipelothrix</i> spp. em ágar TSI (Fonte: Arquivo pessoal)	52
Figura 10 -	Discriminação dos isolados utilizados nos experimentos	65
Figura 11 -	Disco-difusão realizada em amostras de <i>Erysipelothrix</i> spp.	89
Figura 12 -	Microdiluição em placa - formação do “botão” no fundo dos poços, denotando a resistência do isolado histórico de <i>E. rhusiopathiae</i> às concentrações de neomicina testadas na placa	92

Figura 13 -	Gel de PCR - amplificação dos fragmentos de DNA de 407pb (<i>Erysipelothrix</i> spp.) e de 937pb (<i>E. rhusiopathiae</i>). Colunas 4, 5, 10, 11 e 18 representam amostras positivas somente para o gênero <i>Erysipelothrix</i> . Colunas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 e 15 representam amostras positivas para espécie de <i>E. rhusiopathiae</i> . Colunas 22, 23 e 24 representam respectivamente controle positivo, controle negativo e marcador de peso molecular 100pb	94
Figura 14 -	Gel de AFLP - coluna 1 e 30 - marcadores de peso molecular de 100pb, colunas de 2 a 29 - perfis formados pela reação de AFLP-PCR utilizando o <i>primer</i> HI-A	95
Figura 15 -	Dendrograma AFLP / HI-A baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamentos pelo coeficiente de Dice	97
Figura 16 -	Gel de AFLP - Coluna 1 e 30 - marcadores de 100 pares de bases, colunas 2 a 29 - perfis formados pela reação de AFLP-PCR utilizando o <i>primer</i> HI-G	98
Figura 17 -	Dendrograma AFLP / HI-G baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamentos pelo coeficiente de Dice	100
Figura 18 -	Gel de AFLP - coluna 1 e 30 - marcadores de 100 pares de bases, colunas 2 a 29 - perfis formados pela reação de AFLP-PCR utilizando o <i>primer</i> HI-T	101
Figura 19 -	Dendrograma AFLP / HI-T baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamentos pelo coeficiente de Dice	103
Figura 20 -	Gel de PFGE - colunas 1 a 14 representam alguns dos perfis eletroforéticos encontrados a partir do emprego da enzima <i>Sma</i> I. Coluna 15 representa o marcador de peso molecular λ DNA-PFGE (BioLabs.)	104
Figura 21 -	Dendrograma PFGE baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamentos pelo coeficiente de Dice	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características das espécies de <i>Erysipelothrix</i>	53
Quadro 2 -	Resolução taxonômica de algumas técnicas	59
Quadro 3 -	Composição do meio utilizado no teste de disco-difusão	67
Quadro 4 -	Princípios antimicrobianos utilizados na disco-difusão e respectivas concentrações	68
Quadro 5 -	Critérios para interpretação dos halos de inibição do teste de disco-difusão	70
Quadro 6 -	Disposição e concentrações (µg/mL) dos princípios antimicrobianos na placa Sensititre BOPO6F – Trek Diagnostics Systems	71
Quadro 7 -	Composição do meio VFM modificado	72
Quadro 8 -	Critérios para interpretação das concentrações inibitórias mínimas do teste de microdiluição	73
Quadro 9 -	Critérios de interpretação do coeficiente Kappa	75
Quadro 10 -	<i>Primers</i> utilizados para detecção simultânea de gênero e espécie	76
Quadro 11 -	Sítio de restrição da enzima <i>Hind</i> III, adaptadores e seqüências de bases dos adaptadores e dos <i>primers</i> HI-A, HI-G e HI-T	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sorotipos dos 151 isolados de <i>Erysipelothrix</i> spp.	86
Tabela 2 -	Perfil qualitativo de susceptibilidade antimicrobiana das amostras de <i>Erysipelothrix</i> spp. de acordo com grupo de isolados	88
Tabela 3 -	Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos 18 agentes antimicrobianos frente aos 151 isolados de <i>Erysipelothrix</i> spp.	90
Tabela 4 -	Perfil quantitativo de susceptibilidade antimicrobiana das amostras de <i>Erysipelotrix</i> spp. de acordo com grupo de isolados	91
Tabela 5 -	Características gerais dos AFLPs gerados conforme o <i>primer</i> utilizado	95

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Detecção de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> em casos de mumificação fetal, natimortalidade e abortamento	142
Apêndice B -	Characterization of <i>E. rhusiopathiae</i> isolated from <i>T. pecari</i>	145
Apêndice C -	Genotyping of Brazilian <i>Erysipelothrix</i> spp. strains by AFLP technique	158
Apêndice D -	Phenotypic and molecular characterization of recent and archived <i>Erysipelothrix</i> spp. isolated from Brazilian swine ...	177

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α	alfa
β	beta
λ	lambda
$^{\circ}$	grau angular
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
®	marca registrada
>	maior
$\geq$	maior ou igual
<	menor
$\leq$	menor ou igual
%	porcento
<i>Alu</i> I	enzima obtida a partir do <i>Arthrobacter luteus</i>
apud	citado por
<i>Asc</i> I	enzima obtida a partir de <i>Arthrobacter</i> spp.
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>buffer</i>	tampão de enzima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
et al.	e colaboradores
g	gramas
<i>g</i>	força centrífuga relativa
HCl	cloreto de hidrogênio
<i>Hind</i> III	enzima obtida a partir de <i>Haemophilus influenzae</i> Rd
H ₂ O	água
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio

Kb	quilo base
L	litro
M	molar
Mb	mega base
mg	miligramas
Mg ₂ Cl	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
Not I	enzima obtida a partir de <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
<i>overnight</i>	período de incubação de 18 a 24 horas
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PCR <i>duplex</i>	reação em cadeia pela polimerase que amplifica simultaneamente dois oligonucleotídeos específicos
pH	concentração de hidrogênio iônico
pmoles	picomoles
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluoreto
<i>primers</i>	iniciadores
REP-PCR	Repetitive extragenic palindromic PCR
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico
RS	Rio Grande do Sul
<i>Rsa</i> I	enzima obtida a partir de <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
S	coeficiente de sedimentação de Svedberg
<i>Sma</i> I	enzima obtida a partir de <i>Serratia marcescens</i>
Taq	enzima obtida a partir de <i>Termus aquaticus</i>
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TE	tampão tris-EDTA
Tris	hidroximetil-aminometano

U	unidade
UFC	unidade formadora de colônia
µg	micrograma
µL	microlitro
V	volts
V/cm	volts por centímetro
VFM	veterinary fastidious medium
v/v	volume/volume
X	vez

Obs: Visto estarem consagradas na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	NOMENCLATURA	24
2.2	TAXONOMIA	25
2.3	BACTERIOLOGIA	28
2.3.1	Morfologia, requerimentos nutricionais e metabolismo	28
2.3.2	Estrutura de parede e antigenicidade	30
2.3.3	Fatores de virulência	31
2.3.3.1	Cápsula	32
2.3.3.2	Proteínas de superfície	32
2.3.3.3	Enzimas extracelulares	34
2.3.4	Patogenia	35
2.3.4.1	Interações bacterianas com as células fagocíticas	36
2.3.4.2	Ativação do complemento	37
2.3.5	Imunidade do hospedeiro	38
2.3.5.1	Imunidade humoral	38
2.3.5.2	Imunidade celular	39
2.4	EPIDEMIOLOGIA	39
2.5	ERISPELA SUÍNA	41
2.5.1	No Brasil	42
2.5.2	Manifestações clínicas	44
2.5.2.1	Aguda	45
2.5.2.2	Subaguda	46
2.5.2.3	Crônica	47
2.5.2.4	Reprodutiva	48
2.6	DIAGNÓSTICO	51
2.6.1	Cultivo	51
2.6.2	Sorodiagnóstico	54
2.6.3	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	54

2.7	TIPAGEM	56
2.8	TRATAMENTO E CONTROLE DA ERISPELA SUÍNA	60
2.8.1	Tratamento	60
2.8.2	Controle	61
3	OBJETIVOS	63
3.1	GERAL	63
3.2	ESPECÍFICOS	63
4	MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1	AMOSTRAS	64
4.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	66
4.2.1	Identificação sorológica	66
4.2.2	Perfil de sensibilidade antimicrobiana	67
4.2.2.1	Disco-difusão	67
4.2.2.2	Microdiluição	71
4.2.2.3	Coeficiente Kappa de concordância	75
4.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	76
4.3.1	PCR	76
4.3.1.1	Extração do DNA bacteriano	76
4.3.1.2	Amplificação do DNA	77
4.3.1.3	Deteção do produto de amplificação	78
4.3.2	Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)	78
4.3.2.1	Extração do DNA bacteriano	79
4.3.2.2	Digestão do DNA bacteriano	79
4.3.2.3	Ligação dos adaptadores ao DNA digerido	79
4.3.2.4	Amplificação do DNA digerido e ligado aos adaptadores	80
4.3.2.5	Deteção do produto de amplificação	81
4.3.2.6	Análise estatística dos fragmentos amplificados e determinação do índice discriminatório (ID)	81
4.3.3	Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	82
4.3.3.1	Extração do DNA genômico	82
4.3.3.2	Macrorestrição do DNA genômico	83

4.3.3.3	Eletroforese em campo pulsado	84
4.3.3.4	Análise estatística dos fragmentos de restrição e determinação do índice discriminatório (ID)	84
5	RESULTADOS	85
5.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	85
5.1.1	Identificação sorológica	85
5.1.2	Perfil de sensibilidade antimicrobianas	87
5.1.2.1	Disco-difusão	87
5.1.2.2	Microdiluição	89
5.1.2.3	Coeficiente Kappa de concordância	93
5.2	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	93
5.2.1	PCR	93
5.2.2	AFLP	94
5.2.2.1	<i>Primer</i> HI-A	94
5.2.2.2	<i>Primer</i> HI-G	98
5.2.2.3	<i>Primer</i> HI-T	101
5.2.3	PFGE	104
6	DISCUSSÃO	108
6.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	108
6.1.1	Identificação sorológica	108
6.1.2	Perfil de sensibilidade antimicrobiana	110
6.1.2.1	Disco-difusão	110
6.1.2.2	Microdiluição	112
6.2	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	113
6.2.1	PCR	113
6.2.2	AFLP	114
6.2.3	PFGE	116
7	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	123
	APÊNDICES	141

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira, ao longo das últimas décadas, tornou-se uma atividade moderna, tecnificada e altamente produtiva, que vem abastecendo tanto o mercado interno como o externo. Para que esta atividade atingisse a atual condição foram necessários inúmeros investimentos tecnológicos e financeiros, além de profundas alterações nos sistemas de produção pré-existentes.

Uma alteração de destaque que ocorreu na suinocultura nacional, e que permanece como forte tendência, é a concentração da atividade. Esta pode ser verificada pela redução gradativa do número de propriedades envolvidas e pelo aumento significativo dos plantéis que permanecem em produção. Nestas condições, o desafio sanitário a que os rebanhos são submetidos é cada vez maior e medidas, que controlem ou reduzam os efeitos deletérios de agentes infecciosos, se tornam indispensáveis à boa rentabilidade da atividade.

Algumas enfermidades que no passado recente pareciam controladas, seja por boas práticas de manejo, imunização em massa de rebanhos ou por tratamentos profiláticos, têm reemergido nos sistemas produtivos de suínos. Esses processos infecciosos têm gerado o baixo desempenho dos animais, o aumento da taxa de mortalidade em algumas faixas etárias, o aumento do custo de produção pela instituição do tratamento profilático, assistência veterinária e mão-de-obra, além dos prejuízos relacionados às condenações e aproveitamentos parciais de carcaças nos abatedouros. A erisipela suína é uma das enfermidades que se encaixa neste perfil.

Visando definir medidas efetivas de controle da erisipela suína, é fundamental o conhecimento de aspectos relacionados à epidemiologia deste agente bacteriano. A carência de informações referentes às características epidemiológicas desse patógeno na suinocultura brasileira é grande, uma vez que os estudos já realizados no país foram raramente conduzidos, além da inexistência de estudos de epidemiologia molecular de *Erysipelothrix* spp.

Erysipelothrix rhusiopathiae, a espécie bacteriana responsável pela erisipela suína, está amplamente disseminada no ambiente e tem sido isolada de

uma série de animais, incluindo o homem. Apesar da infecção por este microorganismo em seres humanos ser de caráter ocupacional, ela é incontestavelmente uma zoonose.

Neste contexto, o patógeno *E. rhusiopathiae* assume papel importante no cenário dos sistemas produtivos de suínos pelos prejuízos econômicos e de bem estar animal associados a sua infecção, além de seu potencial zoonótico, em razão do que constituiu interesse a realização deste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão referente ao presente estudo diz respeito, quase que exclusivamente, à espécie *E. rhusiopathiae*, uma vez que, há pouco menos de duas décadas o gênero *Erysipelothrix* passou a ser composto por mais de uma espécie, além de a literatura recente pouco abordar as demais espécies, cujas respectivas patogenidades a outras espécies animais ainda não foram confirmadas.

2.1 NOMENCLATURA

A bactéria hoje conhecida como *Erysipelothrix rhusiopathiae* foi isolada pela primeira vez no ano de 1876 por Koch, a partir do sangue de um camundongo inoculado subcutaneamente com exsudato sanguíneo de carne pútrida e designou-a como *Erysipelothrix muriseptica* (MCLAUCHLIN; JONES, 1998). No entanto, somente em 1886, Löffler, observando um organismo similar em vasos sanguíneos da pele de um suíno acometido por “ruiva”, descreveu acuradamente pela primeira vez o microorganismo. É provável que o bacilo observado alguns meses antes por Pasteur e Dumas em suínos mortos por “ruiva” fosse o mesmo organismo descrito por Löffler (BROOKE; RILEY, 1999).

No ano de 1885, o nome *Erysipelothrix insidiosa* foi proposto por Trevisan. Quinze anos após, Migula propôs um novo nome, *Bacterium rhusiopathiae*, para isolados de suínos. Subsequentemente, Rosenbach (1909), o primeiro pesquisador a estabelecer o *Erysipelothrix* como um patógeno humano, conduziu um estudo comparativo de diferentes isolados e sugeriu os nomes *E. muriseptica*, *E. porci* e *E. erysipeloides* para isolados de camundongo, suíno e humano, respectivamente (REBOLI; FARRAR, 1992).

A combinação nominal *Erysipelothrix rhusiopathiae* foi proposta inicialmente por Buchanan em 1918. Ao longo da literatura apareceram cerca de

36 nomes para espécies e gênero. Posteriormente, Langford e Hansen (1953, 1954) descreveram todas as amostras como pertencentes a uma única espécie e propuseram o nome *E. insidiosa*. Contudo, em 1966, Shuman e Wellmann sugeriram a rejeição do nome *E. insidiosa* em favor da conservação de *E. rhusiopathiae* (REBOLI; FARRAR, 1992).

2.2 TAXONOMIA

Devido às recentes análises das sequências de nucleotídeos da menor subunidade do RNA ribossômico, ao invés dos dados fenotípicos, houve um rearranjo de classes e, por consequência, das respectivas subclassificações no quadro filogenético (LUDWIG; SCHLEIFER; WHITMAN, 2009). A classe dos *Mollicutes*, que incluía as ordens *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incertae sedis* (ordem a qual o gênero *Erysipelothrix* pertencia), foi removida do filo *Firmicutes* e então, adicionada ao filo *Tenericutes*. Com isso, a criação de uma classe separada no filo *Firmicutes* se fez necessária para comportar a família *Erysipelotrichaceae*. Esta família, composta por organismos Gram positivos formadores de parede, foi mantida no filo *Firmicutes*, mas sob nova classe e ordem, respectivamente, *Erysipelotrichi* e *Erysipelotrichales* (LUDWIG; SCHLEIFER; WHITMAN, 2009). A nova classificação reconhece a baixa similaridade do RNA ribossômico desse grupo em relação aos outros membros ou ao filo, assim como a similaridade na parede celular e outras características fenotípicas (LUDWIG; SCHLEIFER; WHITMAN, 2009).

A família *Erysipelotrichaceae* agora é organizada em oito gêneros: *Erysipelothrix*, *Allobaculum*, *Bulleidia*, *Catenibacterium*, *Coprobacillus*, *Holdemania*, *Solobacterium* e *Turicibacter*. Existem ainda, determinadas espécies, cujos gêneros não pertencem à família *Erysipelotrichaceae* e que, no entanto, devem ser incluídas dentro da família no futuro. São elas: *Clostridium catenaformis*, *C. cocleatum*, *C. innocuum*, *C. ramosum*, *C. spiroforme*,

Eubacterium bifforme, *E. cylindroides*, *E. dolichum*, *E. tortuosum*, *Lactobacillus catenaformis*, *L. Vitulinus* e *Streptococcus pleomorphus* (LUDWIG; SCHLEIFER; WHITMAN, 2009).

O gênero *Erysipelothrix*, classificado como membro da família Erysipelotrichaceae, é constituído atualmente por três espécies: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Erysipelothrix tonsillarum* e *Erysipelothrix inopinata* (VERBARG et al., 2004). Outras duas espécies, hoje denominadas de *Erysipelothrix* sp. cepa 1 e *Erysipelothrix* sp. cepa 2, foram propostas. Estas são representadas, respectivamente, pelos sorotipos 13 e 18, cujos baixos níveis de hibridização tanto com cepas padrão da espécie *E. rhusiopathiae* quanto *E. tonsillarum* indicariam que esses sorotipos poderiam ser membros de uma nova espécie genômica (TAKAHASHI et al., 1992).

Apesar das características fenotípicas das espécies *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* tornarem as mesmas indistinguíveis (exceto pela capacidade da espécie *E. tonsillarum* fermentar sacarose em detrimento da inabilidade da segunda espécie), os valores de homologia de DNA permitem a distinção das duas espécies (TAKAHASHI et al., 1992). A espécie *E. rhusiopathiae* é representada por cepas virulentas responsáveis por processos patogênicos em diversos animais, inclusive o homem (WOOD, 1999). A espécie *E. tonsillarum* é representada por cepas isoladas de tonsilas de suínos, bovinos e frangos aparentemente sadios (TAKAHASHI et al., 1987a; NAKAZAWA et al., 1998; HASSANEIN et al., 2003) e é reportada como avirulenta em suínos e camundongos (TAKAHASHI et al., 1987b). Contudo, a espécie *E. tonsillarum* já foi identificada como agente etiológico de endocardite em cães (ERIKSEN et al., 1987), indicando que algumas cepas possam ser patogênicas à espécie canina (TAKAHASHI et al., 2000).

Já a espécie *E. inopinata* apresenta um único representante, o qual foi isolado como contaminante de um meio de cultivo de base vegetal e alocado como uma nova espécie dentro do gênero *Erysipelothrix*, devido a diferenças filogenéticas e na estrutura de peptidoglicano (VERBARG et al., 2004).

Um esquema simplificado da filogenia de *Erysipelothrix* spp é apresentado na figura 1.

Figura 1 - Filogenia de *Erysipelothrix* spp.

2.3 BACTERIOLOGIA

2.3.1 Morfologia, requerimentos nutricionais e metabolismo

O *E. rhusiopathiae* é um microorganismo Gram positivo, bacilar, reto ou levemente curvo, delgado com extremidades arredondadas, não formador de esporos e imóvel. Este agente bacteriano pode ser encontrado sob arranjo singular, em pequenas cadeias, aos pares em configuração “V” ou ainda, agrupados ao acaso. Filamentos e longas cadeias podem ser observados com menor frequência (REBOLI; FARRAR, 1992).

Em ágar sangue as colônias podem ser α -hemolíticas (Figura 2), mas nunca β -hemolíticas, existindo três apresentações coloniais e microscópicas de *E. rhusiopathiae* (Figura 3). Após 24 a 48 horas, a 37 °C, as colônias são muito pequenas (0,1 mm de diâmetro), convexas, circulares, transparentes, brilhantes e com superfície e extremidades lisas. Estas são chamadas de formas lisas ou formas S (*smooth forms*).

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2 - Cultivo de 48 horas de *Erysipelothrix* spp. em ágar sangue ázida

Em culturas mais velhas, as colônias são maiores (0,2 a 0,4 mm de diâmetro), de centro opaco, achatadas e de extremidades fimbriadas. Estas são chamadas de formas rugosas ou formas R (*rough forms*). Formas intermediárias também podem ser vistas (EWALD, 1981).

Simultaneamente a essas alterações de morfologia e características culturais ocorrem mudanças nas propriedades de virulência e antigenicidade. No entanto, os antígenos específicos permanecem inalterados. A morfologia varia conforme o meio, pH e temperatura de incubação (RIBOLI; FARRAR, 1992).

Fonte: WOOD, 1999.

Figura 3 - Morfologia celular e colonial de *E. rhusiopathiae*

O *E. rhusiopathiae* cresce em temperaturas entre 15 a 44 °C (temperatura ótima entre 30 e 37 °C) e em pH entre 6,7 a 9,2 (pH ótimo entre 7,2 a 7,6). É um microorganismo anaeróbio facultativo, mas pode ter seu crescimento favorecido sob atmosfera microaerófila (5 a 10 % de CO₂), estando ainda apto a crescer na presença de 0,2 % de fenol, 0,1 % de ázida sódica, 0,001 % de cristal violeta, 0,05 % de telurito de potássio, 0,02 % de acetato de tálio e 0,2 % de cloreto de trifetil-tetrazolium (EWALD, 1981).

Os requerimentos nutricionais exatos ainda não foram determinados, porém, riboflavina, pequenas quantidades de ácidos oléicos e muitos aminoácidos, particularmente triptofano e arginina, são essenciais (REBOLI; FARRAR, 1992). O crescimento pode ser potencializado por sangue, 5 a 10 % de soro, triptofano e glicose (EWALD, 1981).

O melhor crescimento ocorre na presença de 0,1 % e 0,5 % de glicose, respectivamente, em caldo e ágar (BROOKE; RILEY, 1999). Entretanto, grandes quantidades de glicose podem ser inibitórias. O metabolismo da glicose em *E. rhusiopathiae* se dá pela via Embden-Meyerhof-Parnas e em menores proporções por via pentose fosfato (ROBERTON; MCCULLOUGH, 1960). O ciclo do ácido tricarboxílico é relativamente sem importância (MCLAUCHLIN; JONES; 1998). O citrato exógeno não é utilizado, a atividade fermentativa é fraca e ocorre a partir de poucos açúcares (glicose, lactose, frutose e galactose) (KARLSON; MERCHANT, 1941).

2.3.2 Estrutura de parede e antigenicidade

A parede celular do *E. rhusiopathiae* é do tipo Gram positiva e o ácido diamino peptidoglicano da mesma é a lisina (FEIST, 1972). Ácidos micólicos e teicóicos são ausentes. Por outro lado, um grande número de açúcares como arabinose, galactose, glicose, glicose-6-fosfato, galactose-6-fosfato, ribose e xilose estão presentes na parede celular, sendo que a partir dos padrões de monossacarídeos formados na parede celular foram definidos três quimiotipos, os quais não estão relacionados aos sorotipos (FEIST, 1972).

A base da sorotipagem de amostras de *Erysipelothrix* foi fundamentada em 1940 por Watts, que relatou que a maioria das amostras possuía dois tipos de antígeno, uma proteína termo lábil espécie-específica e um antígeno termo-ácido estável de composição polissacarídica (WANG; CHANG; RILEY, 2009). No início reconheciam-se dois principais sorotipos, “A” e “B”, e aquelas amostras que não reagiam com antisoros específicos eram classificadas em um grupo “N”

(MCLAUCHLIN; JONES, 1998). Devido à variação nos métodos prévios de extração antigênica, o esquema alfabético de sorotipagem foi substituído pelo sistema arábico de numeração (KUCSERA, 1973).

Atualmente o método padrão de sorotipagem é o teste de precipitação dupla em gel de agarose com antisoros específicos de coelhos e antígenos recuperados por extração térmica úmida (TAKAHASHI et al., 1996).

A sorotipagem classifica as amostras de *Erysipelothrix* como pertencentes aos sorotipos 1 a 26 e “N”, sendo que os sorotipos 1 e 2 são subtipados em “a” e “b” (NORRUNG; MOLIN, 1991). Em suínos, 75 a 80 % dos isolados pertencem aos sorotipos 1 e 2. O sorotipo 1a tem sido amplamente isolado de casos agudos de erisipela suína, enquanto que o sorotipo 2a mais prevalente em formas crônicas da doença (WANG; CHANG; RILEY, 2009). Entretanto, alguns estudos fornecem resultados contraditórios, ao demonstrar que todas as condições clínicas podem ser induzidas experimentalmente em suínos susceptíveis com uma variedade de sorotipos (WOOD; HARRINGTON, 1978; KUCSERA, 1979; HASSANEIN et al., 2003). Esses dados tornam questionável o valor prático da sorotipagem na classificação das amostras de *Erysipelothrix* (WANG; CHANG; RILEY, 2009).

2.3.3 Fatores de virulência

Relativamente pouco se sabe a respeito dos mecanismos de patogenia das infecções por *E. rhusiopathiae* (BROOKE; RILEY, 1999). O curso das doenças promovidas pelo agente depende da resistência do hospedeiro e da virulência da cepa envolvida, porém o fator responsável pela variação de virulência ainda não foi identificado (GYLES, 1993). Vários fatores de virulência têm sido sugeridos, apesar de suas relativas importâncias ainda não terem sido confirmadas (BROOKE; RILEY, 1999).

2.3.3.1 Cápsula

O fator de virulência mais importante do *E. rhusiopathiae* é um polissacarídeo ácido localizado na superfície celular e o termo “cápsula” tem sido usado para fazer referência a esse componente (SHIMOJI, 2000). A cápsula é frouxamente ligada à superfície celular, por isso apresenta-se como lodo ou glicocálix (SHIMOJI, 2000).

O papel da cápsula na virulência do *E. rhusiopathiae* foi examinada em um estudo envolvendo mutagênese do transposon Tn916, onde os mutantes de Tn916, que perdiam a cápsula, eram completamente avirulentos em camundongos. Além de uma cepa reverter a virulência após a aquisição da habilidade de produzir cápsula pela excisão espontânea do transposon (SHIMOJI et al., 1994).

2.3.3.2 Proteínas de superfície

As proteínas de superfície de uma bactéria Gram positiva têm papel fundamental na virulência, funcionando freqüentemente como adesinas ou fatores antifagocíticos. Takahashi et al. (1987b) demonstraram que cepas virulentas de *E. rhusiopathiae* aderem melhor às células renais de suínos do que as avirulentas e que um componente de superfície termo-lábil e tripsina-sensível é importante no processo de aderência à célula hospedeira, entretanto, esse componente ainda não foi identificado.

Até o momento, poucos foram os genes codificadores de proteínas de superfície de *E. rhusiopathiae* investigados.

A proteína *spaA*, por exemplo, é o maior antígeno protetor localizado na superfície (MAKINO et al., 1998; SHIMOJI; MORI; FISCHETTI, 1999). Esta proteína possui estrutura e seqüência de aminoácidos na região C-terminal muito similares às das proteínas de ligação à colina do *Streptococcus pneumoniae*,

uma das quais, apresenta função específica de adesina. No entanto, esta função da *spaA* na espécie *E. rhusiopathiae* ainda precisa ser elucidada (SHIMOJI, 2004). To e Nagai (2007), investigando a sequência genética da proteína *spaA*, verificaram que os tamanhos da fase aberta de leitura (ORF) do gene *spa* variavam em comprimento conforme o sorotipo da cepa de *E. rhusiopathiae*. Dessa maneira, as proteínas *spa* foram divididas em três espécies moleculares designadas de *spaA* (abrangendo os sorotipos 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17 e N), *spaB* (sorotipos 4, 6, 11, 19 e 21) e *spaC* (sorotipo 18). Os três tipos de proteína *spa* são antigenicamente diferentes e antisoros reagem fortemente contra proteínas homólogas, mas de moderado a fraco frente a *spa* heterólogas, sendo a proteína *spaC* a maior indutora de proteção cruzada entre as três variedades (TO; NAGAI, 2007). Esse achado sugere que a proteína *spa* possa ser um fator de virulência de *E. rhusiopathiae* e que, de um ponto de vista prático, a presença ou ausência da mesma poderia ser um marcador útil na diferenciação das espécies *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum*, uma vez que a segunda espécie não possui a proteína (TO; NAGAI, 2007). Assim como To e Nagai (2007), Shen, Bender e Opriessnig (2010)¹ não detectaram nenhum tipo de *spa* em *E. tonsillarum* por meio de PCR convencional e Real-time, contudo, o segundo grupo de pesquisadores detectou *spaB* no sorotipo 8, divergindo do resultado de To e Nagai (2007). Ingebritson, Roth e Hauer (2010) investigando cepas de *Erysipelothrix* spp. de diferentes sorotipos por meio da detecção dos genes *spaA*, *spaB* e *spaC*, assim como respectivos produtos de expressão, demonstraram que o tipo de *spa* não é restrito a um tipo sorológico específico e que isolados de *Erysipelothrix* spp. de origem aquática são mais variáveis que os de origem terrestre por expressarem mais de um tipo de *spa*. O gene *spaA* é altamente conservado entre os sorotipos mais frequentemente implicados em erisipelas suínas clínicas (sorotipo 1 e 2) e a expressão de tipos homólogos de *spa* explicaria a alta taxa de proteção cruzada entre estes sorotipos (INGEBRITSON; ROTH; HAUER, 2010). Estes autores ainda sugerem que os surtos de erisipela suína estariam associados, não somente, aos manejos inadequados de vacinação dos rebanhos, como também, à natureza variável da proteção cruzada conferida pelas proteínas *spa*.

¹ SHEN, H. G.; BENDER, J. S.; OPRIESSNIG, T. Identification of surface protective antigen (*spa*) types in *Erysipelothrix* reference strains and diagnostic samples by *spa* multiplex real-time and conventional PCR assays. **Journal of Applied Microbiology**. In press. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/123421812/PDFSTART>> Acesso em 10 mai. 2010.

Por meio da clonagem de cepas de *E. rhusiopathiae*, seguida da produção de antisoros contra clones recombinantes em cobaias, foi detectada a reatividade das proteínas de massas moleculares entre 64 e 66 kDa dos antígenos de superfície solubilizáveis em detergente. Essas proteínas, por sua vez, foram menos expressas em cepas de baixa e moderada virulência comparadas às de alta virulência (GALÁN; TIMONEY, 1990). Entretanto, nem a sequência de DNA do gene e nem a função das proteínas foram descritas (SHIMOJI, 2004).

E. rhusiopathiae ainda contém duas proteínas de superfície adicionais, com massas moleculares 85 e 220 kDa. Essas, participam da formação de biofilmes e podem, portanto, ter papel importante na colonização do hospedeiro (SHIMOJI et al., 2004).

2.3.3.3 Enzimas extracelulares

E. rhusiopathiae produz várias enzimas que podem estar envolvidas na patogenia da infecção e entre elas destacam-se a neuroaminidase e a hialuronidase.

A neuroaminidase (sialidase) libera os resíduos terminais do ácido siálico de glicoproteínas, glicolípídeos e oligossacarídeos expressos pelas células hospedeiras (SHIMOJI, 2004). Nakato, Shinomiya, Mikawa (1986a) observaram uma distribuição *in vivo* da invasão bacteriana concomitante à perda de ácido siálico dos sítios das regiões arteriais, assim como uma adesão *in vitro* de *E. rhusiopathiae* às células endoteliais da aorta foi inibida pela adição de N-acetilneuroamin-lactose, substrato da neuroaminidase bacteriana. Desta maneira, demonstrou-se o importante papel da neuroaminidase de *E. rhusiopathiae* na adesão e subsequente invasão à célula hospedeira (SHIMOJI, 2004). A invasão endotelial pode contribuir para os distúrbios vasculares, os quais são usualmente observados no início de processos septicêmicos agudos em suínos (SHIMOJI, 2004).

A hialuronidase é um fator de dispersão, que facilita a disseminação de patógenos pelos tecidos por meio do rompimento do ácido hialurônico, um polissacarídeo de alto peso molecular encontrado na matriz extracelular de células hospedeiras (SHIMOJI, 2004). Em camundongos, a enzima não foi essencial para a patogênese da infecção por *E. rhusiopathiae*, porém, pode ser que em outros hospedeiros seja diferente (SHIMOJI, 2000). Possivelmente as produções de hialuronidase e cápsula sejam reguladas pelo mesmo locus genético (SHIMOJI, 2004).

A superperóxido dismutase e a catalase produzidas pelo *E. rhusiopathiae* podem ser potenciais fatores de virulência, uma vez que suas funções estão relacionadas à repressão dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células fagocíticas, o que garantiria a sobrevivência bacteriana no interior das mesmas (SHIMOJI, 2004).

2.3.4 Patogenia

E. rhusiopathiae pode infectar seus hospedeiros por variadas vias de entrada. No entanto, infecções naturais em suínos e em outras espécies animais possivelmente resultam da ingestão de água ou alimentos contaminados (SHIMOJI, 2004). Em suínos, é a partir das tonsilas e de outros tecidos linfóides ao longo do trato digestório que a bactéria atinge tecidos corporais mais profundos ou a corrente sanguínea (WOOD, 1999). Entretanto, a porta de entrada precisa nos hospedeiros permanece desconhecida (WOOD, 1999).

Em infecções experimentais de suínos, após a invasão da corrente sanguínea segue-se a distribuição do patógeno por diversos órgãos (principalmente coração, baço, rins e articulações) entre um a sete dias (WOOD, 1999). Esta invasão das células endoteliais pode contribuir para os distúrbios vasculares, os quais são usualmente observados nos estágios iniciais de erisipela suína aguda (SHIMOJI, 2004). *E. rhusiopathiae* parece ter a habilidade de invadir outros tipos celulares como condrócitos e células sinoviais (FRANZ;

DAVIES; HORNER, 1995). Esta presença bacteriana em tecidos articulares é responsável, em muitos casos, por artrites crônicas (SHIMOJI, 2004).

2.3.4.1 Interações bacterianas com as células fagocíticas

Em virtude da ocorrência de cápsula nas cepas virulentas de *E. rhusiopathiae*, estas são resistentes à fagocitose por leucócitos polimorfonucleados em presença de soro normal (ou seja, não imune), enquanto mutantes desprovidos de cápsulas são avirulentos e susceptíveis à fagocitose pelas mesmas células, sob a mesma condição (SHIMOJI et al., 1994). Contudo, a fagocitose de cepas virulentas de *E. rhusiopathiae* é conduzida primariamente por fagócitos mononucleados mesmo na presença de soro normal (SHIMOJI; YOKOMIZO; MORI, 1996). A razão para a diferença entre macrófagos e polimorfonucleados quanto à habilidade de fagocitar o microorganismo ainda é desconhecida.

Timoney (1969, 1970) forneceu evidências da importância da sobrevivência de *E. rhusiopathiae* no interior de fagócitos para a patogenicidade bacteriana. A cápsula do *E. rhusiopathiae* também desempenha papel crítico na replicação no interior de macrófagos, uma vez que a bactéria opsonizada pelo soro normal inibe a resposta de queima oxidativa no interior dessas células (SHIMOJI; YOKOMIZO; MORI, 1996). Este, provavelmente, é um dos mecanismos pelo qual o *E. rhusiopathiae* evade a ação lítica dos fagócitos de um hospedeiro não imune (SHIMOJI; YOKOMIZO; MORI, 1996). A replicação intracelular das cepas virulentas de *E. rhusiopathiae* em células fagocíticas é comumente observada *in vivo* nos sítios de inoculação de desafios experimentais (Figura 4). Porém, ainda não se sabe como a diferença na indução da queima oxidativa entre cepas capsuladas e acapsuladas ocorre.

Fonte: SHIMOJI, 2004.

Figura 4 - Lesão em pele de camundongo após seis horas de infecção com cepa Fujisawa-SmR de *E. rhusiopathiae*. No interior das células fagocíticas existem microorganismos morfologicamente intactos, alguns ainda sob divisão. (Micrografia eletrônica preparada pelo Dr. Shogo Tanaka)

2.3.4.2 Ativação do complemento

E. rhusiopathiae ativa o sistema complemento por meio da via alternativa, ou seja, na ausência de anticorpos específicos (DINTER; DIDERHOLM; ROCKBORN, 1976).

Nakato, Shinomiya e Mikawa (1986b) observaram trombocitopenia em ratos experimentalmente infectados com cepas vivas de *E. rhusiopathiae*. Esta agregação de bactérias e plaquetas formou-se a partir dos complexos de bactéria e C3b (produto da quebra do terceiro componente do complemento – C3) por meio dos receptores de C3b nas plaquetas. Por isso, a ativação de complemento por este microorganismo pode causar trombocitopenia e agregações intravasculares bacterianas, as quais podem resultar em distúrbios vasculares (SHIMOJI, 2004).

Após a ativação independente de anticorpo do C3, os depósitos de C3b sobre a cápsula de *E. rhusiopathiae* desempenham papel de opsoninas para a fagocitose da bactéria por células fagocíticas. Em função disso, em hospedeiros não imunes o complemento pode proteger por meio da opsonização (SHIMOJI, 2004).

2.3.5 Imunidade do hospedeiro

2.3.5.1 Imunidade humoral

A doença causada por *E. rhusiopathiae* em suínos tem sido controlada com sucesso por meio do uso de bacterinas e vacinas atenuadas (WOOD, 1999). Em animais vacinados, tanto a imunidade humoral como a mediada por células desempenham papéis importantes na defesa do hospedeiro (SHIMOJI, 2004).

A imunidade humoral na infecção tem papel crítico sugerido pelo fato do tratamento com antisoro assegurar o controle da doença (SHIMOJI, 2004). A proteção conferida a camundongos pelo antisoro contra *E. rhusiopathiae* refere-se unicamente à fração IgG e não à IgM (YOKOMIZO; ISAYAMA, 1972). Bactérias opsonizadas com soro imune são rapidamente eliminadas por leucócitos polimorfonucleados (SHIMOJI et al., 1994) e macrófagos (SHIMOJI; YOKOMIZO; MORI, 1996). Assim, possivelmente, a atividade protetora do soro imune seja processada por meio da opsonização de anticorpos IgG na fagocitose mediada por FcyR, na qual a queima oxidativa e outros mecanismos bactericidas intracelulares são gerados (SHIMOJI, 2004). A imunização com antígeno capsular de *E. rhusiopathiae* pode estender o período de sobrevivência em camundongos, no entanto, é incapaz de proteger completamente os animais contra desafios letais (SHIMOJI, 2004). Antisoro produzido contra SpaA recombinante protege camundongos por imunidade passiva (SHIMOJI; MORI;

FISCHETTI, 1999) e evoca proteção em suínos por indução de anticorpos opsonizadores (IMADA et al., 1999).

Apesar das proteínas de superfície de massas moleculares de 64 a 66 kDa, assim como a de 220 kDa também serem descritas como antígenos protetores, a capacidade de evocar anticorpos opsonizadores pelas mesmas ainda não foi investigada (SHIMOJI, 2004).

2.3.5.2 Imunidade celular

O papel da imunidade mediada por células na proteção dos hospedeiros foi demonstrada em estudos empregando cepas acapsuladas de *E. rhusiopathiae* em camundongos e suínos (SHIMOJI et al., 1998). Células esplênicas de camundongos e células mononucleadas de sangue periférico de suínos proliferam significativamente em resposta a antígenos de *E. rhusiopathiae*, evidenciando a contribuição de ambos os tipos de resposta imune ao combate da infecção (SHIMOJI, 2004). O antígeno bacteriano específico envolvido na indução da imunidade celular permanece desconhecido.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A espécie *E. rhusiopathiae* está amplamente distribuída na natureza e infecções ocasionadas por este microorganismo ocorrem por todo o mundo. Esta bactéria é comensal ou patogênica em uma variedade de espécies vertebradas e invertebradas, que incluem crustáceos (OVERSTREET, 1987), ácaros (CHIRICO et al., 2003), suínos (WOOD, 1999), ovinos (FTHENAKIS et al., 2006), bovinos (HASSANEIN et al., 2003), eqüinos (SEAHORN et al., 1989), cães (ERIKSEN et al., 1987; TAKAHASHI et al., 2000), roedores silvestres (LONIGRO; LAREGINA, 1988), aves domésticas (FOSSUM et al., 2009) e selvagens (BOERNER et al.,

2004; ERIKSSON et al., 2009), peixes (SMITH; HINEY; SAMUELSEN, 1994; NOVOTNY et al., 2004) e humanos.

O risco de infecção humana por *E. rhusiopathiae* está intimamente relacionado à exposição ocupacional ao microorganismo como ocorre em açogueiros, manipuladores de peixes, veterinários e donas de casa entre outros (REBOLI; FARRAR, 1989; FLORITÁN et al., 2009), sendo que a maioria das infecções recaem sobre três apresentações bem reconhecidas: (1) a cutânea localizada, também conhecida como erisipelóide, (2) a cutânea generalizada e (3) a invasiva séptica, regularmente associada a endocardite (UMANA, 2003; BLASCO-NAVALPOTRO et al., 2009). O termo de designação da apresentação cutânea desencadeada pelo *Erysipelothrix* em humanos, “erisipelóide”, foi estabelecido por Rosenbach em 1909 e teve a finalidade de evitar confusão nominal com a enfermidade já conhecida por “erisipela humana”, esta promovida principalmente por *Streptococcus pyogenes* e, em menor frequência, *Staphylococcus aureus* (REBOLI; FARRAR, 1989). A forma invasiva da enfermidade em humanos é um processo infeccioso localizado e de raríssima ocorrência, podendo envolver sítios como cavidade abdominal, ossos, articulações e meninges (ROMNEY; CHEUNG; MONTESSORI, 2001; WONG; KONG; LIN, 2003; KIM et al., 2007; FEASI et al., 2010). Abuso de álcool e imunossupressão têm sido identificados como possíveis fatores de risco (ROMNEY; CHEUNG; MONTESSORI, 2003; VAN DER BEEK, 2005).

O maior reservatório de *E. rhusiopathiae* é certamente o suíno doméstico, apesar da alta frequência de infectados entre aves e roedores (REBOLI; FARRAR, 1992). Estima-se que 30 a 50 % dos suínos aparentemente saudáveis alberguem o microorganismo em suas tonsilas e outros tecidos linfóides (WOOD, 1999).

E. rhusiopathiae pode ser encontrado no solo, superfícies aquáticas de propriedades rurais e em efluentes de abatedouros. Atualmente, o microorganismo é considerado não indígena do solo e sua presença no mesmo reflete a contaminação por animais infectados (REBOLI; FARRAR, 1992). Amostras bacterianas patogênicas têm sido isoladas partir de fezes de suínos

aparentemente sadios ou doentes, mantidas a temperaturas abaixo de 12 °C, por até seis meses (WOOD, 1999).

Esta espécie bacteriana é relativamente resistente às condições adversas para um microorganismo não formador de esporos. Em ambiente seco, pode se manter viável por anos no solo, sendo que esta condição é favorecida em pH alcalino e em presença de grandes quantidades de matéria orgânica (REBOLI; FARRAR, 1992). A sobrevivência em cortes cárneos pode superar 170 dias quando conservados em vinagre e 30 dias quando misturados a sal e nitrato de potássio (REBOLI; FARRAR, 1992). Assim como a viabilidade é mantida por muitos meses em carnes resfriadas ou congeladas e presuntos defumados (WOOD, 1999). O *E. rhusiopathiae* pode ainda permanecer viável por 12 dias sob incidência de luz solar direta e por muitos meses em carcaças em estado de deterioração sobre o solo ou enterradas em profundidade de sete pés (aproximadamente 2,13 m) (REBOLI; FARRAR, 1992). Entretanto, o *E. rhusiopathiae* é prontamente destruído por desinfetantes comuns, calor úmido de 55 °C por 15 minutos e irradiação gama (WOOD, 1999).

2.5 ERISPELA SUÍNA

A erisipela suína ou ruiva é uma enfermidade causada pela bactéria *E. rhusiopathiae* e é manifestada por meio de septicemias agudas ou subagudas e lesões crônicas proliferativas (WOOD, 1999).

A doença tem ampla distribuição mundial (WOOD; HARRINGTON, 1978; TAKASHI et al., 1989; WANG; CHANG; RILEY, 2002; OLIVEIRA et al., 2005; FRIENDSHIP; BILKEY, 2007) e é considerada de grande importância econômica nos principais países produtores de suínos.

2.5.1 No Brasil

Mello e Souza¹ (1931 apud HIPÓLITO; FREITAS, 1961, p.134) descreveram o primeiro caso de erisipela ocorrido no território nacional em suínos recém importados dos Estados Unidos da América.

Pouco mais de 20 anos depois, foram descritos os primeiros casos autóctones de erisipela suína no Brasil, a partir da observação de lesões cutâneas suspeitas em suínos abatidos (CROCO, 1957). E ainda no mesmo ano, foi descrito o isolamento do *E. rhusiopathiae* a partir de fragmentos cardíacos de casos de erisipela suína ocorridos no estado do Rio Grande do Sul (ALBUQUERQUE, 1957).

Em 1963, Castro et al. isolaram duas amostras (1,14 %) de *E. rhusiopathiae* a partir de tonsilas de suínos aparentemente saudáveis, abatidos no estado de São Paulo, porém procedentes dos estados Rio Grande do Sul e Paraná.

Este mesmo grupo isolou e caracterizou 102 amostras de *E. rhusiopathiae* oriundas de tonsilas de suínos e de superfície corporal de peixes por meio de testes bioquímicos, sorológicos, patogenicidade *in vivo* e sensibilidade antimicrobiana. Os sorotipos mais prevalentes entre as amostras estudadas foram B e C (designados atualmente por sorotipos 2 e 3, respectivamente) e não houve relação entre os tipos sorológicos, atividades bioquímicas, resultado de infecção experimental e sensibilidade antimicrobiana (CASTRO et al., 1972).

Reis, Resende e Nascimento (1977) relataram a ocorrência de dez surtos de erisipela suína em nove municípios de Minas Gerais, sendo que em uma propriedade observaram as apresentações poliartrítica (animais entre 3 a 6 meses de idade) e septicêmica aguda, caracterizadas por morbidade de 30% nos setores de terminação / reprodução e letalidade de 100 % em animais não medicados.

Barcellos (1981), avaliando cinco métodos de isolamento de *E. rhusiopathiae*, obteve o microorganismo em 14,04 % (16/114) dos baços de suínos com sintomas e lesões de erisipela septicêmica.

¹ MELO, T.; SOUZA, M.A. O bacilo da ruiva dos porcos; sua constatação no Brasil. **Revista Zoot. Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 41-47. 1931.

No estado de São Paulo, o primeiro surto de erisipela suína ocorreu no município de Guarulhos em uma propriedade sob condições inadequadas de manejo, afetando animais de diferentes idades e a principal manifestação clínica foi morte em até 20 horas após o surgimento dos primeiros sintomas (BERSANO; GENOVEZ; QUAGLIUOLO, 1982).

Barcellos, Oliveira e Borowski (1984) sorotiparam 133 amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas a partir de tonsilas (103) e fezes de animais sadios (9) e de 21 baços de suínos com doença septicêmica. Os sorotipos mais prevalentes, tanto em animais doentes quanto portadores, foram 1a, 1b e 2b.

Durante o período de 1985 a 1999, foram examinados, por métodos bacteriológicos, 78 fetos suínos abortados provenientes de granjas do estado de São Paulo. Em 37,18 % (29/78) dos fetos analisados a causa do abortamento foi de ordem bacteriana e em 5,13 % (4/29) desses casos o *E. rhusiopathiae* foi o agente envolvido (SCARCELLI et al., 1999).

Alberton et al. (2003), estudando articulações aparentemente comprometidas de suínos abatidos em um frigorífico situado em Santa Catarina, verificaram que 38,5 % (50/130) dos casos relacionaram-se a etiologias infecciosas, dentre as quais o agente *E. rhusiopathiae* foi o mais prevalente (14 %).

Em estudo envolvendo frigoríficos provenientes de cinco estados brasileiros (Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e São Paulo) foi isolado *Erysipelothrix* spp. de 19,41 % (99/510) das tonsilas de suínos aparentemente sadios. Sendo que em 75,76 % dos casos o suíno carregava exclusivamente *E. rhusiopathiae*, em 13,13 % *E. tonsillarum* e que 11,11 % dos animais eram portadores concomitantes de *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* (PEZERICO, 2004).

Oliveira et al. (2005) isolaram *Erysipelothrix* spp. de 14,9 % (56/375) das tonsilas de suínos aparentemente sadios, das quais 13 eram provenientes de animais vacinados e 43 de não vacinados.

Avaliando *pools* de órgãos e conteúdo gástrico de 172 fetos suínos (abortados, mumificados e natimortos) por meio da reação em cadeia pela

polimerase (PCR), Moreno et al. (2007) detectaram *E. rhusiopathiae* em 10,5 % dos fetos examinados.

Ainda no mesmo ano, Pescador et al. (2007) relataram caso de aborto suíno por *E. rhusiopathiae* baseado em isolamento do agente e em lesões macro e microscópicas em pele e pulmão do feto.

Oliveira et al. (2009) desenvolveram uma *nested* PCR baseada na amplificação do gene do antígeno protetor de superfície (spaA) específico de *E. rhusiopathiae* e confirmaram a presença de *E. tonsillarum* pela primeira vez no país.

2.5.2 Manifestações clínicas

Suínos de todas as idades são susceptíveis, no entanto, leitões nas primeiras três a quatro semanas de vida são mais resistentes à infecção por *E. rhusiopathiae*, por receberem anticorpos através do colostro (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Lesões cutâneas generalizadas são comuns por ocasião do abate. Representam agudização da doença desencadeada pelo transporte ao abatedouro, ou resultam do agrupamento de animais de diversas origens no período que antecede o abate (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Outra apresentação da infecção por *E. rhusiopathiae* frequentemente observada é a septicemia em fêmeas de gestação ou lactação (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Os sinais clínicos da erisipela suína podem ser divididos em três classificações gerais: aguda, subaguda e crônica. Sendo que a infecção subclínica pode ocorrer sem sinais visíveis de doença aguda, podendo evoluir diretamente para a apresentação crônica (WOOD, 1999).

2.5.2.1 Aguda

A apresentação clínica aguda é caracterizada pelo surgimento repentino, algumas vezes associado à morte súbita de um ou mais animais (WOOD, 1999). Sinais como hipertemia (40 a 42 °C), diarreia, inapetência, depressão geral são bastante freqüentes. A erisipela suína aguda inicia-se com uma bacteremia, que se desenvolve dentro de 24 horas após exposição ao agente bacteriano. O isolamento bacteriano a partir de sangue ou da maioria dos tecidos corporais fica bastante prejudicado após alguns poucos dias, mas o agente pode persistir por meses em articulações e em tecidos linfóides, como as tonsilas, placas de Peyer e baço (WOOD, 1999). A mortalidade ocorre em dois a três dias e pode ser alta quando os animais não são medicados (WOOD, 1999).

A lesão cutânea clássica, caracterizada pela presença de hemorragias cutâneas que se assemelham a losangos (Figura 5.), surgem entre dois a três dias após exposição ao *E. rhusiopathiae* (WOOD, 1999). Em casos não fatais de erisipela aguda essas lesões podem se espalhar consideravelmente, mas desaparecem gradativamente dentro de quatro a sete dias após o início das mesmas, sem efeito subsequente, que não a descamação local (WOOD, 1999).

Fonte: FURIATTI, 2009

Figura 5 - Lesões cutâneas em forma de losango por toda a carcaça

2.5.2.2 Subaguda

A forma subaguda inclui sinais que são menos severos em suas manifestações que as da forma aguda. Os animais não parecem doentes, as temperaturas não são altas ou não permanecem por muito tempo sob esta condição, o apetite pode não ser afetado e as lesões quase não são detectáveis (WOOD, 1999). Alguns casos de erisipela subaguda são manifestados de maneira tão suave que passam despercebidos dentro do rebanho (WOOD, 1999).

2.5.2.3 Crônica

A forma crônica da erisipela suína é a evolução das formas aguda e subaguda, sendo tipicamente caracterizada por sinais de artrite (SHIMOJI, 2004). Sinais de insuficiência cardíaca são ocasionais, podendo ser percebidos após esforço físico do animal e em alguns casos, ocorre morte súbita (WOOD, 1999).

Estudos a respeito da patogenia da endocardite indicam que as lesões valvulares (Figura 6.) iniciam-se a partir de inflamação vascular e infartos miocárdiais, possíveis conseqüências de embolia bacteriana. Esses processos, juntamente com a exsudação de fibrina, levam à destruição do endocárdio valvular (WOOD, 1999).

Fonte: FURIATTI, 2009.

Figura 6 - Endocardite vegetativa por *E. rhusiopathiae*

Artrites crônicas são traduzidas em articulações com graus variados de edema e rigidez, podendo se manifestar antes de três semanas após infecção (WOOD, 1999).

A artrite é uma das mais importantes formas de apresentação clínica da erisipela suína do ponto de vista econômico, devido ao comprometimento nas taxas de crescimento e às condenações ou aproveitamentos condicionais nos abatedouros de carcaças de animais acometidos (WOOD, 1999). O índice de condenação de carcaças de suínos por artrite tem aumentado significativamente

no Brasil (PEREIRA et al., 1999), sendo que o principal agente bacteriano envolvido nas artrites infecciosas observadas em abatedouro é o *E. rhusiopathiae* (Figura 7.) (ALBERTON et al., 2003).

Fonte: ALBERTON et al., 2003.

Figura 7 - Artrite por *E. rhusiopathiae* em superfície articular de fêmur

2.5.2.4 Reprodutiva

As infecções sistêmicas por *E. rhusiopathiae* são comumente associadas a lesões cutâneas, endocardite vegetativa e atrite, mas também podem causar infecções reprodutivas com conseqüências como abortamento, mumificação fetal, aumento dos natimortos e diminuição do tamanho das leitegadas (HOFFMANN; BILKEY, 2002).

O abortamento pode ocorrer em porcas que contraíam a erisipela suína aguda ou subaguda durante a gestação, em qualquer estágio (Figura 8), sendo que alguns fetos podem se tornar mumificados e embriões podem ser reabsorvidos (WOOD, 1999; GIVENS; MARLEY, 2008).

Kemenes e Szézy (1971) detectaram *E. rhusiopathiae* nos órgãos de fetos exclusivamente a partir de 98 dias de gestação, em contraste com os abortados

em períodos mais precoces de vida fetal. Estes autores sugerem que o agente consiga acessar apenas fetos mais maduros, onde se estabelece e multiplica, particularmente se os mesmos já estiverem debilitados (KEMENES; SZÉKY, 1971). Por outro lado, abortamentos devidos ao *E. rhusiopathiae* em gestações iniciais ou em fases intermediárias poderiam resultar incidentalmente de um efeito sistêmico sobre as fêmeas gestantes (SAUNDERS, 1967).

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 8 - Feto mumificado e abortado por infecção por *E. rhusiopathiae* (diagnóstico por PCR)

Hoffmann e Bilkey (2002) relataram a ocorrência crônica de erisipela em porcas de uma propriedade, onde o programa de vacinação contra a doença em fêmeas havia sido suspenso. Manifestações clínicas como aumento da incidência de descarga vulvar pré e pós parto, aumento do intervalo desmame-cio, diminuição das taxas de concepção e redução do número total de leitões nascidos e nascidos vivos por leitegada foram descritas.

Em estudo envolvendo 1070 porcas de descarte (com diferentes ordens de parição), foi identificada a presença de *E. rhusiopathiae*, entre outras espécies bacterianas, nas amostras de descarga vulvar examinadas (WANYOIKE; BILKEY, 2006). No entanto, a avaliação bacteriológica de descargas vulvares foi considerada de valor diagnóstico limitado, uma vez que as bactérias isoladas a

partir de bexiga urinária e endométrio são representativas da flora fecal normal de suínos (BIKSI et al., 2002). Assim, visando alcançar um diagnóstico mais consistente, Biksi et al. (2002) sugeriram a necessidade do uso da histologia combinado à bacteriologia.

A via pela qual o *E. rhusiopathiae* acessa o trato genital das fêmeas suínas ainda é desconhecida. Entretanto, este microorganismo tem sido isolado a partir de tecidos fetais (PLONAIT; BICKHARDT,¹ 1997 apud HOFFMANN; BILKEY, 2002, p. 120; PESCADOR et al., 2007), então, presumivelmente, pode estar entrando no útero durante a infecção sistêmica (HOFFMANN; BILKEY, 2002). Outra alternativa que não deve ser descartada, seria a entrada do *E. rhusiopathiae* no útero via infecção ascendente (HOFFMANN; BILKEY, 2002).

¹ PLONAIT, H.; BICKHARDT, K. **Lehrbuch der Schweinekrankheiten**. Berlin : Parey Buchverlag, 1997. 600 p.

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Cultivo

Embora *E. rhusiopathiae* não seja considerado um agente fastidioso, o isolamento desta bactéria envolve o uso de meios seletivos e de enriquecimento (REBOLI; FARRAR, 1992). Muitos meios seletivos já foram descritos e os mais amplamente divulgados são o meio ESB modificado (*Erysipelothrix Selective Broth* – caldo seletivo de *Erysipelothrix*) (WOOD, 1965), meio de Packer (PACKER, 1943) e o meio MBA (*modified blood-azide agar* – ágar sangue-ázida modificado) (HARRINGTON; HULSE, 1971).

Usualmente é recomendado o uso do ágar Packer após seleção prévia em caldo ESB para espécimes muito contaminados, como fezes e solo. Pois o meio de Packer é mais seletivo que o ágar MBA (JONES, 1986).

A identificação deste microorganismo é baseada nos resultados da coloração de Gram, motilidade, produção de sulfeto de hidrogênio em TSI (*triple sugar iron* – ágar de triplo açúcar – ferro) (Figura 9.), produção de indol, atividade de catalase, crescimento em forma de “escova” ou “limpador de cachimbo” em agar gelatina e hemólise em ágar sangue (BROOKE; RILEY, 1999). Algumas propriedades das espécies de *Erysipelothrix* são apresentadas no quadro 1.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9 - Produção H₂S por amostra de *Erysipelothrix* spp. em ágar TSI

O teste de proteção em camundongo era considerado o melhor método para confirmar um isolado como *E. rhusiopathiae* (JONES, 1986). No teste, administra-se subcutâneamente em camundongo o cultivo suspeito e uma dose de anti-soro hiperimune eqüino de *E. rhusiopathiae*. Em outro camundongo injeta-se o cultivo puro, sem o anti-soro. Se o cultivo suspeito for realmente *E. rhusiopathiae*, o camundongo que não recebeu o anti-soro morre em cinco a seis dias, mas aquele que recebeu o anti-soro estará protegido (REBOLI; FARRAR, 1992). Atualmente, testes moleculares são preferíveis na identificação do *E. rhusiopathiae* pela rapidez, especificidade e por dispensarem o uso de animais (WANG; CHANG; RILEY, 2009).

	<i>E. rhusiopathiae</i>	<i>E. tonsillarum</i>	<i>E. inopinata</i>
Crescimento aeróbico	+	+	+
Crescimento anaeróbico	+	+	+
α - hemólise	+	+	ND*
β - hemólise	-	-	ND
Motilidade	-	-	-
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Urease	-	-	-
H ₂ S em TSI	+	+	ND
Redução de nitrato	-	-	ND
Indol	-	-	ND
Hidrólise da esculina	-	-	ND
Voges-Proskauer	-	-	ND
Vermelho de metila	-	-	ND
Produção de ácido:			
Glicose	+	+	+
Manose	+	+/-	-
Sacarose	-	+	-
Lactose	+	+	ND
Galactose	+	+	ND
Rafinose	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Trealose	-	-	ND
Xilose	-	-	ND
Glicerol	-	-	-
Inositol	-	-	ND
Sorbitol	-	-	-
Manitol	-	-	-
Inulina	-	-	-
Salicina	-	+/-	ND
Crescimento em escova na gelatina	+	+	ND
Liquefação da gelatina	-	-	-

* característica não descrita em literatura

Quadro 1 - Características das espécies de *Erysipelothrix*

2.6.2 Sorodiagnóstico

Técnicas com anticorpos fluorescentes também são disponíveis para a detecção de *E. rhusiopathiae* a partir de tecidos (SEIDLER; TRAUTWEIN; BOHM, 1971), cultivos em caldo de enriquecimento (HARRINGTON; WOOD; HULSE, 1974) e soro (BERNARDES et al., 2007). Entretanto, Harrington, Wood e Hulse (1974) notaram que estes testes não foram tão sensíveis quanto os métodos de cultivo, além de apresentarem baixa praticidade no uso rotineiro em laboratório (REBOLI; FARRAR, 1992).

Outros testes sorológicos como inibição da hemaglutinação, ELISA e *immunoblotting* são descritos em estudos de controle de vacinas suínas contra *E. rhusiopathiae* (RITZMANN; HEINRITZI, 2000; RIVERA; DAGGFELDT; HU, 2003; LEHR et al., 2004; HUERTA; MONTAÑO, 2008; NEUMANN; BONISTALLI, 2009; NEUMANN et al., 2009).

2.6.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Métodos moleculares baseados na PCR têm sido utilizados para detecção de *Erysipelothrix* spp.

Makino et al. (1994) criaram *primers* gênero-específicos, baseados na região codificadora do gene 16S do RNA ribossômico.

Shimoji et al. (1998) desenvolveram uma reação espécie-específica, sem reação cruzada com *E. tonsillarum* e *Erysipelothrix* sp. cepa 1 ou 2 e cujos *primers* estão relacionados à sequência que flanqueia a região genética da inserção Tn916, que, presumivelmente, está associada à virulência de *E. rhusiopathiae*.

Após o sequenciamento do grupo de genes codificadores do rRNA (16S, 23S e 5S) e da região não codificante adjacente à região codificadora da porção 5S do rRNA, quatro pares de *primers* capazes de distinguir entre *E.*

rhusiopathiae, *E. tonsillarum*, *Erysipelothrix* sp. cepa 1 (sorotipo 13) e *Erysipelothrix* sp. cepa 2 (sorotipo 18) foram desenvolvidos (TAKESHI et al., 1999).

Mais recentemente, Yamazaki (2006) descreveu uma PCR *multiplex* capaz de discriminar entre *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* e cujos *primers* (dois pares) amplificam, respectivamente, uma sequência cromossomal específica de *E. rhusiopathiae* e sequência que inclui região altamente conservada do gene 16S do rRNA do gênero *Erysipelothrix*. Quando *E. rhusiopathiae* é detectado, dois fragmentos são amplificados, enquanto um único fragmento é amplificado no caso de *E. tonsillarum*. No entanto, esta reação requer um enriquecimento prévio à extração de DNA para obtenção de resultados efetivos (YAMAZAKI, 2006).

Pal, Bender e Opriessnig (2010) desenvolveram uma *Real-time* PCR *multiplex* que discrimina as espécies *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum* e *Erysipelothrix* sp. cepa 2, por meio da detecção direta a partir de espécimes animais. Os *primers* da reação foram baseados na região não codificante adjacente à região codificadora da porção 5S do rRNA, uma vez que a análise pelo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) demonstrou a fraca homologia existente entre as sequências dessas três espécies de *Erysipelothrix*. Já *Erysipelothrix* sp. cepa 1 não foi incluída nesta PCR, devido à alta homologia com *E. tonsillarum*.

2.7 TIPAGEM

Os métodos de tipagem são baseados na caracterização fenotípica e/ou genotípica do organismo a ser analisado.

Diversos métodos de tipagem têm sido aplicados na classificação de isolados de *Erysipelothrix* e os estudos realizados claramente demonstram as vantagens da tipagem molecular sobre as técnicas de tipagem fenotípica (sorotipagem, fagotipagem, mobilidade eletroforética de enzimas celulares - MLEE, eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE), na compreensão taxonômica e epidemiológica deste microorganismo (WANG; CHANG; RILEY, 2009).

Takahashi et al. (1992) estimaram os níveis de relação entre as amostras de *Erysipelothrix* spp. (sorotipos 1 a 23 e N) a partir da técnica de hibridização DNA-DNA e verificaram que as espécies genômicas (*E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum*) podem ser diferenciadas em sorotipos. Os sorotipos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 e N exibiram mais que 73 % de hibridização com a amostra de referência de *E. rhusiopathiae* e menos de 24 % com a amostra de referência de *E. tonsillarum*. Enquanto que os sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22 e 23 exibiram mais de 66 % de hibridização com *E. tonsillarum*, mas menos de 22 % com a *E. rhusiopathiae*. E os sorotipos 13 e 18 exibiram baixos níveis de hibridização (16 e 47 %) com ambas as amostras padrão.

Em outro estudo envolvendo o sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), observou-se que os padrões de proteínas de *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* são espécie-específicos e correlacionam-se com os tipos sorológicos. Os padrões de proteínas dos sorotipos 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 19, 21 e N foram similares aos encontrados na amostra de referência *E. rhusiopathiae* (ATCC 19414). Inversamente, os padrões protéicos dos sorotipos 3, 7, 10, 14 e 20 foram similares aos encontrados na amostra de referência *E. tonsillarum* (ATCC 43339). Contudo, padrões de proteínas atípicos foram obtidos a partir dos sorotipos 13, 17, 18, 22 e 23 (TAMURA et al., 1993).

Chooromoney et al. (1994) caracterizaram por meio da técnica de mobilidade eletroforética de enzimas celulares (MLEE) amostras de *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* provenientes de diversos países, tecidos e espécies animais. E observaram substancial diversidade entre isolados de mesmo sorotipo, fornecendo evidências de que a sorotipagem não é uma técnica confiável como ferramenta epidemiológica.

Ahrné et al. (1995), pesquisando a relação entre as amostras do gênero *Erysipelothrix* por meio de ribotipagem do gene 16S rRNA, relataram que algumas amostras de mesmo sorotipo foram classificadas como pertencentes a diferentes grupos, colocando em dúvida a classificação baseada em sorotipagem. Contudo, esse método de tipagem foi menos discriminatório que o RAPD (OKATANI et al., 2000).

Os resultados obtidos por Okatani et al. (2000) sugerem que o RAPD não é unicamente capaz de identificar padrões espécie-específicos, mas também identifica diversidade genética entre amostras da mesma espécie.

Dunbar e Clarridge III (2000) submeteram quatro isolados humanos de *E. rhusiopathiae*, associados à poliartralgia e falhas renais, artrite séptica, erisipelóide e peritonite, à uma caracterização por REP-PCR, visando evitar a identificação incorreta de *E. rhusiopathiae* por agentes bacterianos como *Lactobacillus* spp. ou *Enterococcus* spp.

Imada et al. (2004) constataram, por meio do emprego das técnicas de RAPD, ribotipagem e RFLP, que amostras de vacinas vivas de *E. rhusiopathiae* são responsáveis por quase metade dos casos de atrite crônica de erisipela suína durante os últimos 11 anos no Japão.

Eamens, Forbes e Djordjevic (2006) demonstraram, por meio da técnica de RFLP com as enzimas *Alu* I e *Rsa* I e análise de perfil plasmideal, a predominância de isolados do sorotipo 2, seguida de sorotipo 1a entre os rebanhos, onde falhas vacinais contra erisipela suína ocorreram.

Nagai, To e Kanda (2008) desenvolveram método de tipagem de cepas de *E. rhusiopathiae* baseado na sequência de nucleotídeos de uma região hipervariável do gene do antígeno protetivo de superfície (*spaA*), a fim de promover a discriminação entre cepas de vacinas vivas e isolados de campo. A

árvore filogenética construída por meio desta tipagem sugere que a distância evolucionária dos isolados está relacionada à patogenicidade em camundongos.

Com a intenção de superar as inconveniências do processo de ribotipagem tradicional, Okatani et al. (2004) desenvolveram um sistema automatizado de ribotipagem, que mostrou superior discriminação em relação ao RAPD e à ribotipagem tradicional, sendo ainda capaz de diferenciar sete amostras que não haviam sido diferenciadas por PFGE.

Apesar da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) ainda ser considerada como “padrão ouro” entre os métodos de genotipagem bacteriana (OLIVE; BEAN, 1999), estudos têm revelado que esse método pode ser menos sensível que a ribotipagem e métodos baseados em reação em cadeia pela polimerase (PCR) com respeito à habilidade de diferenciar entre amostras bacterianas de algumas espécies (THONG et al., 1995; BURUCOA; LHOMME; FAUCHERE, 1999).

Okatani et al. (2001) relataram a primeira análise de *Erysipelothrix* spp. empregando a PFGE. Três enzimas foram testadas (*Sma* I, *Asc* I e *Not* I), porém a *Sma* I foi considerada mais adequada para a análise de macrorestrição.

Em uma caracterização de isolados de *Erysipelothrix* realizada nos Estados Unidos, foi verificado um maior poder discriminatório da técnica de PFGE em detrimento da sorotipagem e que, o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados não seguiu um padrão específico em termos de sorotipos e genotipos (OPRIESSNIG et al., 2004).

Sawada et al. (2006) fizeram uso da PFGE visando caracterizar cepas de *Erysipelothrix* resistentes à acriflavina isoladas de suínos com atrite e demonstraram a existência de isolados de campo naturalmente resistentes à acriflavina, o que refutou hipóteses anteriores de que casos crônicos de erisipela suína eram consequência da inoculação de vacinas vivas preparadas a partir de cepas virulentas de *E. rhusiopathiae* atenuadas pelo tratamento com acriflavina.

Eriksson et al. (2009) caracterizaram *E. rhusiopathiae* isolados de diferentes espécies animais por meio de sorotipagem, PFGE e susceptibilidade antimicrobiana. Os resultados obtidos na PFGE indicaram uma distribuição aleatória de sorotipos pelo dendrograma e similaridade entre os padrões de

banda gerados pelos isolados de frango e ácaros, o que sustentou a hipótese de que *D. Gallinae* pode agir como reservatório e vetor para *E. rhusiopathiae*.

No quadro 2 são apresentados os graus de resolução de algumas técnicas de tipagem bacteriana.

Técnica	Família	Gênero	Espécie	Cepa
RFLP ^a			↔	
PFGE ^b			↔	
Ribotipagem			↔	
AFLP ^c , AP-PCR ^d , rep-PCR ^e , RAPD ^f			↔	
Fagotipagem e tipagem por bacteriocinas			↔	
Técnicas sorológicas (mono ou policlonal)			↔	
MLEE ^g			↔	
SDS-PAGE ^h			↔	
Hibridização DNA-DNA		↔		
% G + C		↔		
Estrutura de parede celular	←		→	
Fenotípica tradicional	←			→
Sequenciamento rRNA	←			→
Sequenciamento DNA	←			→

Fonte: (adaptado de VANDAMME et al., 1996).

a -polimorfismo do comprimento dos fragmentos restritos, b – eletroforese em gel de campo pulsado, c – polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados, d – reação em cadeia pela polimerase com *primers* arbitrários, e - reação em cadeia pela polimerase em sequências palindrômicas extragênicas repetidas, f – DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, g – mobilidade eletroforética de enzimas celulares e h – eletroforese em gel poliacrilamida.

Quadro 2 - Resolução taxonômica de algumas técnicas

2.8 TRATAMENTO E CONTROLE DA ERISPELA SUÍNA

Infecções por *E. rhusiopathiae* conduzem a substanciais perdas econômicas na suinocultura. Diante deste fato, medidas profiláticas apropriadas devem ser aplicadas, visando o tratamento e controle da enfermidade decorrente desta infecção.

2.8.1 Tratamento

Antes da era dos antibióticos, o tratamento de erisipela suína disponível era baseado na administração de soro hiperimune obtido a partir de eqüinos (WOOD, 1999).

Ainda hoje a terapia antibiótica tem se mostrado bastante efetiva no tratamento da erisipela suína e a penicilina é considerada a droga de eleição (WANG; CHANG; RILEY, 2009). *E. rhusiopathiae* é altamente sensível a este princípio antimicrobiano e em surtos agudos o tratamento precoce, normalmente, alcança resposta convincente dentro de 24 a 36 horas (WOOD, 1999). A administração de dose única de 20000 UI/Kg de peso, nos animais doentes, durante três a cinco dias, tem obtido sucesso no tratamento das formas agudas (SOBESTIANSKY et al., 1999). Apesar da efetividade da penicilina no tratamento da erisipela suína aguda, resultados satisfatórios também têm sido reportados com as tetraciclina (incluindo clortetraciclina e oxitetraciclina), lincomicina e tilosina (WOOD, 1999). O microorganismo *in vitro* apresenta-se sensível à eritromicina, contudo, o princípio antimicrobiano tem sido reportado como resistente *in vivo*. Estreptomicina, bacitracina, polimixina B, neomicina e sulfonamidas não têm ação contra *E. rhusiopathiae* (WOOD, 1999). Até o momento não existem relatos a respeito do desenvolvimento de resistência por *E. rhusiopathiae* à penicilina, entretanto, alguns isolados de suínos vêm apresentando resistência frente à tetraciclina (WOOD, 1999).

Casos de erisipela suína crônica (casos de atrite e endocardite) não responde bem ao tratamento antimicrobiano (SOBESTIANSKY et al., 1999). Experimentalmente, a administração de agentes antiinflamatórios proporcionam algum alívio aos efeitos das artrites crônicas (WOOD, 1999).

2.8.1 Controle

A erradicação da erisipela suína é praticamente impossível, devido à capacidade de sobrevivência da bactéria no ambiente e à variedade de espécies animais passíveis de infecção, além de suínos saudáveis albergarem o agente bacteriano (SOBESTIANSKY et al., 1999).

A remoção e a desinfecção regular de fontes contaminantes consistem de procedimentos restritivos à propagação do microorganismo no ambiente (WOOD, 1999). O *E. rhusiopathiae* é destruído por desinfetantes comuns (WANG; CHANG; RILEY, 2009). Fidalgo, Longbottom e Riley (2002) observaram que desinfetantes comuns a base de cloreto benzalcônio (1,5 %), cloro (1 e 5 %) e fenol (2,9 %) foram capazes de destruir *E. rhusiopathiae*. Entretanto, a desinfecção torna-se inócua quando a mesma não é antecedida por limpeza dos equipamentos e ambiente, uma vez que o *E. rhusiopathiae* sobrevive em presença de matéria orgânica e muitos desinfetantes têm suas ações decrescidas ou nulas frente a essas condições (WANG; CHANG; RILEY, 2009). Desta maneira, o controle da erisipela suína deve ser conduzido por meio da combinação de boas práticas de manejo do rebanho, adequada sanitização e programa de imunização nas propriedades (WOOD, 1999).

A imunização é considerada um procedimento bastante útil no controle da erisipela suína. Atualmente, uma grande variedade de produtos biológicos é comercialmente disponível, desde bacterinas a vacinas vivas atenuadas (WOOD, 1999). No Brasil, apenas as bacterinas são disponíveis e estas podem se apresentar sob forma autógena, comercial e de valências múltiplas.

Os esquemas vacinais variam conforme os objetivos de cada granja. Propriedades com casos persistentes podem instituir um programa de vacinação em leitões (a partir de seis a 10 semanas de idade: duas doses, com intervalo de 30 dias entre as vacinações). Quando porcas (dose única) e leitoas (duas doses, com intervalo de duas semanas entre as vacinações) são vacinadas antes da cobertura, significa que a propriedade adota um programa de prevenção de abortamentos e outros distúrbios reprodutivos decorrentes da infecção por *E. rhusiopathiae*.

Geralmente, a vacinação pode induzir imunidade por três a cinco meses, sendo que a segunda dose (*booster*) pode aumentar a duração em até um mês (WOOD, 1999). O desenvolvimento da imunidade em suínos vacinados pode ser afetado por fatores ambientais como má nutrição e estresse térmico (WOOD, 1999).

A vacinação contra erisipela suína não previne a forma crônica. É possível que a vacinação reduza a prevalência de artrites por reduzir a prevalência da erisipela aguda. Por outro lado, é sugerido por alguns pesquisadores que a vacinação leve ao aumento das lesões artríticas por induzir o estado de hipersensibilidade ao subsequente contato com o microorganismo (WOOD, 1999). Outra explicação para a não prevenção das artrites seria o *E. rhusiopathiae* ser carregado a tecidos sinoviais por macrófagos logo após exposição e assim, escapar por opsonização da imunidade humoral (WOOD, 1999).

Apesar da vacinação contra a erisipela suína não ser completamente eficiente na prevenção da doença, ela tem proporcionado um bom meio de controle quando associada a outras boas práticas de manejo (WOOD, 1999).

Atualmente, muitas pesquisas a cerca de potenciais imunobiológicos contra *E. rhusiopathiae* são realizadas e dentre elas destacam-se as investigações do poder imunogênico do antígeno *spaA*, que é considerado a principal escolha para o desenvolvimento de vacinas de subunidade ou DNA (IMADA et al., 1999; SHIMOJI; MORI; FISHETTI, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar fenotípica e genotipicamente amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar os sorotipos das amostras;
- ✓ Determinar os perfis de sensibilidade antimicrobiana das amostras qualitativa e quantitativamente;
- ✓ Verificar a existência de concordância entre os resultados dos dois testes de sensibilidade antimicrobiana;
- ✓ Verificar a existência de concordância entre os resultados de sorotipagem e PCR;
- ✓ Caracterizar genotipicamente os isolados por meio das técnicas de AFLP e PFGE;
- ✓ Determinar qual dos *primers* utilizados na técnica de AFLP permite melhor discriminação entre as amostras;
- ✓ Verificar se existe relação entre perfis formados a partir das técnicas de AFLP e PFGE;
- ✓ Verificar se existe relação entre os perfis formados pelas técnicas de genotipagem e os perfis de sensibilidade antimicrobiana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram analisadas 51 amostras *Erysipelothrix* spp. recentemente isoladas (OLIVEIRA et al., 2005) a partir de tonsilas de suínos aparentemente saudáveis, colhidas em abatedouros do estado do Rio Grande do Sul e cedidas pelo Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira da ULBRA/ Canoas/ RS. Outras 78 amostras foram cedidas pelo Prof. Dr. David Emílio Santos Neves de Barcellos da UFRGS/ Porto Alegre/ RS, sendo 18 amostras de referência provenientes da Austrália, uma amostra de referência proveniente do Reino Unido e 59 amostras isoladas há quase 30 anos atrás no estado do Rio Grande do Sul a partir de casos de septicemia (9) e de animais portadores (50).

Além das 129 amostras de coleção, oito amostras isoladas de suínos nos últimos três anos tomaram parte nos experimentos, perfazendo um total de 137 amostras. Destas oito amostras isoladas, quatro são oriundas de peles de leitões de creche com septicemia (isoladas em 2006), duas de peles de casos septicêmicos acompanhados em abatedouro no ano de 2008, uma de tonsila de caso septicêmico de abatedouro e uma de tonsila de animal portador (ambas isoladas no ano de 2008). A partir das amostras de casos de septicemia (peles e tonsila) obtidas em abatedouro foram selecionadas cinco colônias (de cada caso) para a realização das técnicas de caracterização bacteriana propostas nesse trabalho. Da amostra tonsilar de animal portador obtida em abatedouro só foi possível recuperar três colônias para realizar as caracterizações.

Portanto, 151 isolados bacterianos de *Erysipelothrix* spp. foram submetidos às caracterizações fenotípica e genotípica. A discriminação dos espécimes de *Erysipelothrix* spp. utilizados no estudo é apresentada na figura 10.

¹ isolados procedentes da Austrália, ² isolados procedentes do Reino Unido, ³ isolados procedentes do Rio Grande do Sul e ⁴ isolados procedentes de São Paulo.

* de cada isolado foram selecionadas cinco colônias e ** três colônias foram obtidas a partir do isolado.

Figura 10 - Discriminação dos isolados utilizados nos experimentos

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

4.2.1 Identificação sorológica

A técnica de sorotipagem empregada na identificação de *Erysipelothrix* spp. foi o método de imunodifusão dupla em gel de agarose (OUCHTERLONY, 1949), por meio do uso de antígenos autoclavados extraídos dos isolados bacterianos e anti-soros de coelho contra células mortas-formalizadas de cepas de referência internacional dos sorotipos 1 a 26 e “N” (KUCSERA, 1973; TAKAHASHI et al., 1996).

Para a obtenção dos antígenos a serem identificados sorologicamente, os 151 isolados foram semeados em BHI suplementado com 0,3 % de Tris e 0,1 % de Tween 80 (pH 7,8) e incubados a 37 °C, *overnight*. As células foram colhidas por meio de centrifugação a 10 000 x *g* por 5 minutos, ressuspensas em 100 µL de água destilada e autoclavadas a 121 °C por 60 minutos. Uma vez extraídos, os 151 antígenos foram enviados ao “National Institute of Animal Health” em Tsukuba / Japão, onde foram processados pela Dra. Yumiko Imada.

Os antígenos foram testados com os antisoros de coelho contra os sorotipos 1a, 1b e 2a em ágar Nobre a 1 % suplementado de 150 mM de NaCl e 10 mM de tampão fosfato (pH 7.2) contendo 0,1 % de ázida sódica. O sorotipo 2b foi distinguido do 2a por meio da linha de precipitação formada entre o antígeno e o soro anti-sorotipo 2a, o qual fundiu completamente com a linha de precipitação homóloga ao sorotipo 2a. Caso a fusão tenha sido incompleta, o antígeno foi designado como sorotipo 2b. Os antígenos que não apresentaram linhas de precipitação com esses três antisoros, foram testados contra todos os demais antisoros e os antígenos que não produziram linha de precipitação contra nenhum antisoro foram descritos, por conveniência, como não tipáveis (NT). Para a identificação exata do sorotipo N seria necessário preparar o antisoro contra os antígenos (não tipáveis) e confirmar que este antisoro não produz nenhuma linha de precipitação com antígenos homólogos (IMADA et al., 2004).

4.2.2 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolado de *Erysipelothrix* spp. foram analisados por meio da determinação do halo de inibição pela prova de disco-difusão (Kirby-Bauer) e da concentração inibitória mínima (CIM) pelo teste de microdiluição em placa. A CIM foi determinada utilizando-se o teste Sensititre - Custom Plate Format BOPO6F (TREK Diagnostic Systems). Ambos os testes foram conduzidos conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008).

4.2.2.1 Disco-difusão

Para a determinação qualitativa dos perfis de sensibilidade antimicrobiana das amostras de *Erysipelothrix* spp., optou-se pela utilização do meio sólido indicado para o teste de sensibilidade de organismos fastidiosos descrito pelo documento M31-A3 (CLSI, 2008). A composição do meio segue no quadro 3.

Composição	Quantidade por litro de meio
Ágar Mueller Hinton	38 g
Hemoglobina	10 g
Suplemento Nutricional*	10 mL

* Suplemento comercialmente disponível (IsoVitalex Enrichment Difco-BBL ou BioVitex – Cefar Diagnóstica Ltda.) contendo 0,01 g de vitamina B₁₂, 10 g de L-glutamina, 1 g de Adenina, 0,03 g de Guanina HCl, 0,013 g de ácido p-aminobenzóico, 0,25 g de NAD, 0,1 g de tiamina pirofosfato, 0,02 g de nitrato férrico . 8H₂O, 0,003 g de tiamina HCl, 25,9 g de L-cisteína HCl, 1,1 g de L-cistina e 100 g de dextrose.

Quadro 3 - Composição do meio utilizado no teste de disco-difusão

O inóculo bacteriano utilizado no teste de disco-difusão foi preparado à partir de um cultivo puro de *Erysipelothrix* spp. semeado em caldo infusão de cérebro-coração (BHI) suplementado com 5 % de soro eqüino (24 horas a 37 °C).

A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland. Esta suspensão bacteriana ajustada contém aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL.

Um suabe estéril e não-tóxico foi introduzido no interior do tubo contendo a suspensão bacteriana ajustada, pressionado contra a parede do tubo a fim de remover o excesso da suspensão embebida na extremidade do suabe e então, estriado por toda a superfície do ágar Mueller Hinton suplementado com hemoglobina e suplemento nutricional.

Após a semeadura do inóculo sobre a superfície do ágar, os discos impregnados com princípios antimicrobianos foram distribuídos individualmente. Os princípios utilizados, assim como suas concentrações constam no quadro 4.

Princípio antimicrobiano	Concentração (µg/mL)
Ampicilina	10
Ceftiofur*	30
Clindamicina	2
Cotrimoxazol	25
Doxiciclina	30
Enrofloxacina	5
Espectinomicina	100
Florfenicol	30
Gentamicina	10
Neomicina	30
Penicilina**	10
Sulfadimetoxina	300
Tetraciclina	30
Tilmicosia	15
Tulatromicina*	30

* Fabricante BD – Becton & Dickinson Company. Demais princípios antimicrobianos produzidos pela Cefar Diagnóstica Ltda.

** Concentração da penicilina expressa em unidades internacionais por mililitro.

Quadro 4 - Princípios antimicrobianos utilizados na disco-difusão e respectivas concentrações

As placas contendo inóculo e discos antimicrobianos foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas e então, examinadas quanto à formação de halos de inibição ao redor dos discos.

Como ainda não há critérios interpretativos específicos para área veterinária em relação ao *Erysipelothrix* spp., foram utilizados valores de outros agentes bacterianos, sendo que para algumas drogas foram usados critérios específicos para uso humano na análise dos resultados obtidos neste estudo. Os diâmetros dos halos de inibição formados no estudo foram interpretados conforme quadro 5.

No teste de disco-difusão foram utilizados como controle de qualidade as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sendo que as mesmas foram semeadas, respectivamente, em ágar Mueller Hinton (Difco-BBL) e ágar Mueller Hinton suplementado com 5 % de sangue ovino desfibrinado.

Agentes antimicrobianos	Halo de inibição (mm)				Critério
	S ^a	I ^b	R ^c		
Ampicilina	≥ 26	19 - 25	≤ 18	VETERINÁRIO ¹	estreptococos β - hemolítico (não <i>S. pneumoniae</i>)
Ceftiofur	≥ 21	18 - 20	≤ 17	VETERINÁRIO	<i>A. pleuropneumonia</i> – doença respiratória de suínos
Clindamicina	≥ 21	15 - 20	≤ 14	VETERINÁRIO	<i>Staphylococcus</i> spp. – pele e tecidos de cães
Cotrimoxazol ^d	≥ 16	11 - 15	≤ 10	VETERINÁRIO	<i>Staphylococcus</i> spp.
Doxiciclina	≥ 16	13 - 15	≤ 12	HUMANO ²	-
Enrofloxacin	≥ 21	17 - 20	≤ 16	VETERINÁRIO	<i>P. multocida</i> – doença respiratória de bovinos
Espectinomicina	≥ 14	11 - 13	≤ 10	VETERINÁRIO	<i>P. multocida</i> – doença respiratória de bovinos
Florfenicol	≥ 22	19 - 21	≤ 18	VETERINÁRIO	Doença respiratória de suínos
Gentamicina	≥ 16	13 - 15	≤ 12	VETERINÁRIO	<i>Actinobacillus</i> spp. - eqüinos
Neomicina	≥ 17	13 - 16	≤ 12	HUMANO	-
Penicilina	≥ 24	-	-	VETERINÁRIO	estreptococos β - hemolítico (não <i>S. pneumoniae</i>)
Sulfadimetoxina	≥ 17	13 - 16	≤ 12	VETERINÁRIO	-
Tetraciclina	≥ 23	19 - 22	≤ 18	VETERINÁRIO	<i>Streptococcus</i> spp. (exceto <i>S. pneumoniae</i>)
Tilmicosina	≥ 11	-	≤ 10	VETERINÁRIO	<i>A. pleuropneumonia</i> – doença respiratória de suínos
Tulatromicina	≥ 18	15 - 17	≤ 14	VETERINÁRIO	<i>P. multocida</i> – doença respiratória de bovinos

^a sensível, ^b intermediário, ^c resistente e ^d associação de sulfametoxazol e trimetoprima.

¹ CLSI – M31-A3 (2008)

² CLSI – M100-S15 (2005)

Quadro 5 - Critérios para interpretação dos halos de inibição do teste de disco-difusão

4.2.2.2 Microdiluição

Para o teste quantitativo de perfil de sensibilidade antimicrobiana foi utilizada a microdiluição em placa com um painel pronto Sensititre (BOPO6F), da empresa Trek Diagnostics Systems. Neste painel as placas são preparadas com as diluições dos antimicrobianos previamente dispostas e liofilizadas nos poços de placas de 96 cavidades de fundo em “u” (Quadro 6), sendo somente necessário a ressuspensão das mesmas por meio da adição do isolado bacteriano em concentração pré-definida, assim como o caldo que permita seu crescimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	XNL 8	TIA 32	CTET 8	OXY 8	PEN 8	AMP 16	DANO 1	STX 2/38	TYLT 4	TUL 4	CLI 16	SDM 256
B	XNL 4	TIA 16	CTET 4	OXY 4	PEN 4	AMP 8	DANO 0,5	SPE 64	TYLT 2	TUL 2	CLI 8	ENRO 2
C	XNL 2	TIA 8	CTET 2	OXY 2	PEN 2	AMP 4	DANO 0,25	SPE 32	TYLT 1	TUL 1	CLI 4	ENRO 1
D	XNL 1	TIA 4	CTET 1	OXY 1	PEN 1	AMP 2	DANO 0,12	SPE 16	TYLT 0,5	TIL 64	CLI 2	ENRO 0,5
E	XNL 0,5	TIA 2	CTET 0,5	OXY 0,5	PEN 0,5	AMP 1	NEO 32	SPE 8	TUL 64	TIL 32	CLI 1	ENRO 0,25
F	XNL 0,25	TIA 1	TIA 0,5	GEN 16	PEN 0,25	AMP 0,5	NEO 16	TYLT 32	TUL 32	TIL 16	CLI 0,5	ENRO 0,12
G	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	PEN 0,12	AMP 0,25	NEO 8	TYLT 16	TUL 16	TIL 8	CLI 0,25	+
H	FFN 8	FFN 4	FFN 2	FFN 1	FFN 0,5	FFN 0,25	NEO 4	TYLT 8	TUL 8	TIL 4	+	+

AMP – ampicilina CLI – clindamicina CTET – clortetraciclina DANO – danofloxacina ENRO – enrofloxacin
FFN – florfenicol GEN – gentamicina NEO – neomicina OXY – oxitetraciclina PEN – penicilina SDM –
sulfadimetoxina SPE – espectinomicina STX – trimetoprima / sulfametoxazol TIA – tiamulina TIL – tilmicossina
TULA – tulatromicina TYLT – tilosina XNL – ceftiofur + - controle positivo

Quadro 6 - Disposição e concentrações (µg/mL) dos princípios antimicrobianos na placa Sensititre BOPO6F– Trek Diagnostics Systems

O caldo utilizado no experimento foi uma modificação do caldo que o documento M31-A3 recomenda para microorganismos fastidiosos, o VFM (veterinary fastidious medium). Substituiu-se o sangue lisado de equino por soro fetal bovino, na mesma concentração proposta para o constituinte original. A composição do meio é listada na quadro 7.

Composição	Quantidade por litro de meio
Caldo Mueller Hinton ajustado	22 g
Extrato de levedura	20 g
Soro fetal bovino	20 mL
Suplemento de concentrado de levedura	20 mL

Quadro 7 - Composição do meio VFM modificado

O inóculo bacteriano utilizado no teste de concentração inibitória mínima foi preparado à partir de um cultivo puro de *Erysipelothrix* spp. em caldo cérebro-coração (BHI) suplementado com 5 % de soro eqüino de 24 horas. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland. Esta suspensão bacteriana ajustada contém aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1:1000 no caldo VFM modificado de maneira a obter uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL e então, distribuída nos poços da placa.

Após distribuição do inóculo na placa, esta foi selada com adesivo fornecido pelo próprio fabricante e incubada a 37 °C por 24 horas.

O resultado do teste de microdiluição fornece a concentração inibitória mínima, que pode ser traduzida como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microorganismo nos poços da microplaca. O crescimento pode ser detectado pela visualização a olho nu de um “botão” no fundo do poço em “u” da placa, denotando o crescimento e a conseqüente precipitação das células bacterianas ao fundo.

Como mencionado no item 4.2.2.1, em função da indisponibilidade na literatura dos critérios interpretativos das concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos para o agente *Erysipelothrix* spp., foram adotados os critérios apresentados no quadro 8 para a interpretação dos resultados do teste de microdiluição.

Agentes antimicrobianos	CIM ^a (µg/mL)				Critério
	S ^b	I ^c	R ^d		
Ampicilina	≤ 0,25	0,5 - 4	≥ 8	VETERINÁRIO ¹	estreptococos β - hemolítico (não <i>S. pneumoniae</i>)
Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8	VETERINÁRIO	<i>A.pleuropneumonia</i> – doença respiratória de suínos
Clindamicina	≤ 0,5	1 - 2	≥ 4	VETERINÁRIO	<i>Staphylococcus</i> spp. – pele e tecidos de cães
Clortetraciclina*	≤ 4	8	≥ 16	HUMANO ²	-
Cotrimoxazol ^e	≤ 2/38	-	≥ 4/76	VETERINÁRIO	<i>Staphylococcus</i> spp.
Danofloxacin	≤ 0,25	-	-	VETERINÁRIO	<i>P.multocida</i> – doença respiratória de bovinos
Enrofloxacin	≤ 0,25	0,5 - 1	≥ 2	VETERINÁRIO	<i>P.multocida</i> – doença respiratória de bovinos
Espectinomicina	≤ 32	64	≥ 128	VETERINÁRIO	<i>P. multocida</i> – doença respiratória de bovinos
Florfenicol	≤ 4	8	≥ 16	VETERINÁRIO	<i>Salmonella choleraesuis</i> – doença respiratória de suínos
Gentamicina	≤ 2	4	≥ 8	VETERINÁRIO	<i>Actinobacillus</i> spp. – eqüinos
Neomicina	≤ 8	-	-	VETERINÁRIO	Gram + Trek Diagnostic Systems
Oxitetraciclina	≤ 4	8	≥ 16	HUMANO ²	-
Penicilina	≤ 0,12	-	-	VETERINÁRIO	estreptococos β - hemolítico (não <i>S. pneumoniae</i>)
Sulfadimetoxina	≤ 256	-	≥ 512	VETERINÁRIO	-
Tiamulina	≤ 16	-	≥ 32	VETERINÁRIO	<i>A.pleuropneumoniae</i> – doença respiratória de suínos
Tilmicosina	≤ 16	-	≥ 32	VETERINÁRIO	<i>P.multocida</i> – doença respiratória de suínos
Tilosina	≤ 1	2 - 4	□ 4	VETERINÁRIO ³	<i>B.hyodysenteriae</i> – disenteria de suínos
Tulatromicina	≤ 16	32	64	VETERINÁRIO	<i>P. multocida</i> – doença respiratória de bovinos

^a concentração inibitória mínima, ^b sensível, ^c intermediário, ^d resistente e ^e associação de sulfametoxazol e trimetoprima.

¹ CLSI – M31-A3 (2008), ² CLSI – M100-S15 (2005), ³ RONNE; SZANCER (1990).

* não foi encontrado critério específico para o princípio clortetraciclina, por isso foi utilizado o critério da oxitetraciclina.

Quadro 8 - Critérios para interpretação das concentrações inibitórias mínimas do teste de microdiluição

No teste de microdiluição foram utilizados como controle as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, sendo que as mesmas foram semeadas em caldo Mueller Hinton II – com ajuste de cátions (Difco-BBL) como preconizado pelo CLSI (CLSI, 2008).

Para a análise dos resultados dos antibiogramas (qualitativo e quantitativo), as amostras de *Erysipelothrix* spp. foram divididas em três grupos:

1. Amostras recentes: composto por 73 amostras isoladas entre 2004 e 2008;
2. Amostras históricas: composto por 59 amostras isoladas no início dos anos 80;
3. Amostras de referência: composto por 19 amostras, sendo 18 provenientes da Austrália e uma do Reino Unido.

4.2.2.3 Coeficiente Kappa de concordância

Treze princípios antimicrobianos utilizados neste estudo (ampicilina, ceftiofur, clindamicina, cotrimoxazol, enrofloxacin, espectinomicina, florfenicol, gentamicina, neomicina, penicilina, sulfonamida, tilmicosina e tulatromicina) foram avaliados por ambas as técnicas de sensibilidade antimicrobiana. Com o objetivo de verificar a ocorrência de concordância entre os métodos qualitativos e quantitativos de susceptibilidade antimicrobiana, o coeficiente Kappa de concordância (RANDOLPH, 2005) foi calculado para cada um dos 13 antibióticos.

O coeficiente Kappa é um índice estatístico que descreve a intensidade da concordância entre métodos / testes, sendo baseado no número de respostas concorrentes entre os mesmos e expresso em valores entre 0 e 1. Os valores do coeficiente Kappa foram estimados a partir de um motor de cálculo presente na internet (RANDOLPH, 2008) e a interpretação dos mesmos obedeceu os critérios propostos por Landis e Koch (1977), conforme apresentado no quadro 9.

Valores de Kappa	Concordância
< 0	Nenhuma
0 – 0,19	Insignificante
0,2 – 0,39	Regular
0,4 – 0,59	Moderada
0,6 – 0,79	Substancial
0,8 – 1,00	Quase perfeita

Fonte: (LANDIS; KOCH, 1977)

Quadro 9 - Critérios de interpretação do coeficiente Kappa

4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

4.3.1 PCR

Com a finalidade de determinar entre os isolados quais pertenciam à espécie *E. rhusiopathiae* foi realizada uma PCR *duplex* para detecção simultânea do gênero *Erysipelothrix* (MAKINO et al., 1994) e da espécie *E. rhusiopathiae* (SHIMOJI et al., 1998).

As seqüências dos *primers*, assim como o tamanho do produto amplificado constam no quadro 10.

Primer	Sequência (5'- 3')	Gene alvo	Amplicon	Referência
MO 101	AGATGCCATAGAACTGGTA	16S rRNA	407 pb	MAKINO et al., 1994
MO 102	CTGTATCCGCCATAACTA			
ER 1	CGATTATATTCTTAGCACGCAACG	<i>Tn</i> 916	937pb	SHIMOJI et al., 1998
ER 2	TGCTTGTGTTGTGATTCTTGACG			

Quadro 10 - *Primers* utilizados para detecção simultânea de gênero e espécie

4.3.1.1 Extração do DNA bacteriano

A purificação de ácidos nucléicos foi procedida segundo protocolo descrito por Boom et al. (1990), com algumas modificações.

Um microtubo contendo 200 µL de um cultivo puro de *Erysipelothrix* spp. em infusão cérebro-coração (BHI) acrescido de 5 % (v/v) de soro eqüino de 24 horas de crescimento foi pré-lisado com 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 100 µL de lisozima (100 mg/mL) durante 60 minutos em banho-úmido a 37 °C. Após

este período de pré-lise foram adicionados ao microtubo 1000 µl de tampão de lise (120 g isotiocianato de guanidina, 1 mL Triton 100 X, 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 8,8 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL H₂O MilliQ ®), 40 µL de solução carreadora (1 g de Diatomaceous Earth, 50 µL HCl 37 % e 5 mL H₂O MilliQ ®) e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente o microtubo, no qual as células bacterianas já se encontravam lisadas e os DNAs ligados às partículas de sílica, foi centrifugado a 12000 x g por um minuto e 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e o pelete resultante foi submetido a cinco lavagens seguidas. As duas primeiras com 500 µL de tampão de lavagem (120 g isotiocianato de guanidina e 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] em 100 mL H₂O MilliQ ®), as duas seguintes com 500 µL de etanol 70 % (- 20 °C) e a última com 500 µL de acetona. Após as lavagens o microtubo contendo o pelete foi mantido em estufa a 37 °C por cerca de 60 minutos. O pelete foi ressuspensionado pela adição de 150 µL de tampão de eluição (1 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 0,2 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL de H₂O MilliQ ®), centrifugado a 12000 x g por cinco minutos, removido o sobrenadante (DNA eluído da sílica) e, este, foi armazenado a -20 °C até sua amplificação.

4.3.1.2 Amplificação do DNA

A mistura da reação de amplificação foi preparada em um volume de 20 µL contendo 2,5 µL de buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM dNTP, 20 pmoles MO101 e MO102, 30 pmoles ER1 e ER2, 0,5 U Taq (LGC Biotecnologia). À esta mistura da reação de amplificação foi adicionado um volume de 5 µL DNA extraído. A amplificação consistiu de desnaturação a 95 °C por quatro minutos, seguida por 35 ciclos de um minuto a 94 °C, um minuto a 59,3 °C e um minuto e meio a 72 °C, finalizando com a extensão de cinco minutos a 72 °C.

4.3.1.3 Detecção do produto de amplificação

Os produtos de amplificação foram segregados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, utilizando-se tampão TBE 0,5 X (Tris-base 45 mM, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA pH 8). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação ImageMaster[®] (Amersham Biosciences) por meio do uso do corante BlueGreen[®] (LGC Biotecnologia) e identificados com base na utilização de marcador de pares de base 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

Os produtos de amplificação que apresentaram à eletroforese apenas a banda de 407 pb foram considerados como pertencentes à espécie *E. tonsillarum*, enquanto que aqueles que apresentaram simultaneamente as bandas de 407 pb e 937 pb foram considerados representantes da espécie *E. rhusiopathiae*, uma vez que o par de *primers* MO101-MO102 codificam a região 16S do rRNA do gênero *Erysipelothrix* (MAKINO et al., 1994) e o par de *primers* ER1-ER2 codificam região da sequência de inserção Tn916, a qual, presumivelmente, está associada à virulência da espécie *E. rhusiopathiae* (SHIMOJI et al., 1998).

4.3.2 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

O AFLP é um método de tipagem que combina a digestão por enzimas de restrição e a PCR, por meio da amplificação seletiva dos fragmentos de restrição do DNA genômico total digerido (SINGH et al., 2006).

A técnica envolve três etapas básicas: (1) restrição do DNA e ligação de adaptador de oligonucleotídeos, (2) amplificação seletiva de conjuntos de fragmentos de restrição e (3) análise em gel dos fragmentos amplificados (VOS et al., 1995). A amplificação dos fragmentos de restrição é obtida por meio do uso de adaptadores ligados às extremidades dos fragmentos de restrição, de maneira

a criar sítios alvo para o anelamento de *primers* durante a reação (VOS et al., 1995). Esta etapa é definida como um processo seletivo devido ao uso de *primers* que estendem os fragmentos de restrição e amplificam apenas aqueles fragmentos, cujos nucleotídeos correspondam aos que flanqueiam os sítios de restrição (MUELLER; WOLFENARGER, 1999).

O protocolo de AFLP realizado seguiu descrição de McLauchlin et al (2000), utilizando a endonuclease de restrição *Hind* III.

4.3.2.1 Extração do DNA bacteriano

Vide procedimento descrito no item 4.3.1.1

4.3.2.2 Digestão do DNA bacteriano

Em um microtubo contendo 10 µL do DNA bacteriano extraído foram adicionados 24 U *Hind* III, 2 µL tampão da enzima *Hind* III e 5,6 µL de H₂O MilliQ®, perfazendo um volume total de 20 µL. Incubou-se esta reação a 37 °C *overnight*. A posição relativa ao sítio de restrição da enzima *Hind* III é apresentada no quadro 11.

4.3.2.3 Ligação dos adaptadores ao DNA digerido

Em um novo microtubo foram adicionados 5 µL do DNA digerido, 4 µL tampão de T4 DNA-ligase, 0,2 µg de cada adaptador (ADH 1 / ADH 2), 1 U T4 DNA ligase e H₂O MilliQ® para o volume final de 15 µL. Esta reação foi Incubada à temperatura ambiente por 3 horas. Ao final deste período o DNA ligado aos

adaptadores foi aquecido a 80 °C por 10 minutos. As seqüências dos adaptadores ADH 1 e ADH 2 estão descritas no quadro 11.

4.3.2.4 Amplificação do DNA digerido e ligado aos adaptadores

As amostras foram submetidas a três amplificações distintas com diferentes *primers*, sendo utilizadas as sequencias HI-A, HI-G e HI-T, descritas no quadro 11.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µl do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do *primer* (HI-A ou HI-G ou HI-T), 1U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação a 94 °C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C e 2,5 minutos a 72 °

1. Fragmento <i>Hind</i> III	5'AGCTT----//----A 3' 3'A----//----TTCGA 5'
2. Adaptadores	ADH 1 5' ACGGTATGCGACAG 3' ADH 2 3' GAGTGCCATACGCTGTCTCGA 5'
3. <i>Primers</i>	HI-A 5' GGTATGCGACAGAGCTTA 3' HI-G 5' GGTATGCGACAGAGCTTG 3' HI-T 5' GGTATGCGACAGAGCTTT 3'

(1) Sítios de restrição da endonuclease *Hind* III, (2) Seqüência dos dois oligonucleotídeos complementares que serão os adaptadores que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, (3) Seqüência dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos.

Quadro 11 – Sítio de restrição da enzima *Hind* III, adaptadores e seqüências de bases dos adaptadores e dos *primers* HI-A, HI-G e HI-T

4.3.2.5 Detecção do produto de amplificação

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, utilizando-se tampão TBE 0,5 X e voltagem de 22 V durante 24 horas.

Os fragmentos amplificados foram visualizadas no sistema de fotodocumentação ImageMaster® (Amershan Biosciences), sendo os fragmentos corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

4.3.2.6 Análise estatística dos fragmentos amplificados e determinação do índice discriminatório (ID)

Para análise estatística dos fragmentos obtidos por meio do AFLP foi utilizado o programa NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*). Os dados foram convertidos em códigos binários e a similaridade das amostras foi estimada pelo emprego do coeficiente de Dice entre os grupos. A partir da matriz de similaridade gerada por este coeficiente foi possível determinar os grupos pelo método de UPGMA (*Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average*), os quais foram representados sob a forma de dendrograma.

Os resultados obtidos por meio do AFLP foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), com a seguinte fórmula:

$$DI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj-1)$$

Onde N é o número de amostra da população teste, s é o número total de tipos descritos e nj é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI indica

a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocadas em diferentes grupos.

O nível aceitável de discriminação de determinada técnica depende de uma série de fatores, contudo, índices superiores a 0,90 parecem assegurar a confiabilidade à interpretação dos resultados de tipagem (HUNTER; GASTON, 1988).

4.3.3 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A análise de macrorestrição de genomas microbianos resolvida pela eletroforese em gel de campo pulsado é baseada na clivagem do DNA cromossômico por uma enzima de restrição de baixa frequência de corte (tipicamente menos de 30 sítios de restrição por genoma), que gera fragmentos de alto peso molecular que não podem ser resolvidos pela eletroforese convencional. Nesta eletroforese, o campo elétrico tem sua direção e/ou intensidade periodicamente alterados, o que permite a separação de moléculas de DNA maiores que 12 Mb, por meio do movimento em “zig-zag” das grande moléculas de DNA através da matrix de agarose (STRUELENS; RYCK; DEPLANO, 2001).

4.3.3.1 Extração do DNA genômico

O protocolo de extração utilizado foi o mesmo proposto por Chang e Chui (1998), diferindo unicamente do método original em relação a concentração do inóculo bacteriano utilizado nos blocos de agarose (de turbidez 0,5 para 5 McFarland).

Cultivos bacterianos puros de 24 horas em caldo BHI acrescido de 5 % (v/v) de soro equino estéril (inativado), incubados aerobiamente a 37 °C, foram

utilizados na preparação do inóculo para a confecção dos blocos da PFGE. Suspensões bacterianas foram ajustadas de maneira a obter uma turbidez óptica comparável à solução padrão 10 da escala McFarland, sendo que 500 µL dessa suspensão foram transferidos para microtubos de capacidade 1,5 mL e centrifugados a 16750 x *g* por três minutos. O pelete formado foi ressuspenso em 500 µL de solução de Tris (12 mM, pH 7,6) a 4 °C. À suspensão bacteriana em Tris foi adicionada e misturado um volume igual de agarose de baixo ponto de fusão a 1,5 % (Seakem Gold Agarose - Cambrex). A solução resultante desta homogeneização foi disposta em fôrma de moldagem acrílica para a confecção dos blocos de agarose da PFGE.

Após a polimerização dos blocos de agarose, estes foram submetidos a uma lise enzimática com 1000 µL de solução de lise (1mg/mL de lisozima, 0,2 % Na-deoxicolato e 0,5 % de Na-lauroil sarcosine em TE), a 37 °C durante 30 minutos. O tampão de lise foi desprezado após período de incubação e 1000 µL de solução ESP (0,25 M EDTA [pH 9,5], 1 % Na-lauroil sarcosine e 0,5 mg/mL proteinase K) foram adicionados e incubados em banho úmido a 50 °C por 30 minutos. Após a incubação com solução ESP os blocos de agarose foram lavados duas vezes em solução TE-PMSF (0,175 mg/mL PMSF em TE) e quatro vezes em TE (10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,6), que consistiram, respectivamente, de duas e quatro trocas de duração de 15 minutos, sob agitação e em temperatura ambiente. Os blocos foram armazenados em TE a 4 °C.

4.3.3.2 Macrorestrição do DNA genômico

Após a extração do DNA genômico as amostras foram submetidas à digestão enzimática por meio da incubação das mesmas à temperatura de 30 °C por 24 horas com 30 unidades da endonuclease de restrição *Sma* I.

4.3.3.3 Eletroforese em campo pulsado

As amostras de *Erysipelothrix* spp. foram submetidas à PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad) para a análise dos perfis de macrorestrição formados.

Os blocos contendo as amostras bacterianas foram dispostos em gel de agarose 1 % (Seakem Gold Agarose - Cambrex). Assim como o marcador λ DNA-PFGE de peso molecular (BioLabs.) de tamanho 50 a 1000 kb. A eletroforese foi conduzida conforme parâmetros propostos por Sawada et al. (2006), em período de 15 horas a 6 V/cm, ângulo fixo de 120 °, com pulso inicial de 5 segundos e final de 50 segundos, em tampão TBE 0,5 X mantido a 12 °C.

O gel foi corado por duas horas em solução 1 X de Sybr®Safe (Invitrogen), sob agitação e temperatura ambiente. A visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultra-violeta em sistema de foto-documentação ImageMaster® (Amershan Biosciences). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador molecular λ DNA-PFGE (BioLabs.).

4.3.3.4 Análise estatística dos fragmentos de restrição e determinação do índice discriminatório (ID)

Vide procedimento descrito no item 4.3.2.6

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

5.1.1 Identificação sorológica

A partir dos 26 antisoros disponíveis no “National Institute of Animal Health” (Tsukuba / Japão) foi possível identificar 18 sorotipos distintos (1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 21, 24 e 25). No entanto, 12 isolados não foram tipáveis com os antisoros disponíveis, sendo que 10 isolados referem-se a amostras provenientes de tonsilas de suínos portadores (cinco de isolados recentes e cinco de isolados históricos) e dois isolados referem-se ao grupo de amostras de referência provenientes da Austrália. Os resultados da sorotipagem estão dispostos na tabela 1.

O sorotipo mais prevalente entre os isolados foi o 2b, tanto em amostras provenientes de animais com quadros septicêmicos como de portadores, assim como entre as amostras históricas e recentes.

Todos os casos septicêmicos recentemente isolados foram identificados com pertencentes ao sorotipo 2b, inclusive os isolados provenientes do mesmo animal. Os demais sorotipos (6, 11, 12, 19 e 24) encontrados entre os isolados de casos septicêmicos pertencem ao grupo de amostras históricas.

Dentre os isolados de tonsila de suínos portadores houve maior variabilidade de sorotipos (1b, 2b, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 17, 19 e 21), sendo que entre os isolados recentes foram encontrados os sorotipos 1b, 2b, 5, 6, 8, 10 e 19, enquanto que entre os isolados históricos foram identificados os sorotipos 2b, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 17, 19 e 21.

Tabela 1 - Sorotipos dos 151 isolados de *Erysipelothrix* spp.

Amostras		Número de isolados por sorotipo																		
		1a	1b	2a	2b	4	5	6	7	8	10	11	12	15	17	19	21	24	25	NT ^a
Padrão	UK ^b			1																
	AUS ^c	1	1	1	3	1	1	2	1		1	1	1	1					1	2
Históricas	Portadores				14		7	3*	3	4		1	7		2	1	4*			5
	Septicêmicos							3				2	2			2**		1**		
Recentes	Portadores		9		24		2	5		3	2					4				5
	Septicêmicos				19															
Subtotal		1	10	2	60	1	10	13	4	7	3	4	10	1	2	7	4	1	1	12

^a isolado não tipável com antisoros contra os sorotipos de 1 a 26

^b cepa padrão oriunda do Reino Unido

^c cepas padrão oriundas da Austrália

* um mesmo isolado reagiu contra os sorotipos 19 e 24

** um mesmo isolado reagiu contra os sorotipos 6 e 21

Dois isolados foram identificados como pertencentes a mais de um tipo sorológico, o primeiro isolado refere-se a uma amostra histórica de caso septicêmico e foi diagnosticado como sorotipo 19 e 24, enquanto que o segundo isolado pertence a uma amostra histórica de tonsila de suíno portador, caracterizado como sorotipos 6 e 21.

Os sorotipos identificados no grupo de amostras de referência da Austrália foram os seguintes: 1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 15 e 25. Os tipos sorológicos anteriormente identificados como 3, 8, 9 e 14, agora foram identificados como, respectivamente, 25, NT (não tipáveis), NT e 6.

A amostra de referência do Reino Unido foi classificada como sorotipo 2a.

5.1.2 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

5.1.2.1 Disco-difusão

As amostras foram, quase em sua totalidade, sensíveis aos seguintes princípios antimicrobianos: ampicilina, ceftiofur, clindamicina, espectinomicina, florfenicol, penicilina, tilmicosina e tulatromicina. A resistência bacteriana foi bastante evidente frente ao cotrimoxazol, gentamicina, neomicina e sulfonamida. Os resultados são apresentados na tabela 2.

Comparando-se os perfis de sensibilidade das amostras recentes com os das amostras históricas frente à doxíciclina, enrofloxacina e tetraciclina, verifica-se que estes sofreram considerável alteração, sendo que o número de amostras recentes com perfis intermediários ou resistentes às drogas supracitadas é mais alto. Uma pequena variação no perfil de sensibilidade destas amostras frente ao florfenicol também foi observada, sendo, porém menos evidente. Na figura 11 pode ser observado o crescimento do agente e os halos formados no teste de disco-difusão.

Tabela 2 - Perfil qualitativo de susceptibilidade antimicrobiana das amostras de *Erysipelotrix* spp. de acordo com grupo de isolados

Princípios antimicrobianos	Resultados do teste de disco-difusão (% de isolados)								
	Recentes			Históricas			Referência		
	S ^a	I ^b	R ^c	S	I	R	S	I	R
Ampicilina	97,3	2,7	-	100	-	-	100	-	-
Ceftiofur	94,5	5,5	-	100	-	-	94,7	5,3	-
Clindamicina	97,3	1,35	1,35	100	-	-	100	-	-
Cotrimoxazol ^d	-	2,7	97,3	-	3,4	96,6	-	-	100
Doxiciclina	67,1	27,4	5,5	96,6	3,4	-	100	-	-
Enrofloxacina	58,9	5,5	35,6	98,3	1,7	-	100	-	-
Espectinomicina	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Florfenicol	95,9	1,4	2,7	100	-	-	100	-	-
Gentamicina	1,35	1,35	97,3	-	-	100	-	-	100
Neomicina	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Penicilina	100	-	-	100	-	-	94,7	-	5,3
Sulfadimetoxina	-	1,4	98,6	1,7	1,7	96,6	-	5,3	94,7
Tetraciclina	42,5	12,3	45,2	83	5,1	11,9	84,2	15,8	-
Tilmicosina	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Tulatromicina	94,5	5,5	-	100	-	-	100	-	-

^a sensível, ^b intermediário, ^c resistente e ^d associação de sulfametoxazol e trimetoprima.

Figura 11 - Disco-difusão realizada em amostras de *Erysipelothrix* spp.

5.1.2.2 Microdiluição

Os perfis de susceptibilidade dos 151 isolados de *Erysipelothrix* spp., expressos como concentrações requeridas para inibir o crescimento de 50 e 90% dos mesmos (CIM 50 e CIM 90), estão dispostos na tabela 3. Enquanto que a tabela 4 apresenta os resultados da microdiluição segundo divisão de grupos de amostras (recentes, históricas e de referência) e interpretações conforme critérios adotados no estudo.

Tabela 3. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos 18 agentes antimicrobianos frente aos 151 isolados de *Erysipelothrix* spp.

Agentes antimicrobianos	CIM (µg/mL)					Interpretação
	Faixa testada	Faixa resultados	Moda	CIM ₅₀ ^a	CIM ₉₀ ^b	
Ampicilina	0,25 - 16	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	S
Ceftiofur	0,25 - 8	≤ 0,25 - 1	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	S
Clindamicina	0,25 - 16	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	S
Clortetraciclina	0,5 – 8	≤ 0,5 - □ 8	≤ 0,5	≤ 0,5	□ 8	S
Cotrimoxazol ^c	2/38	□ 2/38	□ 2/38	□ 2/38	□ 2/38	R
Danofloxacina	0,12 – 1	≤ 0,12 - □ 1	0,25	0,25	□ 1	S
Enrofloxacin	0,12 - 2	≤ 0,12 - □ 2	0,25	0,25	□ 2	S
Espectinomicina	8 – 64	≤ 8 - □ 64	32	32	32	S
Florfenicol	0,25 – 8	2 - 4	0,25	4	4	S
Gentamicina	1 - 16	□ 16	□ 16	□ 16	□ 16	R
Neomicina	4 - 32	□ 32	□ 32	□ 32	□ 32	R
Oxitetraciclina	0,5 – 8	≤ 0,5 - □ 8	1	2	□ 8	S
Penicilina	0,12 – 8	≤ 0,12	0,12	≤ 0,12	≤ 0,12	S
Sulfadimetoxina	256	□ 256	□ 256	□ 256	□ 256	R
Tiamulina	0,5 – 32	≤ 0,5 - 8	4	4	4	S
Tilmicosina	4 – 64	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	S
Tilosina	0,5 - 32	≤ 0,5 - 4	≤ 0,5	≤ 0,5	2	S
Tulatromicina	1 – 64	≤ 1 - 8	4	4	8	S

^a Concentração que inibiu 50 % dos isolados, ^b concentração que inibiu 90 % do isolados e ^c associação de sulfametoxazol e trimetoprima.

Tabela 4 - Perfil quantitativo de susceptibilidade antimicrobiana das amostras de *Erysipelotrix* spp. de acordo com grupo de isolados

Princípios antimicrobianos	Resultados do teste de microdiluição (% de isolados)								
	Recentes			Históricas			Referência		
	S ^a	I ^b	R ^c	S	I	R	S	I	R
Ampicilina	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Ceftiofur	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Clindamicina	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Clortetraciclina	57,5	1,4	41,1	88,1	-	11,9	100	-	-
Cotrimoxazol ^d	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Danofloxacina	58,9	-	41,1	100	-	-	94,7	-	5.3
Enrofloxacina	61,7	-	38,3	100	-	-	100	-	-
Espectinomicina	93,2	6,8	-	100	-	-	100	-	-
Florfenicol	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Gentamicina	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Neomicina	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Oxitetraciclina	57,4	-	42,5	88,1	-	11,9	100	-	-
Penicilina	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Sulfonamida	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Tiamulina	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Tilmicosina	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Tilosina	74	26	-	100	-	-	100	-	-
Tulatromicina	100	-	-	100	-	-	100	-	-

^a sensível, ^b intermediário, ^c resistente e ^d associação de sulfametoxazol e trimetoprima.

Pouca diferença foi encontrada entre os três grupos de amostras de *Erysipelothrix* spp. (recentes, históricas e de referência) em relação aos perfis quantitativos de susceptibilidade antimicrobiana. Todos os 151 isolados foram sensíveis à ampicilina, ceftiofur, clindamicina, espectinomicina, florfenicol, penicilina, tiamulina, tilmicosina e tulatromicina. A resistência também foi unânime entre cotrimoxazol, gentamicina, neomicina e sulfonamida (Figura 12).

Figura 12 - Microdiluição em placa - formação do “botão” no fundo de poços, denotando a resistência do isolado histórico de *E. rhusiopathiae* às concentrações de neomicina testadas na placa.

A maior parte dos isolados foram considerados sensíveis à clortetraciclina, danofloxacina, espectinomicina e tilosina, contudo, no caso dessas drogas alguns isolados apresentaram sensibilidade intermediária ou resistência. Entre o grupo de amostras recentes foi observado resistência à clortetraciclina, danofloxacina, enrofloxacina e oxitetraciclina e sensibilidade intermediária à tilosina.

5.1.2.3 Coeficiente Kappa de concordância

Os coeficientes Kappa de concordância obtidos para ampicilina, ceftiofur, clindamicina, cotrimoxazol, enrofloxacina, espectinomicina, florfenicol, gentamicina, neomicina, penicilina, sulfonamida, tilmicosina e tulatromicina foram respectivamente 0,98, 0,95, 0,99, 0,96, 0,94, 0,95, 0,98, 0,96, 1, 0,99, 0,96, 1 e 0,96. De acordo com os critérios de interpretação adotados, os antimicrobianos testados tanto na disco-difusão quanto na microdiluição apresentaram concordância quase perfeita entre os resultados.

5.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

5.2.1 PCR

Por meio da PCR *duplex*, 146 isolados apresentaram a amplificação de dois fragmentos (407 pb e 937 pb), indicando suas identidades como espécie *E. rhusiopathiae*. As cinco amostras restantes apresentaram um único fragmento que caracteriza o gênero *Erysipelothrix* (407 pb), o que sugere que estas amostras possam pertencer à espécie *E. tonsillarum*.

Todos os isolados de casos septicêmicos foram identificados como pertencentes à espécie *E. rhusiopathiae*. Entre os demais grupos de isolados testados (de tonsila de suínos portadores e amostras de referência da Austrália), quase todos foram classificados como pertencentes à espécie *E. rhusiopathiae*, a exceção de três amostras históricas, pertencentes ao sorotipo 7, e duas amostras de referência australianas (sorotipo 7 e 25), que foram identificadas como *E. tonsillarum*.

A figura 13 representa resultados observados em gel de eletroforese após a submissão das amostras à PCR.

Figura 13 - Gel de PCR - amplificação dos fragmentos de DNA de 407pb (*Erysipelothrix* spp.) e de 937pb (*E. rhusiopathiae*). Colunas 4, 5, 10, 11 e 18 representam amostras positivas somente para o gênero *Erysipelothrix*. Colunas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 e 15 representam amostras positivas para espécie de *E. rhusiopathiae*. Colunas 22, 23 e 24 representam respectivamente controle positivo, controle negativo e marcador de peso molecular 100pb

5.2.2 AFLP

5.2.2.1 *Primer* HI-A

O número de fragmentos de DNA gerados a partir do uso do *primer* HI-A variou de dois a 13, com tamanhos aproximados de 350 a 2600 pb (Figura 14). A partir dos 151 isolados testados, 68 perfis eletroforéticos foram observados (designados de 1T a 68T), os quais foram diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda. Não foi encontrada banda comum a todos os perfis. O índice discriminatório obtido pelo AFLP empregando o *primer* HI-A foi de 0,96. As características gerais do AFLP / HI-A são descritas na tabela 5.

Figura 14 - Gel de AFLP - coluna 1 e 30 - marcadores de peso molecular de 100pb, colunas de 2 a 29 - perfis formados pela reação de AFLP-PCR utilizando o *primer* HI-A

Tabela 5 - Características gerais dos AFLPs gerados conforme o *primer* utilizado no AFLP

<i>Primer</i>	Nº fragmentos	Média Nº fragmentos	Tamanho fragmentos (pb ¹)	Nº perfis ²	Índice discriminação
HI - A	2 – 13	6	350 – 2600	68	0,96
HI - G	5 – 12	9	380 – 3500	85	0,98
HI - T	6 - 17	11	380 - 3200	106	0,96

¹ pares de base

² perfis diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda

No dendrograma (Figura 15) podem ser observados dois grupos principais **I** e **II**, com coeficiente de similaridade de 0.23. O grupo **I** foi formado por apenas duas amostras contidas em dois perfis distintos, cujo coeficiente de similaridade foi de 0,52. As duas amostras contidas nesse grupo, apesar de serem provenientes do mesmo local e isoladas a partir de animais com condições de saúde semelhantes, foram obtidas em anos diferentes e pertencem a sorotipos diferentes. O grupo **II** reuniu 149 amostras organizadas em 66 perfis, com coeficientes de similaridade entre as mesmas variando de 0,25 a 1,00. Dentro do grupo **II**, o subgrupo **II_d** destaca-se por conter 130 amostras distribuídas em 56 perfis distintos, com coeficientes de similaridade entre as mesmas variando entre 0,39 a 1,00.

Mesmo ocorrendo alguns pequenos agrupamentos, sejam eles em relação a sorotipo, condição de sanidade do animal ou ano e local de isolamento, destaca-se a falta de padrão epidemiológico na formação dos mesmos.

Colônias isoladas a partir da mesma amostra clínica foram alocadas em idêntico perfil, ou seja, eram genotipicamente iguais.

¹ número de amostras por perfil gerado, ² septicemia, ³ portador, ⁴ antes do ano 1980, ⁵ Rio Grande do Sul, ⁶ Austrália, ⁷ São Paulo e ⁸ Reino Unido.

Figura 15 - Dendrograma AFLP / HI-A baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamentos pelo coeficiente de Dice

5.2.2.2 *Primer* HI-G

Utilizando o *primer* HI-G, o número de bandas observado variou de cinco a 12, com tamanhos aproximados de 380 a 3500 pb (Figura 16). Foram gerados 85 perfis de AFLP (designados de 1G a 85G), os quais foram diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda. Não foi encontrada banda comum a todos os perfis. O índice discriminatório obtido pelo AFLP utilizando o *primer* HI-G foi de 0,98. As características gerais do AFLP / HI-G são descritas na tabela 5.

Figura 16 - Gel de AFLP - coluna 1 e 30 - marcadores de 100 pares de bases, colunas 2 a 29 - perfis formados pela reação de AFLP-PCR utilizando o *primer* HI-G

O dendrograma gerado a partir do AFLP utilizando o *primer* HI-G (Figura 17) evidenciou a reunião das 151 amostras testadas em dois principais grupos (I e II), com coeficiente de similaridade de 0,56. O grupo I foi formado por cinco amostras (cada uma pertencente a um perfil distinto), sendo que todas são

representantes da espécie *E. tonsillarum* a partir dos resultados da PCR. Quatro dessas amostras são representantes do sorotipo 7 e apresentaram coeficientes de similaridade variando entre si de 0,80 a 0,95. A última amostra do grupo I pertence ao sorotipo 25 e apresentou coeficiente de similaridade 0,64 em relação às outras amostras do grupo. No grupo II foram reunidas as demais 146 amostras testadas (contidas em 80 perfis distintos) e com coeficientes de similaridade entre as mesmas variando de 0,58 a 1,00. Dentro do grupo II, o subgrupo II_f se destaca em relação aos demais subgrupos (II_a, II_b, II_c, II_d e II_e) por concentrar a maioria das amostras, sendo que 134 amostras (72 perfis distintos) foram reunidas neste subgrupo, com coeficientes de similaridade entre as mesmas variando entre 0,67 a 1,00.

Ao empregar o *primer* HI-G na técnica, foram observados agrupamentos (de amostras de mesmo sorotipo, condição de sanidade do animal e ano e local de isolamento) mais evidentes do que quando se utilizou o *primer* HI-A. No entanto, assim como no AFLP utilizando o *primer* HI-A, quando se empregou o *primer* HI-G os agrupamentos obtidos não seguiram um padrão epidemiológico de formação.

Colônias isoladas a partir da mesma amostra clínica foram genotipicamente idênticas, a exemplo do que ocorreu quando do emprego do *primer* HI-A.

¹ número de amostras por perfil gerado, ² portador, ³ septicemia, ⁴ antes do ano 1980, ⁵ Rio Grande do Sul, ⁶ Austrália, ⁷ São Paulo e ⁸ Reino Unido.

Figura 17 - Dendrograma AFLP / HI-G baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamentos pelo coeficiente de Dice

5.2.2.3 *Primer* HI-T

Usando o *primer* HI-T, o número de fragmentos gerados pela técnica variou entre seis a 17, cujos tamanhos aproximados variaram entre 380 e 3200 pb (Figura 18). O número de perfis eletroforéticos observados foi 106 (designados de 1 a 106T), os quais foram diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda. Não foi encontrada banda comum a todos os perfis. O índice discriminatório obtido pelo AFLP utilizando o *primer* HI-T foi de 0,96. As características gerais do AFLP / HI-T são descritas na tabela 5.

Figura 18 - Gel de AFLP - colunas 1 e 30 - marcadores de 100 pares de bases, colunas 2 a 29 - perfis formados pela reação de AFLP-PCR utilizando o *primer* HI-T

Analisando o dendrograma em que o *primer* HI-T foi utilizado (Figura 19) é possível observar dois grupos principais (I e II), com coeficiente de similaridade de 0,55. O grupo I foi formado por duas amostras pertencentes a dois perfis diferentes e o coeficiente de similaridade formado entre elas foi de 0,59. As duas

amostras não pertencem ao mesmo sorotipo, não foram isoladas no mesmo ano, os animais a partir de onde foram isoladas não apresentavam as mesmas condições de saúde, mas ambas eram provenientes do mesmo local. O grupo II reuniu 149 amostras (contidas em 104 perfis distintos), cujos coeficientes de similaridade obtidos entre as mesmas variaram de 0,62 a 1,00. O subgrupo de maior destaque dentro do grupo II foi o II_f, comportando 139 amostras distribuídas em 94 perfis distintos, com coeficientes de similaridade entre as mesmas variando entre 0,66 a 1,00.

No AFLP com o *primer* HI-T foram verificados agrupamentos em relação ao sorotipo, condição de sanidade do animal e ano e local de isolamento bem menos evidentes do que quando se utilizou os outros dois *primers* (HI-A e HI-G). Os agrupamentos formados pelo AFLP utilizando o *primer* HI-T também não seguiram nenhum padrão epidemiológico de formação.

Colônias isoladas a partir da mesma amostra clínica foram genotipicamente idênticas, a exemplo do que ocorreu quando do emprego dos outros dois *primers* (HI-A e HI-G).

5.2.3 PFGE

Dos 151 isolados de *Erysipelothrix* spp. submetidos à técnica de PFGE, apenas uma amostra (isolada em 2004 a partir de tonsila de animal portador, proveniente do estado do Rio Grande do Sul) não formou perfil eletroforético. Foram procedidas repetições, tanto na etapa eletroforética como em estágios anteriores (extração e macrorestrição do DNA genômico), visando solucionar a ausência de formação de bandas no gel por esta amostra. Porém, em nenhuma das repetições a formação do padrão de bandas eletroforéticas foi observada.

O número de fragmentos de DNA gerados por perfil na PFGE, variou entre quatro e 13, enquanto seus tamanhos variaram entre 48,5 e 630,5 Kb (Figura 20).

Figura 20 - Gel de PFGE – colunas 1 a 14 representam alguns dos perfis eletroforéticos encontrados a partir do emprego da enzima *Sma* I. Coluna 15 representa o marcador de peso molecular λ DNA-PFGE (New England BioLabs.)

Foram observados 94 perfis eletroforéticos a partir dos 150 isolados testados, os quais foram diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda. Não foi encontrada banda comum a todos os perfis. O índice discriminatório obtido pela PFGE foi de 0,98.

A partir do dendrograma (Figura 21) podem ser observados dois grupos principais **I** e **II**, com coeficiente de similaridade de 0,49. O grupo **I** foi formado por apenas duas amostras, contidas, cada qual, em um perfil distinto (coeficiente de similaridade entre as mesma foi de 0,73). As duas amostras alocadas do grupo **I** pertencem ao sorotipo 12 e foram isoladas a partir de suínos portadores, no estado do Rio Grande do Sul no ano de 1980. Já o grupo **II** reuniu as 148 amostras restantes, distribuídas em 92 perfis eletroforéticos e com coeficiente de similaridade entre as mesmas variando entre 0,50 a 1,00. Dentro do grupo **II**, o subgrupo **IIb** apresentou maior destaque por constituir-se de 142 amostras, organizadas sob 86 perfis diferentes, com coeficientes de similaridade entre as mesmas variando entre 0,55 e 1,00. O subgrupo **IIb**, por sua vez, foi fragmentado em outros subgrupos, dentre os quais, o subgrupo **IIb** foi o de maior expressão por perfilar 101 amostras em 60 perfis diferentes (coeficiente de similaridade entre as amostras variou entre 0,60 e 1,00).

Na PFGE foram observados agrupamentos por sorotipo, ainda que os mesmos não tenham ocorrido de forma absoluta. Muitas amostras de mesmo sorotipo foram alocadas dentro de um mesmo perfil ou perfis adjacentes. No entanto, também foi verificado que alguns perfis apresentavam mais de um tipo sorológico e perfis de sorotipos idênticos foram alocados em posições bastante distantes dentro do dendrograma.

Isolados provenientes de um mesmo animal foram geneticamente idênticos e alocados em mesmo perfil.

Apesar de ser possível observar relativos agrupamentos em relação à condição de sanidade do animal, assim como ano e local de isolamento, não houve um padrão epidemiológico nítido de formação nos mesmos.

A exemplo do que ocorreu no AFLP, a PFGE também agrupou as quatro cepas de sorotipo 7 (*E. tonsillarum*), porém uma delas foi alocada em perfil diferente e distante daquele onde as demais foram agrupadas. As cepas de

sorotipo 7 agrupadas em um mesmo perfil eletroforético são provenientes do estado do Rio Grande do Sul, enquanto a última cepa de sorotipo 7 era originária da Austrália. Este evento pode ser traduzido na capacidade da PFGE em discriminar as cepas de sorotipo 7 conforme origens geográficas de isolamento. O isolado de sorotipo 25 (também *E. tonsillarum*) foi alocado dentro do dendrograma de PFGE próximo da cepa australiana de sorotipo 7.

¹ número de amostras por perfil gerado, ² septicemia, ³ portador, ⁴ antes do ano 1980, ⁵ Rio Grande do Sul, ⁶ Austrália, ⁷ São Paulo e ⁸ Reino Unido.

Figura 21 - Dendrograma PFGE baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamentos pelo coeficiente de Dice

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

6.1.1 Identificação sorológica

Das 151 amostras testadas 139 foram sorotipificáveis pela técnica de imunodifusão dupla em agarose contra 12 não sorotipáveis. Dentre as amostras classificadas como não sorotipáveis estão duas amostras de referência da Austrália, que foram trazidas ao Brasil no início da década de 80, cinco amostras provenientes de tonsilas de suínos portadores isoladas também entre 1980 e 1981, e outras cinco amostras oriundas de tonsilas de animais portadores isoladas no ano de 2004. A ocorrência de amostras não sorotipáveis poderia ser explicada pelo longo tempo de estocagem das mesmas, o que poderia levá-las à perda da habilidade de produzir antígenos específicos. Outras possíveis explicações para este tipo de ocorrência nas amostras seriam: a amostra pertencer ao grupo classificado como “N”, cujas cepas são inaptas a reagir contra qualquer um dos 26 sorotipos específicos ou a pertencer a um novo sorotipo (BARCELLOS; OLIVEIRA; BOROWSKI, 1984). Estas últimas explicações poderiam ser verificadas por meio do preparo de soros hiperimunes a partir das amostras não sorotipáveis e o conseqüente exame de reatividade. Quando a banda de precipitação não é formada no ágar, significa que a amostra pertence ao grupo “N”. No entanto, caso haja a formação da banda de precipitação e o antisoro não reaja com nenhum antígeno de sorotipo conhecido, a amostra é classificada como um novo sorotipo.

Foram identificados 18 sorotipos entre as amostras deste estudo (1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 21, 24 e 25), sendo o 2b o tipo sorológico mais freqüentemente encontrado, tanto em amostras provenientes de animais portadores como os doentes, assim como em amostras recentes e

históricas. O sorotipo 2b também foi o mais prevalente em outros estudos realizados no Brasil (CASTRO et al., 1972; BARCELLOS; OLIVEIRA; BOROWSKI, 1984).

Os sorotipos predominantes em casos crônicos e subagudos em suínos são o 1 e o 2, mas a maioria dos isolados de *E. rhusiopathiae* de suínos com septicemia são restritos ao sorotipo 1a (KUCSERA, 1979; WOOD, 1999). Neste estudo, porém, seis foram os sorotipos identificados dentro do grupo de isolados provenientes de casos septicêmicos (2b, 6, 11, 12, 19 e 24), sendo que todos os isolados recentemente obtidos pertenciam ao sorotipo 2b, nenhuma amostra histórica foi classificada com este sorotipo e o sorotipo 1a não foi identificado em nenhuma das amostras de casos septicêmicos. Outros autores relataram que todas as condições clínicas podem ser induzidas experimentalmente em suínos susceptíveis com uma grande variedade de sorotipos (WOOD; HARRINGTON, 1978; KUCSERA, 1979; HASSANEIN et al., 2003), demonstrando a ausência de relação absoluta entre o sorotipo e a expressão clínica da infecção por *Erysipelothrix* spp.

No presente estudo, os isolados oriundos do mesmo animal, tanto dos dois casos de septicemia recente como do animal portador (isolado no ano de 2008), foram classificados como sorotipo 2b. Apesar deste resultado, não há como afirmar que apenas um único sorotipo esteja presente em um caso septicêmico ou em um animal portador, uma vez que o número de amostras clínicas, neste estudo, submetidas à seleção de cinco colônias diferentes por placa de cultivo foi pequeno (apenas quatro amostras). A partir da literatura consultada não foi possível identificar nenhum estudo anterior que tenha realizado seleção de várias colônias a partir de animais positivos.

Ainda neste estudo, ocorreu a identificação de mais de um sorotipo em um mesmo isolado (sorotipos 19 e 24 em isolado de caso septicêmico e sorotipos 6 e 21 em isolado de animal portador). Takahashi et al. (1987b) também relataram a ocorrência de um isolado classificado como pertencente, simultaneamente, aos sorotipos 11, 12 e 16. Apesar de conhecida a existência de reação cruzada entre os sorotipos 1a e 1b (BARCELLOS; OLIVEIRA; BOROWSKI, 1984), não há descrição desse tipo de ocorrência entre os sorotipos 19 e 24, assim como, 6 e

21. Uma provável explicação para este tipo de ocorrência decorreria da seleção de mais de uma colônia no momento do primo isolamento, o que representaria uma infecção mista (BARCELLOS; OLIVEIRA; BOROWSKI, 1984).

Em relação às amostras de referência provenientes da Austrália, a maioria dos isolados teve identificação concordante com a descrita há 30 anos (1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 e 15). Porém, quatro isolados diferiram quanto ao sorotipo anteriormente determinado. As amostras de referência da Austrália foram identificadas antes de serem enviadas ao Brasil em 1980, no entanto, nestes 30 anos ocorreram algumas alterações em relação à variedade de sorotipos de *Erysipelothrix* spp., o que pode ser uma das causas das diferenças em relação a classificação anterior. Outra possibilidade para a divergência entre os sorotipos pode ser algum tipo de erro na identificação das cepas durante os repiques realizados tanto no Brasil como na Austrália.

6.1.2 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

6.1.2.1 Disco-difusão

A análise do perfil de susceptibilidade antimicrobiana mostrou, de um modo geral, que os resultados foram bastante similares entre as amostras e a ocorrência de eventos discrepantes foi rara.

A sensibilidade dos isolados de *Erysipelothrix* spp. frente à ampicilina, ceftiofur, clindamicina, espectinomicina, florfenicol, penicilina e tilmicosina, assim como a resistência ao cotrimoxazol, gentamicina, neomicina e sulfonamida, são resultados concordantes com relatos prévios de susceptibilidade de isolados clínicos de suínos (TAKAHASHI et al., 1984a,b; TAKAHASHI et al., 1987a; TAKAHASHI et al., 1989; VENDITTI et al., 1999; YAMAMOTO et al., 1999; DE ROSA et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001; FIDALGO; LONGBOTTOM; RILEY, 2002; JONES et al., 2002).

As diferenças encontradas entre os perfis de sensibilidade das amostras recentes e históricas frente à doxiciclina, enrofloxacina, florfenicol e tetraciclina é, provavelmente, uma consequência do uso freqüente destes princípios antimicrobianos em suínos nos últimos anos (TAKAHASHI et al., 1984b).

Ainda não existem estudos conclusivos sobre a forma de desenvolvimento e transferência de genes de resistência a antimicrobianos pelo *Erysipelothrix* spp. Esta resistência poderia surgir por mutação cromossomal ou aquisição de material genético transferível (plasmídeo). Até certo tempo atrás, era sugerido que a resistência nesta espécie bacteriana se desse por meio de mutações cromossomais, uma vez que nenhum plasmídeo ainda havia sido detectado em amostras de *E. rhusiopathiae* resistentes à canamicina, oxitetraciclina e sulfonamida (TAKAHASHI et al., 1984b). Atualmente, porém, a ocorrência de DNA plasmideal em *E. rhusiopathiae* já foi confirmada (NOGUCHI et al., 1993; EAMENS; FORBES; DJORDJEVIC, 2006) e a resistência a determinados antimicrobianos pode estar sendo mediada por estes elementos.

Takahashi et al. (1984a, 1987) observaram que a maioria das amostras resistentes de *E. rhusiopathiae* pertenciam ao sorotipo 2. Neste estudo, contudo, não foi encontrado predomínio de amostras de sorotipo 2b entre as cepas resistentes. Além do sorotipo 2b, foram identificadas cepas resistentes classificadas como 1b, 6, 19, 21 e não tipável.

A tulatromicina é um composto antimicrobiano semi-sintético bastante recente, pertencente ao grupo dos macrolídeos e tem sido amplamente utilizada na suinocultura para o tratamento e prevenção de enfermidades respiratórias. Neste estudo foi verificada a ampla ação deste princípio antimicrobiano frente aos isolados de *Erysipelothrix* spp., sendo que apenas sete isolados recentes apresentaram sensibilidade intermediária e as demais foram sensíveis. Não foi encontrado nenhum relato sobre sua experimentação frente ao *Erysipelothrix* spp. na literatura.

6.1.2.2 Microdiluição

A exemplo do que ocorreu na técnica de disco-difusão em ágar, as amostras bacterianas apresentaram resultados similares entre si. Os isolados mostraram-se sensíveis à ampicilina, ceftiofur, clindamicina, espectinomicina, florfenicol, penicilina e tilmicosina. Esses resultados estão de acordo com outros estudos realizados (TAKAHASHI et al., 1984a,b; TAKAHASHI et al., 1987; TAKAHASHI et al., 1989; VENDITTI et al., 1999; YAMAMOTO et al., 1999; DE ROSA et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001; FIDALGO et al., 2002; JONES et al., 2002). A tiamulina, droga que não foi testada pela disco-difusão, também obteve valores de CIM dentro da faixa de sensibilidade, resultado que corrobora com as descrições de outros autores (YAMAMOTO et al., 1999; JONES et al., 2002). A tulatromicina também mostrou boa atividade frente ao *Erysipelothrix* spp. no teste quantitativo de susceptibilidade antimicrobiana.

A resistência expressada pelas amostras estudadas ao cotrimoxazol (sulfametoxazol + trimetoprima), gentamicina, neomicina e sulfonamida era esperada segundo a literatura consultada (TAKAHASHI et al., 1984a,b; TAKAHASHI et al., 1987; TAKAHASHI et al., 1989; VENDITTI et al., 1999; YAMAMOTO et al., 1999; DE ROSA et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001; FIDALGO et al., 2002; JONES et al., 2002).

Como os perfis de sensibilidade de alguns isolados do grupo de amostras recentes à clortetraciclina, danofloxacina, enrofloxacina, oxitetraciclina e tilosina evoluíram de sensíveis para resistentes (clortetraciclina, danofloxacina, enrofloxacina e oxitetraciclina) ou para sensibilidade intermediária (tilosina), a escolha desses agentes antimicrobianos no controle da infecção pelo agente deve ser avaliada com cautela. A pressão do uso indiscriminado de princípios antimicrobianos ao longo dos anos na suinocultura pode estar associada a essa alteração dos perfis de susceptibilidade (TAKAHASHI et al., 1984b). Opriessnig et al. (2004) caracterizando isolados recentes e históricos de *E. rhusiopathiae* testaram 14 princípios antimicrobianos e observaram que o perfil de susceptibilidade aos antibióticos permaneceu estável ao longo do tempo, com

exceção de cinco drogas (oxitetraciclina, clortetraciclina, florfenicol, gentamicina e trimetoprima). A possível justificativa para a diferença entre o comportamento dos isolados deste estudo e do americano esteja associada ao maior controle sobre o uso de antimicrobianos nas produções animais pelo país da América do Norte.

6.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Este estudo apresenta a primeira caracterização de isolados de *Erysipelothrix* spp. por meio das técnicas de AFLP e PFGE realizada no Brasil.

6.2.1 PCR

A partir desta técnica, todos os isolados de casos septicêmicos foram identificados como pertencentes à espécie *Erysipelothrix rhusiopathiae* por exibirem na eletroforese duas bandas (407 pb e 937 pb). Entre os demais grupos de isolados testados (de tonsila de suíno portador, amostras de referência da Austrália e do Reino Unido) somente cinco amostras (sorotipos 7 e 25) devem pertencer a espécie *E. tonsillarum*, por não exibirem a banda de tamanho 937 pb.

A relação observada neste estudo entre os resultados de sorotipagem e da PCR na determinação das espécies de *Erysipelotrix* concordou parcialmente com o sugerido por Takahashi et al. (1992). Segundo estes autores, a espécie *E. tonsillarum* poderia ser distingüida de *E. rhusiopathiae* por meio da identificação sorológica. Dessa maneira, a espécie *E. rhusiopathiae* incluiria os sorotipos 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 e N, enquanto a espécie *E. tonsillarum* seria constituída pelos sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22 e 23. No entanto, outros autores sugerem que a sorotipagem pode ser um método questionável na identificação de isolados como *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* (CHOOROMONEY et al., 1994; AHRNE et al., 1995; TAKAHASHI et al., 2008).

Mais recentemente, Takahashi et al. (2008), fazendo uso da hibridização DNA-DNA (o critério habitual de separação de genoespécies bacterianas), sugeriram que a sorotipagem de *Erysipelothrix* não é uma ferramenta taxonômica absoluta ou essencial. Com isso, a importância da sorotipagem na identificação de espécies de *Erysipelothrix* deve ser considerada de menor grandeza frente a métodos moleculares como a PCR e, principalmente, a hibridização DNA-DNA. Portanto, a construção de um paralelo entre a identificação sorológica e a PCR deve ser realizada com certa parcimônia.

6.2.2 AFLP

Ainda não há descrição na literatura da técnica de AFLP para tipagem de *Erysipelothrix* spp.

O AFLP é um método baseado na detecção de ocorrências naturais de polimorfismo no DNA e é o resultado de mutações pontuais ou rearranjos (inserção, deleção, etc.) no DNA, que podem ser detectados pela presença ou ausência de bandas em padrões gerados pela digestão enzimática, ou pelos procedimentos de amplificação ou ambos (JANSSEN et al., 1996). Ou seja, a idéia principal é de que a variação do padrão de bandas gerados pela técnica é o reflexo direto da relação genética entre amostras bacterianas examinadas. E por isso, que esses padrões de banda podem ser considerados como digitais genômicas (*genomic fingerprints*), permitindo análise numérica para propósitos de caracterização e identificação (JANSSEN et al., 1996).

A quantidade de fragmentos gerados pelo AFLP necessária para assegurar significativa representatividade de um perfil de indivíduo permanece desconhecida. Este fato poderia conduzir a conclusões incorretas a respeito da identidade real de indivíduos dentro de um estudo, uma vez que um número insuficiente de fragmentos pode encobrir a existência de diferenças genéticas (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999). Utilizando os *primers* HI-A, HI-G e HI-T foram obtidos, respectivamente, dois a 13 fragmentos, cinco a 12 fragmentos e

seis a 17 fragmentos. Possivelmente, as amostras que apresentaram número muito reduzido de fragmentos, como é caso da amostra submetida a amplificação com o *primer* HI-A que exibiu na eletroforese apenas duas bandas, foram pouco ou não representativas de determinado perfil. No entanto, a média do número de fragmentos exibidos na eletroforese pelos três *primers* (HI-A, HI-G e HI-T) foi de, respectivamente, seis, nove e 11. O que certamente garantiu a representatividade da maioria dos perfis gerados pelo AFLP empregando os *primers* HI-G e HI-T.

Os resultados obtidos pelos três tipos de *primers* sugerem que a técnica do AFLP foi altamente discriminatória, uma vez que os números de perfis reconhecidos, a partir das 151 amostras testadas, pelos *primers* HI-A, HI-G e HI-T, foram, respectivamente, 68, 85 e 106. A detecção de diferentes perfis de AFLP em isolados de mesmo sorotipo, condição de saúde do suíno e ano ou local de isolamento, também sugere que o AFLP tenha alto poder discriminatório. Os índices discriminatórios obtidos com o emprego de cada um dos *primers* foram todos acima de 0,96.

Os perfis de susceptibilidade antimicrobiana (qualitativa e quantitativa) encontrados no estudo foram similares entre os isolados, o que compromete o caráter subtipificante deste tipo de técnica no gênero *Erysipelothrix*. Em função disso, os isolados de *Erysipelothrix* spp. foram alocados dentro do dendrograma de AFLP de forma arbitrária em relação aos perfis de susceptibilidade antimicrobiana.

O *primer* que aparentemente demonstrou-se mais adequado para a tipagem do *Erysipelothrix* spp. foi o HI-G. Além de apresentar índice discriminatório superior aos demais *primers* testados (0,98 contra 0,96 dos outros dois *primers*), esta foi a única reação em que as amostras da espécie *E. tonsillarum* foram reunidas em um mesmo grupo isolado. Apesar dos agrupamentos obtidos a partir da reação com o *primer* HI-G não terem seguido nenhum padrão epidemiológico fixo de formação, estes apresentaram agrupamentos mais evidentes de amostras correlatas, quando comparado aos agrupamentos formados a partir dos *primers* HI-A e HI-T.

Os isolados oriundos da mesma amostra foram alocados em um mesmo perfil eletroforético de AFLP, independente do tipo de *primer* empregado. No entanto, não há como afirmar que os animais sejam sempre infectados por populações clonais de *Erysipelothrix* spp., uma vez que as colheitas multicloniais procedidas no presente estudo envolveram um universo de apenas quatro amostras, além de relatos a respeito desse tipo de evento serem ausentes na literatura. Futuros estudos envolvendo AFLP e colheitas multicloniais a partir de animais portadores ou doentes possivelmente venham responder à esta dúvida.

Apesar das características fenotípicas tornarem as espécies *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* virtualmente indistinguíveis (exceto pela habilidade da segunda espécie de fermentar sacarose em detrimento da primeira) (REBOLI; FARRAR, 1992), existem metodologias moleculares, como a hibridização de DNA e a PCR, que podem discriminar uma espécie da outra (TAKAHASHI et al., 1992; TAKAHASHI et al., 1996; TAKESHI et al., 1999; SAWADA et al., 2006; YAMAZAKI, 2006; PAL; BENDER; OPRIESSNIG, 2010). De acordo com os resultados encontrados, a técnica de AFLP pode ser uma alternativa a outras técnicas moleculares na discriminação entre *E. rhusiopathiae* and *E. tonsillarum*, uma vez que a mesma agrupou cepas de *E. tonsillarum* em um grupo isolado no dendrograma. O AFLP é uma metodologia pouco trabalhosa, de fácil procedimento e particularmente aplicável à análise de grande número de isolados (MCLAUCHLIN et al., 2000). Contudo, este estudo envolveu um pequeno número de isolados da espécie *E. tonsillarum* (cinco) e um número maior de isolados possivelmente deva confirmar o uso do AFLP na diferenciação das duas principais espécies de *Erysipelothrix*.

6.2.3 PFGE

Assim como ocorreu em outros estudos (OKATANI et al., 2001; OPRIESSNIG et al., 2004; SAWADA et al., 2006; ERICKSSON et al., 2009), a

presente investigação demonstrou que a PFGE é um método adequado para análises genotípicas, visto a boa reprodutibilidade e o alto poder discriminatório (ID 0,98) alcançados.

Com exceção de um único isolado, todos os demais isolados testados foram passíveis de caracterização por meio da técnica. A inércia, frente à PFGE, da amostra em questão poderia ser consequência da ausência de sítios de restrição específicos para enzima *Sma* I no genoma. A degradação de DNA durante a eletroforese também poderia justificar a não tipabilidade de 100 % das amostras pela PFGE. Alguns autores relataram que a adição de 50 μ M de tio-uréia ao tampão do gel neutralizou os radicais reativos de tris, aumentando, em consequência, a tipabilidade da PFGE de *Pseudomonas aeruginosa* (RÖMLING; TÜMMLER, 2000), *Clostridium difficile* (CORKILL et al., 2000) e *Salmonella enterica* (MÜRMAN, 2008) para 100 %. Segundo alguns autores (CORKILL et al. 2000; RÖMLING; TÜMMLER, 2000), a degradação de DNA durante eletroforese não é uma característica freqüente na PFGE. Silbert et al. (2003), testando outras espécies bacterianas, concluíram que a tio-uréia não interfere na análise dos padrões não afetados pela degradação de DNA. Entretanto, o emprego da tio-uréia não foi realizado no presente estudo. Uma alternativa sugerida ao uso da tio-uréia, cujas propriedades cancerígenas ainda são discutidas, seria o tampão HEPE (16mM HEPES-NaOH, 16mM acetato de sódio e 0,8mM EDTA [pH 7,5]) (KOORT et al., 2002).

A quantidade de fragmentos gerados por perfil na PFGE variou entre quatro a 13 e, apesar de uma amostra ter apresentado apenas quatro fragmentos, a média de fragmentos observados por amostra foi de oito, o que possivelmente assegurou a representatividade da grande maioria dos perfis gerados. Tenover et al. (1995) propuseram como critério interpretativo dos fragmentos gerados pela técnica de PFGE a soma mínima de dez bandas distintas. Os mesmos autores relataram desconhecer que tipo de influência um número inferior de fragmentos detectados poderia exercer sobre a robustez e a habilidade discriminatória da técnica (TENNOVER et al., 1995). No entanto, Opriessnig et al. (2004) também trabalharam com oito a 14 bandas por perfil

eletroforético de *E. rhusiopathiae* e obtiveram informações epidemiológicas significativas a partir dos perfis encontrados.

Ainda que a PFGE não tenha perfilado os isolados testados conforme um padrão epidemiológico de agrupamento pré-estabelecido, esta reuniu, de forma relativamente boa, amostras de igual sorotipo dentro de um mesmo perfil ou perfis contíguos. Em estudo de caracterização de *E. rhusiopathiae* isolados de suínos, Opriessnig et al. (2004) observaram que os sorotipos encontrados entre isolados não seguiram um padrão específico de distribuição dentro do dendrograma de PFGE. Da mesma maneira, a caracterização de *E. rhusiopathiae* isolados a partir de diversas espécies animais, incluindo a suína, foi observada a inexistência de relação entre os sorotipos e os perfis de PFGE das amostras (ERIKSSON et al., 2009). Em ambos os estudos (OPRIESSNIG et al., 2004; ERICKSSON et al., 2009) a variedade de sorotipos envolvida foi pequena, o que pode ter conduzido os investigadores a concluir que a sorotipagem era pouco adequada a estudos envolvendo relações epidemiológicas. Possivelmente, os agrupamentos de sorotipos encontrados no dendrograma tenham sido evidenciados devido à maior variabilidade de sorotipos entre as amostras examinadas neste estudo.

Em alguns pontos do dendrograma verifica-se que isolados de *Erysipelothrix* spp. de perfil eletroforético idêntico apresentaram sorotipos diferentes, assim como amostras de mesmo sorotipo mostraram-se geneticamente diferentes pela PFGE. Alguns autores já relataram essas mesmas observações em estudos de caracterização de *Erysipelothrix* spp. empregando a mesma técnica (SAWADA et al., 2006; ERIKSSON et al., 2009). Eventos como estes, não asseguram o uso da sorotipagem como a ferramenta mais adequada para o estabelecimento de relações epidemiológicas de *Erysipelothrix* spp., ainda que no presente estudo tenham sido observados agrupamentos por tipo sorológico.

Opriessnig et al. (2004) empregaram a PFGE para comparar amostras recentes e históricas de *E. rhusiopathiae* isoladas de suínos, mas devido à disponibilidade de poucos isolados históricos, conclusões limitadas puderam ser extraídas em termos de alterações de genotipo entre os isolados. O número de

amostras históricas utilizadas no presente estudo foi 59 (39,1 %) e o que se observou foi a ausência de agrupamentos quanto ao ano de isolamento. Esse achado refuta especulações a respeito do surgimento novas cepas circulando na suinocultura nacional e que estas sejam responsáveis pelo ressurgimento de surtos de erisipela. Eamens, Forbes e Djordjevic (2006) caracterizando isolados históricos e recentes de *E. rhusiopathiae* por meio de ribotipagem com a endonuclease *Rsa* I, observaram marcante heterogenicidade entre os dois grupos, além do surgimento de uma variedade de novos ou diferentes perfis de DNA. A PFGE não é descrita como uma ferramenta primordial para estudos evolutivos, porém, eventualmente, em determinadas espécies bacterianas é possível observar, por meio de seu emprego, alterações genotípicas ocorridas ao longo do tempo. Como demonstrado neste estudo e por outros pesquisadores (OPRIESSNIG et al., 2004), o uso da PFGE não fornece informações evolutivas a respeito de *Erysipelothrix* spp., portanto, para este fim, outras técnica devem ser aplicadas.

A exemplo do que ocorreu no AFLP, os isolados de *Erysipelothrix* spp. foram distribuídos pelo dendrograma da PFGE de forma arbitrária em relação aos perfis de susceptibilidade antimicrobiana, uma vez que os resultados obtidos nos testes de disco-difusão e microdiluição pelas amostras examinadas foram, no geral, bastante similares. Opriessnig et al. (2004) e Eriksson et al. (2009) relataram o mesmo tipo de observação.

A PFGE, assim como o AFLP, não discriminou isolados oriundos da mesma amostra, alocando-os em um mesmo perfil. No entanto, não há como afirmar que os animais sejam sempre infectados por populações de *Erysipelothrix* spp. geneticamente idênticas, uma vez que as colheitas multicoloniais procedidas no presente estudo envolveram um universo de apenas quatro amostras, além de relatos a respeito desse tipo de evento serem ausentes na literatura. Futuros estudos envolvendo PFGE e colheitas multicoloniais a partir de animais infectados por *Erysipelothrix* spp. possivelmente responderão à esta dúvida.

O poder discriminatório do AFLP, empregando tanto o *primer* HI-A como o HI-T, foi inferior ao obtido pela PFGE (0,96 contra 0,98 da última técnica). Já o AFLP, cujo o *primer* utilizado foi o HI-G, apresentou um poder de discriminação

entre as amostras testadas idêntico ao da PFGE (0,98). Apesar deste fato, a PFGE ainda foi considerada a melhor escolha para genotipagem de *Erysipelothrix* spp., visto que PFGE agrupou, ainda que de forma não absoluta, os isolados conforme os sorotipos e segregou as cepas de *E. tonsillarum* segundo origens geográficas de isolamento.

Ambas as técnicas, AFLP e PFGE, não agruparam os isolados de *Erysipelothrix* spp. exatamente de acordo com a origem e data de isolamento, bem como estado de saúde do animal, como seria esperado. Este fato releva que os dois métodos não são capazes de perfilar este gênero bacteriano segundo um padrão epidemiológico de agrupamento ou ainda, que a variabilidade genética desses microorganismos é bastante ampla. Shen, Bender e Opriessnig (2010) relataram que *Erysipelothrix* spp. apresenta grande variabilidade genética, sorológica, bioquímica e antigênica entre as cepas.

Não obstante, as duas metodologias demonstraram interessantes habilidades a serem exploradas, seja discriminando *Erysipelothrix* spp. conforme espécie (AFLP) ou conforme sorotipo (PFGE).

¹ SHEN, H. G.; BENDER, J. S.; OPRIESSNIG, T. Identification of surface protective antigen (*spa*) types in *Erysipelothrix* reference strains and diagnostic samples by *spa* multiplex real-time and conventional PCR assays. **Journal of Applied Microbiology**. *In press*. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/123421812/PDFSTART>> Acesso em 10 mai. 2010.

7 CONCLUSÕES

✓ Foram encontrados 13 sorotipos diferentes (1b, 2b, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 17, 19, 21 e 24) entre os isolados nacionais e o sorotipo 2b foi o mais prevalente.

✓ Os perfis de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados, tanto qualitativos quanto o quantitativos, foram, de modo geral, similares.

✓ Os isolados recentes foram menos sensíveis a determinados antimicrobianos (danofloxacina, enrofloxacina, tetraciclina e tilosina) que os históricos.

✓ A partir dos critérios de interpretação adotados neste estudo, os resultados da disco-difusão e da microdiluição foram concordantes.

✓ A maioria dos isolados (146) pertencia a espécie *E. rhusiopathiae*, contra cinco representantes da espécie *E. tonsillarum* e nenhum dos isolados da segunda espécie é oriundo de caso septicêmico.

✓ Entre os *primers* testados no AFLP, o HI-G foi o mais adequado à tipagem molecular de *Erysipelothrix* spp.

✓ Apesar do AFLP ter se mostrado uma técnica de boa reprodutibilidade e de alto poder discriminatório, os agrupamentos formados a partir da mesma não obedeceram a nenhum padrão epidemiológico pré estabelecido.

✓ O AFLP pode ser um bom método molecular de discriminação entre as espécies *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum*.

✓ A PFGE apresentou alto poder discriminatório, sendo, portanto, uma boa escolha para caracterização de *Erysipelothrix* spp.

✓ A despeito da PFGE ter agrupado de forma não absoluta isolados de mesmo tipo sorológico, o perfilamento dos isolados não seguiu nenhum padrão epidemiológico pré estabelecido.

✓ A PFGE não foi capaz de discriminar entre isolados recentes e históricos de *Erysipelothrix* spp.

✓ Apesar AFLP (HI-G) e da PFGE apresentarem o mesmo índice discriminatório, a PFGE apresentou melhor relação com os dados obtidos na sorotipagem que o AFLP (HI-G) e possibilitou a distinção geográfica dos isolados da espécie *E. tonsillarum* sorotipo 7.

REFERÊNCIAS¹

ALBERTON, G. C. BANDARRA, E. P.; PIFFER, I.; MORES, M. A. Z.; PEREIRA, M. A. C.; YAMAMOTO, M. Exame anatomopatológico, microbiológico, citológico e físico-químico das articulações de suínos artríticos no matadouro. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 81-91, 2003.

ALBUQUERQUE, J. S. Isolamento e identificação do *Erysipelothrix rhusiopathiae*, em casos de erisipela suína no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Porto Alegre, v. 2, p. 57-59, 1957.

AHRNÉ, S.; STENSTROM, I.-M.; JENSEN, N. E.; PETTERSSONY, B.; UHLEN, M.; MOLIN, G. Classification of *Erysipelothrix* strains on the basis of restriction fragment length polymorphisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 382-385, 1995.

BARCELLOS, D. E. S. N. Comparação entre métodos de identificação de *Erysipelothrix rhusiopathiae* em vísceras de suínos. **Revista de Microbiologia**, v. 12, n. 9, p. 134-137, 1981.

BARCELLOS, D. E. S. N.; OLIVEIRA, S. J.; BOROWSKI, S. M. Classificação sorológica de amostras de *Erysipelothrix rhusiopathiae* isoladas de suínos no estado do rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 15, n. 2, p. 45-47, 1984.

BERNARDES, D. T. V.; GALDINO, V. M. C. A.; RISTOW, L. E.; KAMIMURA, R.; ARANTES, V. M. Detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Erysipelothrix rhusiopathiae* em suínos – comparação entre imunofluorescência indireta e ELISA. In: 13º Congresso ABRAVES, Florianópolis, Santa Catarina, 2007, **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, CR-ROM.

BERSANO, J. G.; GENOVEZ, M. E.; QUAGLIUOLO, R. G. Ocorrência de erisipela suína no estado de São Paulo com isolamento de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 48, n. 6, p. 141-146, 1982.

BIKSI, I.; TAKÁCS, N.; VETÉSI, F.; FODOR, L.; SZENCI, O.; FENYO, E. Association between endometritis and urocystitis in culled sows. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 50, n. 4; p. 413-423, 2002.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BLASCO-NAVALPOTRO, M. A.; CAL, I. W-D., GONZALEZ-LORENZO, O.; CASTAÑO-PARDO, D. Insuficiencia aórtica grave secundaria a endocarditis por *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 3, p. 192-193, 2009.

BOERNER, L.; NEVIS, K. R.; HINCKLEY, L. S.; WEBER, E. S.; FRASCA Jr, S. *Erysipelothrix* septicemia in a little blue penguin (*Eudyptula minor*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 145-149, 2004.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 459-453, 1990.

BROOKE, C. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 789-799, 1999.

BURUCOA, C.; LHOMME, V.; FAUCHERE, J. L. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4071-4080, 1999.

CASTRO, A. F. P.; ROSA, C. A. S.; TROISE, C.; GISSONI, R. H. Isolamento de *Erysipelothrix rhusiopathiae* de suínos aparentemente normais abatidos em matadouro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 30, p. 115-118, 1963.

CASTRO, A. F. P.; TRABULSI, L. R.; CAMPEDELLI, F. O.; TROISE, C. Characteristics of strains of *E. rhusiopathiae* isolated in Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 3, n. 1, p. 11-24, jan./mar. 1972.

CHANG, N.; CHUI, L. A. standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 31, p. 275-279, 1998.

CHIRICO, J.; ERIKSSON, H.; FOSSUM, O.; JANSSON, D. The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potencial vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 232-234, 2003.

CHOOROMONEY, K. N.; HAMPSON, D. J.; EAMENS, G. J.; TURNER, M. J. Analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Erysipelothrix tonsillarum* by Multilocus Enzyme Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 371-376, 1994.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005, Document M100-S15.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008, Document M31-A3.

CORKILL, J. E.; GRAHAM, R.; HART, C. A.; STUBBS, S. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2791-2972, 2000.

CROCO, A. Primeiros casos de "Erisipela" em suínos autoctones no Brasil. **Arquivos do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desiderio Finamor**, v. 2, p. 70-76, 1957.

DE ROSA, D. C.; VEENHUIZEN, M. F.; BADE, D. J.; SHRYOCK, T. R. In vitro susceptibility of porcine respiratory pathogens to tilmicosin. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 541-546, 2000.

DINTER, Z.; DIDERHOLM, H.; ROCKBORN, G. Complement-dependent hemolysis following hemmagglutination by *E. rhusiopathiae*. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Reihe A**, v. 236, p. 533-535, 1976.

DUNBAR, S. A.; CLARRIDGE, J. E. Potential errors in recognition of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, v. 38, n. 3, p. 1302-1304, 2000.

EAMENS, G. J.; FORBES, W. A.; DJORDJEVIC, S. P. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 329-338, 2006.

ERIKSEN, K.; FOSSUM, K.; GAMLEM, H.; GRONDALEN, J.; KUCSERA, G.; ULSTEIN, T. Endocarditis in two dogs caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Small Animal Practice.**, v. 28, p. 117-123, 1987.

ERIKSSON, H.; JANSSON, D. S.; JOHANSSON, K. E.; BAVERUD, V.; CHIRICO, J.; ASPÁN, A. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from poultry, pigs, emus, the poultry red mite and other animals. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n.1-2, p. 98-104, 2009.

EWALD, F. W. The genus *Erysipelothrix*. In: STARR, M. P.; STOLP, H.; TRUPER, H. G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H. G. (Ed.). The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. New York: Springer-Verlag, 1981., p. 1688-1700.

FEASI, M.; BACIGALUPO, L.; CAPPATO, S.; PONTALI, E.; USIGLIO, D.; ROLLANDI, G. A.; FILAURO, M.; MORI, M.; CASSOLA, G. *Erysipelothrix rhusiopathiae* intra-abdominal abscess. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 81-83, 2010.

FEIST, H. Serologische, chemische und immunochemische Untersuchungen an Rotlaufbakterien. XII. Das Murein der Rotlaufbakterien. **Archivs für Experimentelle Veterinaermedizin**, v. 26, p. 825-834, 1972.

FIDALGO, S. G.; LONGBOTTOM, C. J.; RILEY, T. V. Susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to antimicrobial agents and home disinfectants. **Pathology**, v. 34, p. 462-465, 2002.

FLORISTÁN, U.; FELTES, R. A.; GÓMEZ, A.; VIDAURRÁZAGA, C. Lesión eritematoviolácea en la pierna de un investigador en contacto con cerdos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.27, n.6, p.365-366, 2009.

FOSSUM, O.; JANSSON, D. S.; ETTERLIN, P. E.; VAGSHOLM, I. Causes of mortality in laying hens in different housing systems in 2001 to 2004. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 51, n. 3, 2009. Disponível em: < <http://www.actavetscand.com/content/pdf/1751-0147-51-3.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2009.

FRANZ, B.; DAVIES, M. E.; HORNER, A. Localization of viable bacteria and bacterial antigens in arthritic joints of *Erysipelothrix rhusiopathiae*-infected pigs. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 12, p. 137-142, 1995.

FRIENDSHIP, C. R.; BILKEY, G. Concurrent swine erysipelas and *Clostridium novyi* infections associated with sow mortality in outdoor sows in Kenya. **Veterinary Journal**, v. 173, p. 694-696, 2007.

FTHENAKIS, G. C.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; LEONTIDES, L.; TZORA, A. Abortion in ewes associated with *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 183-188, 2006.

FURIATTI, R. Manual Ilustrado de Inspeção Sanitária de Suínos. São Paulo. Disponível em: <<http://www.mgar.com.br/suino/>>. Acesso em: 05 jun. 2009.

GALÁN, J. E.; TIMONEY, J. F. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 3116-3121, 1990.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, p. 270-285, 2008.

GYLES, C. L. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. (Eds.). **Pathogenesis of bacterial infections in Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1993. Chap. 7., p.80-85.

HARRINGTON JR., R.; HULSE, D. C. Comparison of two plating media for the isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from enrichment broth culture. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 141-142, 1971.

HARRINGTON JR., R.; WOOD, R. L.; HULSE, D. C. Comparison of fluorescent antibody technique and cultural method for the detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in primary broth culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 461-462, 1974.

HASSANEIN, R.; SAWADA, T.; KATAOKA, Y.; GADALLAH, A.; SUZUKY, Y. Molecular identification of *Erysipelothrix* isolates from the tonsils of healthy cattle by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 239-245, 2003.

HIPÓLITO, O.; FREITAS, M. G. 1961. Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos. 2ª ed. São Paulo, Melhoramentos.

HOFFMANN, C. W.; BILKEI, G. Case study: chronic erysipelas of the sow – a subclinical manifestation of reproductive problems. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, p. 119-120, 2002.

HUERTA, A. O. F.; MONTAÑO, M. B. Erysipelas swine disease in naïve farm in Sonora state of Mexico. In: 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 22-26 jun. 2008, **Proceedings...** Durban, South Africa, CR-ROM.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

INGEBRITSON, A. L.; ROTH, J. A.; HAUER, P. J. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. **Vaccine**, v. 28, p. 2490-2496, 2010.

IMADA, Y.; GOJI, N.; ISHIKAWA, H.; KISHIMA, M.; SEKIZAKI, T. 1999. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4376-4382, 1999.

IMADA, Y.; TAKASE, A.; KIKUMA, R.; IWAMARU, Y.; AKACHI, S.; HAYAKAWA, Y. Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erisipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2121-2126, 2004.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZEBEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881- 1893, 1996.

JONES, D. 1986. Genus *Erysipelothrix* Rosenbach 367^{al}. In: SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. (ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2., p. 1245-1249.

JONES, R. N.; PFALLER, M. A.; RHOMBERG, P. R.; WALTER, D. H. Tiamulin activity against fastidious and nonfastidious veterinary and human bacterial isolates: initial development of *in vitro* susceptibility test methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 461-465, 2002.

KARLSON, A. G.; MERCHANT, I. A. The cultural and biochemic properties of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 2, p. 5-10, 1941.

KEMENES, F.; SZÉKY, A. Contribution to the diagnosis of infectious swine abortion. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 18, p. 170-176, 1971.

KIM, S. R.; KWON, M. J.; LEE, J. H.; LEE, N. Y. Chronic meningitis caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1405-1406, 2007.

KOORT, J. M. K.; LUKINMAA, S.; RANTALA, M.; UNKILA, E.; SIITONEN, A. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3497-3498, 2002.

KUCSERA, G. Proposal for standardization of the designations used for serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Migula) Buchanan. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, n. 2, p. 184-188, 1973.

KUCSERA, G. Serological typing of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains and the epizootiological significance of the typing. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 27, p. 19-28, 1979.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.

LEHR, C.; ERSKINE, J.; DRAKE, C.; BAILEY, D.; JAYAPPA, H.; WASMOEN, T. Evaluation of duration of immunity for *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In: Allen D. Leman Swine Conference, Saint Paul, Minnesota, 18-21 Sep. 2004, **Supplement...** Saint Paul: University of Minnesota, CR-ROM.

LONIGRO, J. G.; LAREGINA, M. C.. *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from an opossum (*Didelphis virginiana*) with septicemia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 3, p. 557-559, 1988.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. **Revised road map to the phylum Firmicutes**. 2009., v. 3, 32 p. Disponível em:

□ http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf □. Acesso em: 08 ago. 2009.

MAKINO, S.; OKADA, Y.; MARUYAMA, T.; ISHIKAWA, K.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, M.; EZAKIAND, T.; MORITA, H. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 1526-1531, 1994.

MAKINO, S.; YAMAMOTO, K.; MURAKAMI, S.; SHIRAHATA, T.; UEMURA, K.; SAWADA, T.; WAKAMOTO, H.; MORITA, H. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, Spa A, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 25, n. 2, p. 101-109, 1998.

MCLAUCHLIN, J.; JONES, D. 1998, *Erysipelothrix* and *Listeria*. Topley & Wilson's - Microbiology and Microbial Infections. V. 2. Systematic Bacteriology Volume. 9th edition, eds. Collier, L.; Balows, A.; Sussman, M., Arnold, London, Wiley Blackwell, 1998. V. 2, Chap. 30, p. 683-708.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p.21-28, 2000.

MORENO, A. M.; COUTINHO, T. A.; PAIXÃO, R.; GOBBI, D. D.; NOVITA, S. M. T.; FERREIRA, T. S. P. Detecção de *Erysipelothrix rhusiopathiae* em casos de mumificação fetal, natimortalidade e abortamento. In: CONGRESSO DA ABRAVES 13., 2007, Florianópolis, Santa Catarina. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. CD-ROM.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

MÜRMANN, L. **Avaliação de risco de infecção por *Salmonella* sp. em consumidores de lingüiça fresca de carne suína em Porto Alegre, RS.** 2008. 128 p. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/12927/000637149.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 30 nov. 2008.

NAGAI, S.; TO, H.; KANDA, A. Differentiaton of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains by nucleotide sequence analysis of hypervariable region in the *spa* gene: discrimination of a live vaccine strains from field isolates. **Journal of Diagnostic Investigation**, v. 20, n.3, p. 336-342, 2008.

NAKATO, H.; SHINOMIYA, K.; MIKAWA, H. Possible role of neuraminidase in the pathogenesis of arthritis and thrombocytopenia induced in rats by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Pathology, Research and Practice**, v. 181, p. 311–319, 1986a

NAKATO, H.; SHINOMIYA, K.; MIKAWA, H. Effect of C3 depletion on the genesis of thrombocytopenia induced in rats by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 37, p. 18-24, 1986b.

NAKAZAWA, H.; HAYASHIDANI, H.; HIGASHI, J.; KANEKO, K.; TAKAHASHI, T.; OGAWA, M. Occurrence of *Erysiplethrix* spp. in chicken meat parts from a processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1207-1209, 1998.

NEUMANN, E. J.; BONISTALLI, K. N. Effect of blood sample handling post-collection on *Erysipelothrix rhusiopathiae* antibody titres. **Veterinary Journal**, v. 180, p. 325-329, 2009.

NEUMANN, E. J.; GRINBERG, A.; BONISTALLI, K. N.; MACK, H. J.; LEHRBACH, P. R.; GIBSON, N. Safety of a live attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine for swine. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 297-303, 2009.

NOGUCHI, N.; SASATSU, M.; TAKAHASHI, T.; OHMAE, K.; TERAKADO, N.; KONO, M. Detection of plasmid DNA in *Erysipelothrix rhusiopathiae* from pigs with chronic swine erysipelas. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 55, p. 349-350, 1993.

NORRUNG, V.; MOLIN, G. A new serotype of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pig slurry. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 39, p. 137-138, 1991.

NOVOTNY, L.; DVORSKA, L.; LORENKOVA, A.; BERAN, V.; PAVLIK, I. Fish: a potencial source of bacteria pathogens for human beings. **Veterinay Medicine**, v. 49, p. 343-358, 2004.

OKATANI, A. T.; HAYASHIDANI, H.; TAKAHASHI, T.; TANIGUCHI, T.; OGAWA, M.; KANEKO, K-I. Randomly amplified polymorphic DNA análisis of *Erysipelothrix* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4332-4336, 2000.

OKATANI, A. T.; ISHIKAWA, M.; YOSHIDA, S.; SEKIGUCHI, M.; TANNO, K.; OGAWA, M.; HORIKITA, T.; HORISAKA, T.; TANIGUCHI, T.; KATO, Y.; HAYASHIDANI, H. Automated ribotyping, a rapid typing meted for analysis of *Erysipelothrix* spp. strains. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, n.6, p.729-733, 2004.

OKATANI, A. T.; UTO, T.; TANIGUCHI, T.; HORISAKA, T.; HORIKITA, T.; KANEKO, K-I.; HAYASHIDANI, H. Pulsed-field gel electrophoresis in differentiation of *Erysipelothrix* species strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, 2001.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typed of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, J. S.; RODRIGUES, P. R. C.; LUNGE, V.; SILVA JUNIOR, V.B. Erisipela suína: isolamento de *Erysipelothrix* spp de amígdalas de animais de abate e realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 1, p. 5-10, 2005.

OLIVEIRA, J. S.; RODRIGUES, P. R. C.; LUNGE, V. R.; OKATANI, A. Monitoria da erisipela suína por análises bacteriológicas e moleculares em suínos de abate de granjas do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 689-692, 2009.

OPRIESSNIG, T.; HOFFMAN, L. J.; HARRIS, D. L.; GAUL, S. B.; HALBUR, P.G. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 101-107, 2004.

OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reaction in gels. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 26, n.4, p. 507-515, 1949.

OVERSTREET, R. M. Solving parasite-related problems in cultured crustacean. **International Journal of Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 309-318, 1987.

PACKER, R. A. The use of sodium azide and crystal violet in a selective medium for *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Streptococci*. **Journal of Bacteriology**, v. 46, p. 343-349, 1943.

PAL, N.; BENDER, J. S.; OPRIESSNIG, T. Rapid detection and differentiation of *Erysipelothrix* spp. by a novel multiplex real-time PCR assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 1083-1093, 2010. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122603870/PDFSTART> Acesso em: 18 jan. 2010.

PEREIRA, M. A. C.; YAMAMOTO, M. A.; ALBERTON, G. C.; BANDARRA, E. P. Estudo retrospectivo sobre condenação de carcaças de suínos por artrite. In: CONGRESSO DA ABRAVES 9., 1999, Belo Horizonte, Minas Gerais, **Anais...** Belo Horizonte: ABRAVES, 1999. p. 255-256.

PESCADOR, C. A.; OLIVEIRA, E. C.; GOMES, M. J. P.; BANDARRA, P. M.; LEAL, J. S.; PEDROSO, P. M. O.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Lesões de pele causadas por *Erysipelothrix rhusiopathiae* em um feto suíno abortado. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1475-1479, 2007.

PEZERICO, G. B. **Isolamento de *Erysipelothrix* spp. de tonsilas de suínos em frigoríficos**. 2004. Dissertação de Mestrado - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004. Disponível em: <ftp://ftp.bbt.ufv.br/teses/medicina%20veterinaria/2004/183041f.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2008.

RANDOLPH, J. J. Free-marginal multirater Kappa (multirater κ_{free}): an alternative to Fleiss' fixed marginal multirater Kappa. In: THE JOENSUU LEARNING AND INSTRUCTION SYMPOSIUM 2005, Joensuu, Finland, 2005. Disponível em: http://www.eric.ed.gov/ERICDocs/data/ericdocs2sql/content_storage_01/0000019b/80/1b/c3/27.pdf . Acesso em: 03 mai. 2010.

RANDOLPH, J. J. **Online Kappa Calculator**. 2008. Disponível em: <http://justus.randolph.name/kappa> Acesso em: 03 mai. 2010.

REBOLI, A.; FARRAR, W. E. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an occupational pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 4, p. 354-359, 1989.

REBOLI, A. C.; FARRAR, W. E. The genus *Erysipelothrix*. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. (Ed.). **The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, isolation, Identification, Applications**. 2nd ed. Springer, 1992. New York: p.1629-1642.

REIS, R.; RESENDE, M.; NASCIMENTO, E. F. Doenças do suíno no Estado de Minas Gerais. III – ocorrência e controle de erisipela. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 29, n. 2, p. 203-210, 1977.

RITZMANN, M.; HEINRITZI, K. Detection of erysipelas antibodies in vaccinated pigs in a field trial and in a challenge test. In: IPVS CONGRESS 16., 2000, Melbourne, Australia. **Proceedings...** Melbourne, Australia, 2000. p.189.

RIVERA, E.; DAGGFELDT, A.; HU, S. Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Veterinary, Immunology and Immunopathology**, v.91, p.19-27, 2003.

ROBERTSON, D.C.; MCCULLOUGH, W.G. Glucose catabolism of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 6, p. 2112-2116, 1968.

RÖMLING, U.; TÜMMLER, B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 464-465, 2000.

ROMNEY, M.; CHEUNG, S.; MONTESSORI, V. *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis and presumed osteomyelitis. **Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 254-256, 2001.

RONNE, H.; SZANCER, J. *In vitro* susceptibility of danish field isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemotherapeutics in swine dysentery (SD) therapy. In: IPVS CONGRESS 11., 1990, Lausanne, Switzerland. **Proceedings...** Lausanne, Switzerland, 1990. p. 126.

SAUNDERS, C. N. The young pig. Abortions, stillbirths and congenital abnormalities. **Veterinary Record**, v. 80, XV-XVI, 1967.

SAWADA, T.; HASSANEIN, R.; TAKAHASHI, E.; ANDO, S.; ENTOMACK, B.; KATAOKA, Y.; TAKAGI, M.; YAMAMOTO, K.; KOJIMA, A. Pathogenic and genetic characterization of acriflavine resistant *Erysipelothrix* isolates from arthritic pigs. **Journal of Veterinary Epidemiology**, v. 10, n. 1, p. 21-28, 2006.

SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E.; CARDOSO, M. V.; BERSANO, J. G.; SOUZA, C. A. I.; TORRES, A. P.; CARRASCO, S. Causas bacterianas de abortamento em rebanhos de suínos do estado de São Paulo, Brasil, Período de 1985 a 1998. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, n. 1, p. 95-99, 1999.

SCHULTZ, L. C.; DROMMNER, W.; SEIDLER, D.; ERHARD, H.; LEIMBECK, R.; WEISS, R. Experimenteller Rotlauf bei verschiedenen Spezies als Modell einer systemischen Bindegewebskrankheit. II. Chronische Phase mit besonderer Berücksichtigung der polyarthritis. **Beiträge Pathologie**, v. 154, p.27-51, 1975.

SCHULTZ, L. C.; DROMMNER, W.; SEIDLER, D.; ERHARD, H.; LEIMBECK, R.; WEISS, R. Pathogenetische Bedeutung von *Erysipelothrix rhusiopathiae* in der akuten und chronischen Verlaufsform der Rotlaufarthritis. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 154, p. 1-26, 1977.

SEAHORN, T. L.; BRUMBAUGH, G. W.; CARTER, G. K.; WOOD, R. L. *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteremia in a horse. **Cornell Veterinarian**, v. 79, n. 2, p. 151-156, Apr. 1989.

SEIDLER, D.; TRAUTWEIN, G.; BOHM, K. H. Nachweis von *Erysipelothrix insidiosa* mit Fluoreszieren de Antokörpern. **Zentrablatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 18, p. 280-292, 1971.

SHIMOJI, Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 965-972, 2000.

SHIMOJI, Y. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Iowa State University Press, 2004. Chap. 10, p.111-116.

SHIMOJI, Y.; MORI, Y.; FISCHETTI, V. A. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the região responsible for protectiva immunity. **Infection and Immunity**, v.67, p.1646-1651, 1999.

SHIMOJI, Y.; MORI, Y.; HYAKUTAKE, K.; SEKIZAKI, T.; YOKOMIZO, Y. Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 86-89, 1998.

SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y.; MORI, Y. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 5, p. 1789-1793, 1996.

SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y.; SEKIZAKI, T.; MORI, Y.; KUBO, M. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2806-2810, 1994.

SILBERT, S.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M. A. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, p. 619-621, 2003.

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SMITH, P.; HINEY, M. P.; SAMUELSEN, O. B. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 273-313, 1994.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; CARVALHO, L. F. O. S.; OLIVEIRA, S. J.; MORENO, A. M.; ROEHE, P. M. Rinite Atrófica. In: _____. **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 1999. p.374-378.

STRUELENS, M. J.; RYCK, R.; DEPLANO, A. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing. In: DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. J.; STRUELENS, M. J. (Ed.). **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**. London. Elsevier, 2001. p. 159-176.

TAKAHASHI, T.; FUJISAWA, T.; BENNO, Y.; TAMURA, Y.; SAWADA, T.; SUZUKI, S.; MURAMATSU, M.; MITSUOKA, T. *Erysipelothrix tonsillarum* sp. nov.

isolated from tonsils of apparently healthy pigs. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 166-168, 1987a.

TAKAHASHI, T.; FUJISAWA, T.; TAMURA, Y.; SUZUKI, S.; MURAMATSU, M.; SAWADA, T.; BENNO, Y.; MITSUOKA, T. DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 469-473, 1992.

TAKAHASHI, T.; FUJISAWA, T.; UMEMO, A.; KOZASA, T.; YAMAMOTO, K.; SAWADA, T. A taxonomic study on *Erysipelothrix* by DNA-DNA hybridization experiments with numerous strains isolated from extensive origins. **Microbiology and Immunology**, v. 52, p. 469-478, 2008.

TAKAHASHI, T.; FUJISAWA, T.; YAMAMOTO, K.; KIJIMA, M.; TAKAHASHI, I. Taxonomic evidence that serovar 7 of *Erysipelothrix* strains isolated from dogs with endocarditis are *Erysipelothrix tonsillarum*. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 47, p. 311-313, 2000.

TAKAHASHI, T.; NAGAMINE, N.; KIJIMA, M.; SUZUKI, S.; TAKAGI, M.; TAMURA, Y.; NAKAMURA, M.; MURAMATSU, M.; SAWADA, T. Serovars of *Erysipelothrix* strains isolated from pigs affected with erysipelas in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, p. 587-589, 1996.

TAKAHASHI, T.; SAWADA, T.; MURAMATSU, M.; OHMAE, K.; TERAKADO, N. Antibiotic resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from pigs with acute septicemic erysipelas. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 46, n. 6, p. 921-923, 1984b.

TAKAHASHI, T.; SAWADA, T.; MURAMATSU, M.; TAMURA, Y.; FUJISAWA, T.; BENNO, Y.; MITSUOKA, T. Serotype, antimicrobial susceptibility and pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 536-539, 1987b.

TAKAHASHI, T.; SAWADA, T.; OHMAE, K.; TERAKADO, N.; MURAMATSU, M.; SETO, K.; MARUYAMA, T.; KANZAKI, M. Antibiotic resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with chronic swine erysipelas. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 25, n. 3, p. 385-386, 1984a

TAKAHASHI, T.; ZARKASIE, K.; MARIANA, S.; SUMADI, OGATA, M. Serological and pathogenic characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of slaughter pigs in Indonesia. **Veterinary Microbiology**, v. 21, p. 165-175, 1989.

TAKESHI, K.; MAKINO, S.; IKEDA, T.; TAKADA, N.; NAKASHIRO, A.; NAKANISHI, K.; OGUMA, K.; KATOH, Y.; SUNAGAWA, H.; OHYAMA, T. Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4093-4098, 1999.

TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.; ZARKASIE, K.; NAKAMURA, M.; YOSHIMURA, H. Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Erysipelothrix tonsillarum* by Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Eletrophoresis of Cell Proteins. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 1, p. 111-114, Jan. 1993.

TENNOVER, F. C.; ARBEIT, R.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

THONG, K. L.; NGEOW, Y. F.; ALTWEGG, M.; NAVARATNAM, P.; PANG, T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.1070-1074, 1995.

TIMONEY, J. The inactivation of *E. rhusiopathiae* in macrophages from normal and immune mice. **Research in Veterinary Science**, v. 10, p. 301-302, 1969.

TIMONEY, J. The inactivation of *E. rhusiopathiae* in pig buffy-coat leukocytes. **Research in Veterinary Science**, v. 11, p. 189-190, 1970.

TO, H.; NAGAI, S. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 7, p. 813-820, 2007.

UMANA, E. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an unusual pathogen of infective endocarditis. **International Journal of Cardiology**, v. 88, p. 297-299, 2003.

VAN DER BEEK, M. D. d.; MACHIELS, M. D. L.; VAN LOON, M. D. R.; COPPENS, M. D. G. *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteremia. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 27, n. 9, p. 72-73, 2005.

VENDITTI, M.; GELFUSA, V.; TARASI, A.; BRANDIMARTE, C.; SERRA, P. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 2038-2040, 1990.

VERBARG, S.; RHEIMS, H.; EMUS, S.; FRUHLING, A.; KROPPESTED, R. H.; STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth and description of Erysipelotrichaceae fam. nov. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 221-225, 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HOMES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, Q.; FIDALGO, S.; CHANG, B. J.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. The detection and recovery of *Erysipelothrix* spp. in meat and abattoir samples in western Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 844-850, 2002.

WANG, Q.; CHANG, B. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 405-417, 2009. Disponível em: <
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TD6-4WYDN0J-13-1&_cdi=5190&_user=5674931&_orig=search&_coverDate=01%2F27%2F2010&_sk=998599996&_view=c&_wchp=dGLbVzW-zSkWA&md5=ab7a6388c7f1b945624287e37d82ac91&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2010.

WANYOIKE, S. K.; BILKEY, G. Concurrent pathological and bacteriologic findings in the urogenital organs and mammary glands of sows culled because of chronic vulvovaginal discharge and swine urogenital disease (SUGD): a case report. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 131, p. 686-691, 2006.

WONG, R. C.; KONG, K. O.; LIN, R. V.; BARKHAM, T. Chronic monoarthritis of the knee in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 12, p. 324-326, 2003.

WOOD, R. L. Erysipelas. In: STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Ed.). **Diseases of Swine**. 8th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999. p. 419-430.

WOOD, R. L. A selective liquid medium utilizing antibiotics for isolation of *Erysipelothrix insidiosa*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 1303-1308, 1965.

WOOD, R. L.; HARRINGTON, R. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swine pens in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, p. 1833-1840, 1978.

YAMAZAKI, Y. A multiplex polymerase chain reaction for discriminating *Erysipelothrix rhusiopathiae* from *Erysipelothrix tonsillarum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 384-387, 2006.

YAMAMOTO, K.; KIJIMA, M.; TAKAHASHI, T.; YOSHIMURA, H.; TANI, O.; KOJYOU, T.; YAMAWAKI, Y.; TANIMOTO, T. Serovar, pathogenicity and antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from farmed wild boars (*Sus scrofa*) affected with septicemic erysipelas in Japan. **Research in Veterinary Science**, v. 67, p. 301-303, 1999.

YAMAMOTO, K.; KIJIMA, M.; YOSHIMURA, H.; TAKAHASHI, T. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan, 1988-1998. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 48, n. 2, p. 115-126, 2001.

YOKOMIZO, Y.; ISAYAMA, Y. Antibody activities of IgM and IgG fractions from rabbit anti-*Erysipelothrix rhusiopathiae* sera. **Research in Veterinary Science**, v. 13, p. 294-296, 1972.

APÊNDICES

Apêndice A

DETECÇÃO DE *Erysipelothrix rhusiopathiae* EM CASOS DE MUMIFICAÇÃO FETAL, NATIMORTALIDADE E ABORTAMENTO

Resumo expandido apresentado no **13º Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES)**, Florianópolis-Santa Catarina, 2007.

DETECÇÃO DE *Erysipelothrix rhusiopathiae* EM CASOS DE MUMIFICAÇÃO FETAL, NATIMORTALIDADE E ABORTAMENTO

Moreno, A.M.¹; Coutinho, T.A.^{1*}; Paixão, R.¹; Gobi, D.D.¹; Novita, S.M.¹; Ferreira, T.S.P.¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP - Av. Dr. Orlando Marques de Paiva, n.87, CEP 05508000. São Paulo, SP- Brasil. E-mail: morenoam@uol.com.br

PALAVRAS CHAVES: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, mumificação fetal, natimortalidade e abortamento.

INTRODUÇÃO

Erysipelothrix rhusiopathiae é um importante patógeno em suinocultura. Trata-se de uma bactéria Gram positiva, pleomórfica, anaeróbica facultativa, não formadora de endosporos, imóvel, α -hemolítica, catalase e oxidase negativa, produtora de H₂S em ágar de triplo açúcar e ferro. O isolamento do agente tem sido descrito não só a partir de suínos doentes ou portadores, mas também como comensal ou patógeno de uma variedade de mamíferos selvagens e domésticos, aves, répteis, anfíbios e peixes, mas raramente relatada em humanos, ocorrendo também em alimentos como "frutos do mar" e cortes de carne suína e aviária (1). Apesar do uso freqüente de vacinas contra o agente em grande parte dos sistemas de produção de suínos, ocorrência de quadros clínicos sugestivos da infecção tem sido amplamente descritos e diagnosticados (2). Tendo em vista o ressurgimento deste agente como causa de prejuízos econômicos para a indústria suinícola nacional e seu potencial envolvimento nos transtornos reprodutivos que ocorrem na espécie suína, o presente projeto teve como objetivos detectar o agente em fetos mumificados, natimortos e abortados através da reação em cadeia pela polimerase.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foi examinado um total de 172 fetos obtidos entre os anos de 2004 e 2007. Os animais foram provenientes de 33 granjas de suínos dos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. De cada animal foi colhida uma amostra do conteúdo gástrico e fragmentos de pulmão, baço, fígado e rim. Os fragmentos de órgãos foram agrupados e macerados com solução salina. O conteúdo gástrico e o macerado de órgãos de cada feto foram submetidos à extração de DNA utilizando-se o método de purificação de ácidos nucleicos (3). As duas amostras provenientes de cada feto foram submetidas à PCR para detecção de *Erysipelothrix rhusiopathiae* (4). Para cada reação foram utilizados controles positivos e negativos. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1.5% corado por brometo de etídeo e fotografado sob luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100 bp DNA Ladder.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 172 fetos examinados, observou-se 10,5 % dos fetos positivos para *E. rhusiopathiae*. Dentre as 33 granjas estudadas 27% foram positivas para o agente. A bactéria esteve presente em fetos mumificados, natimortos e abortados, o número de positivos de acordo com a ocorrência é apresentado no gráfico 2. Foram avaliados pool de órgão e conteúdo gástrico dos fetos, sendo que *E. rhusiopathiae* foi detectado nos dois tipos de amostra. Os relatos deste agente causando transtornos reprodutivos são escassos na literatura consultada. Em estudo realizado em 1999 no Estado de São Paulo, Scarcelli et al (5), descrevem o isolamento de *E. rhusiopathiae* em 5,13% dos casos de aborto examinados. Foi relatado (6) num sistema de produção de 2400 matrizes na Hungria, que havia suspenso a vacinação contra *E. rhusiopathiae*, a ocorrência de alto índice de descarga vulvar, queda nas taxas de parto, aumento no índice de abortos, aumento na taxa de natimortos e redução no tamanho de leitegadas. Os referidos autores descrevem que o isolamento de *E. rhusiopathiae* foi obtido em 64 fêmeas com descarga vulvar. Após o retorno da vacinação contra o agente os índices voltaram ao normal para este plantel.

CONCLUSÕES

O envolvimento deste agente em quadros de septicemia tem aumentado em todo o mundo. É necessário o acompanhamento e a realização de estudos sistemáticos para avaliar o impacto do *E. rhusiopathiae* nos problemas reprodutivos em nosso país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WOOD, R.L. Erysipelas. In: STRAW, B.E. et al. (Eds.). *Diseases of swine*. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1999, p.419-430.
2. AMASS, S.F.; SCHOLZ, D.A. Acute nonfatal erysipelas in sows in a commercial farrow-to-finish operation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.212, p.708-709, 1998.
3. BOOM, R. SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-van DILLEN, P.M.E.; van der NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J of Clin Microbiol*. v. 28, n.3, p. 495-503.
4. TAKEISHI, K. et al. Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.4093-4098, 1999.
5. SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. É.; CARDOSO, M.V.; BERSANO, J. G.; SOUZA, C. A. I.; TORRES, A. P.; CARRASCO, S. Causas bacterianas de abortamento em rebanhos de suínos do Estado de São Paulo, Brasil. Período de 1985 à 1998. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 66, n. 1, p. 95-99, 1999.
6. HOFFMAN, CW; BILKEI, G. Case Study: Chronic Erysipelas of the Sow – a subclinical manifestation of reproductive problems. *Reprod. Dom. Anim.*, v.37, p. 119-120, 2002.

Gráfico 1. Frequência de fetos e granjas positivas para *E. rhusiopathiae*.

Gráfico 2. Distribuição dos fetos positivos para *E. rhusiopathiae* de acordo com o tipo de ocorrência.

Gráfico 3. Distribuição dos fetos positivos para *E. rhusiopathiae* de acordo com o tipo de amostra.

Apêndice B

CHARACTERIZATION OF *E. rhusiopathiae* ISOLATED FROM *T. pecari*

Será submetido: **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**

Characterization of *E. rhusiopathiae* isolated from *T. pecari*

Tania Alen Coutinho¹, Yumiko Imada³, Ricardo Pinho Gomez Lopez², José Soares Ferreira Neto², Andrea Micke Moreno^{1,4}

¹ Laboratório de Sanidade Suína e Virologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

² Laboratório de Zoonoses Bacterianas – FMVZ/USP, São Paulo, Brazil

³ Department of Biologicals Production, National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan

⁴ Corresponding author : Laboratório de Sanidade Suína e Virologia – FMVZ/USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, CEP 05508 270 - São Paulo/ SP – Brazil. Phone + 5502111 3091-1377, Fax: +5502111 3091-7928. E-mail: morenoam@usp.br

ABSTRACT

Erysipelothrix rhusiopathiae has been known to infect many animal species, in this study was conducted a survey of *Erysipelothrix* spp. in Brazilian white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). Tonsils from 21 white-lipped peccaries slaughtered in southern Brazil were examined and one animal was positive for *E. rhusiopathiae* isolation. Five colonies of this specimen were confirmed by PCR and characterized by serotyping, broth microdilution susceptibility test and PFGE. All colonies belonged to serotype 2b and had identical susceptibility profiles. However, at PFGE analysis the five isolates presented different profiles, which mean that *E. rhusiopathiae* infections in *T. pecari* can be conducted by distinct genotypic strains.

KEY WORDS

E. rhusiopathiae, MIC, PFGE, serotyping, susceptibility, *Tayassu peccary*

Erysipelothrix rhusiopathiae is a Gram-positive, slender and straight or slightly curved rod. It is recognized to be the causative agent of erysipelas in swine, erysipeloid in humans²² and has been isolated from many species of wild and domestic animals in most part of the world.^{2, 7, 8, 13} No reports of erysipelas or its infection in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) were found.

Although phenotypically similar to pigs (*Sus scrofa*) and belonging to the same order (Artiodactyla), the white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) belongs to the Tayassuidae family and pigs to the Suidae family.¹⁰ White-lipped peccaries are frugivorous / omnivores ungulates distributed from northern to eastern tropical rain forest, central savanna vegetation (Cerrado), dry regions in northeastern Brazil (Caatinga) and western Paraguayan Chaco to other subtropical areas of South America.¹⁸

There is a growing worldwide demand for meat of wild and exotic animals because it has different taste and is considered more healthy.¹⁹ Nowadays, the white-lipped peccary meat is on the rise in Brazilian market. Since this animal product has been routinely slaughtered and *E. rhusiopathiae* is known to be an important agent of occupational zoonosis in butchers and slaughter workers¹⁶, besides being a pathogen for some animal species, it is important to investigate if white-lipped peccaries could harbor *Erysipelothrix* spp. in their tonsils as observed in swine. This report describes the isolation, phenotypic and genotypic characterization of *E. rhusiopathiae* strains from Brazilian slaughtered white-lipped peccary (*Tayassu pecari*).

Twenty-one white-lipped peccaries from Guarapuava City, Paraná State (Brazil) were slaughtered on two different occasions at the same abattoir and during the processes their tonsils were collected. The animals were raised on semi-extensive pasture systems, supplemented with corn and oats pasture. They received only antihelmintic treatment. The slaughter of these peccaries was legally ensured by "Instrução Normativa nº169 / 2008" of IBAMA / Ministry of Environment / BRAZIL; it allows specialized producers to raise them with the slaughter purpose.

The tonsils were packed in sterile plastic bags and were transported under refrigerated condition to the laboratory for culturing within six to 12 hours from time of collection. Tonsils were cultured on modified *Erysipelothrix* selective broth (ESB)²¹ at 37 °C, under aerobic conditions, for 24 hours. After incubation period, 5 mL of the broth was centrifuged for 20 min at 1400 x g. The sediment was resuspended in 1 mL of 0.9% of saline solution and a loop of it was streaked on azide blood agar^a. The plates were incubated for 24-48 hours at 37 °C, under aerobic conditions. Isolates identification was based on macroscopic features of colonies, Gram stain, absence of catalase production and H₂S production on triple sugar iron agar (TSI)^a.

The species of colonies were confirmed by PCR. DNA extraction was based on protocol described by Boom et al.³ and the DNA amplification was performed using the primers MO101-MO102¹² and ER1-ER2¹⁷. The amplified products that presented at electrophoresis only the 407 bp band were considered as *E. tonsillarum*, while those that showed 407 bp and 937 bp bands denoted the *E. rhusiopathie* species, since primers MO101-MO102 encode 16S rRNA region of *Erysipelothrix* genus and ER1-ER2 primers encode region of Tn916 insertion sequence, which, presumably, is associated with *E. rhusiopathiae* virulence.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of isolates were determined by broth microdilution technique and it was performed in Sensititre panels (BOPO6F)^c. Interpretation of the detected MICs was carried out according to the criteria suggested by CLSI – M31-A3⁵ and Sensititre^c manufacturers.

Serotyping was carried out at National Institute of Animal Health in Tsukuba (Japan) by double immunodiffusion test with autoclaved cell extracts and rabbit antisera against formalin-killed cells of reference strains of serotypes 1 to 26.

The extraction of genomic DNA was performed according to Chang and Chui⁴, differing in the original protocol only for the concentration of bacterial inoculum used in agarose blocks (McFarland turbidity 0.5 to 5). The digestion of genomic DNA was carried out with 30U of restriction endonuclease *Sma* I at 30 °C for 24 hours. The electrophoresis was performed with a 1 % Seakem Gold Agarose^e by using CHEF DR III Chiller System^f in 0.5 X TBE at 12 °C. DNA

fragments were separated at 6 V/cm with pulse times from 5 to 55 s for 15 hours. The gel was stained with 1 X Sybr®Safe⁹ for 2 hours and photographed under UV transillumination. DNA fragments were identified based on the use of Lambda DNA-PFGE marker^h. PFGE patterns were inspected visually; each of them differed by one or more DNA fragment bands.

E. rhusiopathiae was isolated from one (4.8%) of 21 peccaries. The isolate presented compatible colony morphology with the genera *Erysipelothrix*, was catalase negative and produced H₂S on triple iron sugar medium. The molecular identification as *E. rhusiopathiae* species was confirmed by PCR (Figure 1). The five colonies harvested from positive animal for *E. rhusiopathiae* were identified as serotype 2b. All colonies had identical susceptibility profiles, were sensitive to ampicillin, ceftiofur, clindamycin, danofloxacin, enrofloxacin, florfenicol, penicillin, spectinomycin, tiamulin, tilmicosin, tulathromycin, tylosin and were resistance to chlortetracycline, cotrimoxazole, gentamicin, neomycin, oxytetracycline, sulfadimethoxine. The PFGE generated three different profiles (A, B and C), which were composed of eight to nine fragments ranging approximately in size from 48 to 388 Kb (Figure 2). PFGE bands were considered from 38 to 436.5 Kb. DNA fragments observed were different from each other by the presence or absence of at least one band and 7 DNA fragments in common to all profiles was found. Pattern A differed from C by the absence of the 170 Kb band, while pattern B differed from A and C by the presence of 218.25 Kb band and absence of 242.5 Kb band.

This is the first report of *E. rhusiopathiae* isolation from white-lipped peccary. Since the isolation proceeded from healthy tonsil of *Tayassu pecari*, it can be stated that this peccary could harbour *E. rhusiopathiae*, as swine.²²

All five colonies presented identical susceptibility profiles and its sensitivity to drugs as ampicillin, ceftiofur, clindamycin, danofloxacin, enrofloxacin, florfenicol, penicillin, spectinomycin, tiamulin, tilmicosin and tylosin is according to other reports.^{6, 9, 11, 20, 23} Tulathromycin is a fairly recent semisynthetic antimicrobial compound, belonging to the macrolides group and has been widely used in swine for treatment and prevention of respiratory diseases. There are no reports in literature about tulathromycin trials against *E. rhusiopathiae*, but this study verified

the good antimicrobial action of this principle against it. The resistance expressed by five colonies to chlortetracycline, cotrimoxazole, gentamicin, neomycin, oxytetracycline and sulfadimethoxine were expected following the example of previous reports.^{6, 9, 11, 20, 23}

Like other studies^{8, 14, 15} this research showed that PFGE technique is a suitable method for *E. rhusiopathiae* genotyping, since the finding of three different genotypes between five colonies from the same clinical specimen demonstrated its high discriminatory power. This kind of occurrence confirms that *E. rhusiopathiae* infections could be conducted in white-lipped peccaries by strains of same serotype and susceptibility profile, but genotypically diverse.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Gonzalo Braquero and Tropical Sustainability Institute for their cooperation and assistance to provide permission from IBAMA to carry out the harvests of slaughtered peccary samples.

This study was supported by FAPESP- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – research project 06/55502-7.

SOURCES AND MANUFACTURERS

- a. Difco/BBL, Detroit, MI.
- b. LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil.
- c. Trek Diagnostics Systems
- d. Oxoid Ltd., Cambridge, UK.
- e. Cambrex Corporation, Iowa, USA.
- f. Bio-Rad Laboratories, California, USA.
- g. Invitrogen Corporation, California, USA.
- h. New England BioLabs Inc., USA.

REFERENCES

- ¹ Bodmer RE: 1990, Responses of ungulates to seasonal inundations in the Amazon floodplain. *J Trop Ecol* 6:191 – 201.
- ² Boerner L, Nevis KR, Hinckley LS, et al.: 2004, *Erysipelothrix* septicemia in a little blue penguin (*Eudyptula minor*). *J Vet Diagn Invest* 16:145-149, 2004.
- ³ Boom R, Sol CJA, Salimans MMM: 1990, Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:459-453.
- ⁴ Chang N, Chui L: 1998, A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 31:275-279.
- ⁵ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): 2008, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 3rd ed., approved standard, M31-A3. CLSI, Wayne, PA.
- ⁶ De Rosa DC, Veenhuizen MF, Bade DJ, Shryock TR: 2000, In vitro susceptibility of porcine respiratory pathogens to tilmicosin. *J Vet Diagn Invest* 12:541-546.
- ⁷ Eriksen K, Fossum K, Gamlem H, et al.: 1987, Endocarditis in two dogs caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J Small Anim Pract* 28:117-123.
- ⁸ Eriksson H, Jansson DS, Johansson KE, et al.: 2009, Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from poultry, pigs, emus, the poultry red mite and other animals. *Vet Microbiol* 137:98-104.
- ⁹ Fidalgo SG, Longbottom CJ, Riley TV: 2002, Susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to antimicrobial agents and home disinfectants. *Pathology* 34:462-465.
- ¹⁰ Herrera HM, Abreu UGP, Keuroghlian A, Freitas TP, Jansen AM: 2002, The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. *J Parasitol Res* 103:619-624.
- ¹¹ Jones RN, Pfaller, MA, Rhomberg, PR, Walter DH: 2002, Tiamulin activity against fastidious and nonfastidious veterinary and human bacterial isolates: initial development of *in vitro* susceptibility test methods. *J Clin Microbiol* 40:461-465.

- ¹² Makino SJ, Okada Y, Maruyama T, et al.: 1994, Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. J Clin Microbiol 32:1526-1531.
- ¹³ Novotny L, Dvorska L, Lorencova A, et al.: 2004, Fish: a potencial source of bacteria pathogens for human beings. Vet Med 49:343-358.
- ¹⁴ Okatani AT, Uto T, Taniguchi T, et al.: 2001, Pulsed-field gel electrophoresis in differentiation of *Erysipelothrix* species strains. J Clin Microbiol 39:4032-4036.
- ¹⁵ Opriessnig T, Hoffman LJ, Harris DL, et al.: 2004, *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. J Vet Diagn Invest 16:101-107.
- ¹⁶ Reboli A, Farrar WE: 1989, *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an occupational pathogen. Clin Microbiol Rev 2:354-359.
- ¹⁷ Shimoji Y, Mori Y, Hyakutake K, et al.: 1998, Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. J Clin Microbiol 36:86-89.
- ¹⁸ Sicuro FL, Oliveira LFB: 2002, Coexistence of peccaries and feral hogs in the brazilian Pantanal wetland: an ecomorphological view. J Mammal 83:207-217.
- ¹⁹ Souza MA, Sobestiansky J, Linhares GFC, et al.: 2005, Surto de macracantorrincose em queixada (*Tayassu pecari*) criado extensivamente nos arredores de Goiânia – estado de Goiás, Brasil: uma zoonose em potencial [Outbreak of macracantorrincose in peccaries (*Tayassu peccary*) created extensively on the outskirts of Goiania – Goias state, Brazil: a potential zoonosis]. Rev Patol Trop 34: 213-220. In Portuguese.
- ²⁰ Takahashi T, Zarkasie K, Mariana S, Sumadi S, et al.: 1989, Serological and pathogenic characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of slaughter pigs in Indonesia. Vet Microbiol 21:165-175.
- ²¹ Wood RL: 1965, A selective liquid medium utilizing antibiotics for isolation of *Erysipelothrix insidiosa*. Am J Vet Res 26:1303-1308.
- ²² Wood RL: 1999, Erysipelas. In: Diseases of swine, ed. Straw BE, D’Allaire S, Mengeling WL, et al., 8th ed., pp 419-430. Iowa State University Press, Ames, IA.
- ²³ Yamamoto K, Kijima M, Yoshimura H, Takahashi T: 2001, Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan, 1988-1998. J Vet Med B 48:115-126.

Figure 1. PCR gel – Lanes 1 to 5 represent positive colonies to *E. rhusiopathiae* and lanes 6, 7 and 8 show respectively *E. tonsillarum* positive control, *E. rhusiopathiae* positive control and negative control. Lane 9 represents 100 bp DNA ladder^b.

Figure 2. PFGE gel – Lane 1 presents pattern A, lanes 2 to 4 show pattern B, lane 5 presents pattern C and lane 6 contains Lambda PFGE marker^h.

Apêndice C

GENOTYPING OF BRAZILIAN *Erysipelothrix* spp. STRAINS BY AFLP
TECHNIQUE

Será submetido: **Journal of Microbiological Methods**

Genotyping of brazilian *Erysipelothrix* spp. strains by AFLP technique.

Tania Alen Coutinho ^a, Yumiko Imada ^b, David Emílio Santos Neves de Barcellos ^c, Sérgio José de Oliveira ^d, Andrea Micke Moreno ^{a,*}

^a Laboratório de Sanidade Suína e Virologia , Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, CEP 05508 270 - São Paulo/ SP – Brazil. E-mail: tania_alen@hotmail.com

^b Department of Biologicals Production, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan. E-mail: yumima@affrc.go.jp

^c Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, CEP 91540-000 - Porto Alegre, Brazil. E-mail: davidbarcellos@terra.com.br

^d Laboratório de Microbiologia Clínica e de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Av. Farroupilha, 8001, São José, CEP 92425-900 - Canoas, Brazil. E-mail: serjol@terra.com.br

* Corresponding author : Laboratório de Sanidade Suína e Virologia – FMVZ/USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, CEP 05508 270 - São Paulo/ SP – Brazil. Phone + 55 11 3091-1377, Fax: +55 11 3091-7928. E-mail: morenoam@usp.br

ABSTRACT

One hundred and fifty one *Erysipelothrix* spp. isolates from diseased and carrier swine from Brazil, were identified by PCR, submitted to serotyping and analyzed by amplified fragment length polymorphism with a single enzyme (AFLP). Reference strains from Australia and United Kingdom were also examined. The 151 strains were classified into 18 different serotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 21, 24 and 25), being the serotype 2b the most frequently founded (39,7%). Associating serotyping and PCR results was possible identify 146 strains as *E. rhusiopathiae* and five strains as *E. tonsillarum*. Despite the AFLP technique for this genus did not cluster all the isolates according to serotype, origin, disease or isolation data, it was easy to perform, fast and presented high discriminatory power. The results from AFLP analysis of *Erysipelothrix* spp. could also support its use as a discriminatory tool between the species *E. rhusiopathiae* and *E. tonsillarum*.

KEY WORDS

AFLP, *Erysipelothrix* spp., genotyping, serotyping, swine

1. INTRODUCTION

Erysipelothrix rhusiopathiae, a small rod shaped Gram positive bacterium, is known to be the causative agent of swine erysipelas, which occur in acute and chronic forms and cause economic losses in pig production. It is also associated with disease in sheep, turkey, chickens and infrequently in dogs, horses and humans [3]. The genus *Erysipelothrix* has been formally divided in three species, *E. rhusiopathiae* (comprising serotypes 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 and type N), *E. tonsillarum* (comprising serotypes 3, 7, 10, 14, 20, 22 and 25) [24], *E. inopinata* [28], but two possible new and separated unnamed species, *Erysipelothrix* sp. strain 1 (comprising serotype 13) and *Erysipelothrix* sp. strain 2 (comprising serotype 18), were also described [25].

Many molecular typing methods have been applied in the epidemiological typing of *Erysipelothrix* isolates as DNA-DNA hybridization [25], RFLP [1, 7, 10], REP-PCR [6], RAPD [10, 17] and PFGE [8, 18, 19, 22]. However, a widely used technique, known as amplified fragment length polymorphism (AFLP), has not been used so far to *Erysipelothrix* spp. genotyping.

AFLP using a single enzyme has been successfully applied to the epidemiological typing of many Gram-positive and Gram-negative bacteria [4, 5, 14, 16].

In this study, we report the use of a rapid PCR-based technique, single enzyme AFLP for typing *Erysipelothrix* spp. isolates from brazilian pigs with and without clinical symptoms of swine erysipelas and compare this system with the serotyping results.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Bacterial strains

One hundred fifty one isolates of *Erysipelothrix* spp. were selected from different culture collections and divided into three main groups of samples: reference, historical and recent. Nineteen isolates represent reference strains for hyperimmune sera production against *Erysipelothrix* spp. (18 are from Australia

and 1 from United Kingdom), 59 historical strains were isolated from southern Brazilian swine herds (comprising 9 symptomatic and 50 carrier swine) and 73 recent strains were isolated from southern (comprising 4 symptomatic and 51 carrier pigs) and southeast (15 symptomatic and 3 carrier swine) Brazil.

2.2 DNA preparation

An aliquot of 200 μ L of *Erysipelothrix* spp. fresh culture in brain heart infusion (BHI - Difco/BBL) supplemented with 5% of horse serum was submitted to DNA extraction based on described method [2], with a previous enzymatic treatment during 60 min at 37 °C with 10 μ g of lysozyme (USBiological, Swampscott, MA, USA) and 400 μ g of proteinase K (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil).

2.3 Identification of the genus and species of isolates

The DNA samples were amplified using the primers MO101-MO102 [13] and ER1-ER2 [23]. The amplification was carried out in 50 μ L reaction mixture containing 5 μ L of DNA template, 1.5 mM of $MgCl_2$, 200 mM of each dNTP, 20 pmol of MO101 and MO102, 30 pmol of ER1 and ER1 and 1U of Taq DNA polymerase (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 1X PCR buffer and ultra pure water. The PCR was performed for 35 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 59.3 °C for 1.5 min and extension at 72 °C for 1 min. Amplified products were subjected to electrophoresis in 1.5 % agarose gel (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil), stained with BlueGreen® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) and identified by using 100 bp DNA ladder (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil). The amplified products that presented at electrophoresis only the 407 bp band were considered as *Erysipelothrix* spp., while those that showed 407 bp and 937 bp bands denoted the *E. rhusiopathiae* species, since primers MO101-MO102 encode 16S rRNA region of *Erysipelothrix* genus and ER1-ER2 primers encode region of Tn916 insertion sequence, which, presumably, is associated with *E. rhusiopathiae* virulence.

2.4 Serotyping

Serotyping was performed at National Institute of Animal Health in Tsukuba / Japan by double immunodiffusion test with autoclaved cell extracts and rabbit antisera against formalin-killed cells of reference strains of serotypes 1 to 26 as previously described [12, 26]. In brief, isolates were cultivated in BHI supplemented with 0.3 % Tris and 0.1 % Tween 80 (pH 7.8) at 37 °C overnight. Cells were collected by centrifugation at 10 000 x *g* for 5 min, resuspended in 100 µL of distilled water and autoclaved at 121 °C for 60 min. It was probed with rabbit antisera against serotypes 1a, 1b and 2a in 1 % Noble agar with 50mM sodium chloride and 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.1 % sodium azide. Serotype 2b was distinguished from serotype 2a by examining the precipitation line between the sample and anti-serotype 2a (completely fused precipitation line designated serotype 2a, while incomplete fusion denoted serotype 2b). Isolates showing no precipitation lines with these three antisera were further tested with all other antisera and isolates gave no precipitation line with any antisera were described for convenience as “untypeable”. For the exact identification of serotype N, it is necessary to prepare antiserum against test strains and to confirm that the antiserum cannot produce any precipitation lines with the homologous antigen.

2.5 AFLP typing

Restriction endonuclease digestion and ligation was performed using a modification of a described method [14]. To 10 µL of extracted DNA were added 24 U of *Hind* III (Invitrogen, Inc.), ultra pure water to a final volume of 20 µL and the reaction was incubated overnight at 37 °C. An aliquot of digested DNA (5 µL), was added to 0.2 µg of each adapter oligonucleotides ADH1 and ADH2 (Invitrogen, Inc.), 1U of T4 DNA ligase (Invitrogen, Inc) ultra pure water to a final volume of 20 µL and incubated at room temperature for 3 hours. Ligated DNA was heated to 80 °C for 10 min and 5 µL were used for each PCR reaction. PCR

reactions were performed in 50 µL final volume, containing 5 µL of ligated DNA, 2.5 mM MgCl₂, 30 pmol of primer (either HI-A, HI-G or HI-T) (Invitrogen, Inc.), and 1 U of Taq polymerase (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) in 1 X PCR buffer. The mixture was subjected to an initial denaturing step of 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C and 2.5 min at 72 °C. The base sequences of adapter and selective primers were the following: ADH1 - 5' ACGGTATGCGACAG 3', ADH2 3' GAGTGCCATACGCTGTCTCGA 5', HI-A - 5' GGTATGCGACAGAGCTTA 3', HI-G - 5' GGTATGCGACAGAGCTTG 3' and HI-T - 5' GGTATGCGACAGAGCTTT 3'. The electrophoresis was conducted on 1.5% agarose gel and at 22V for 24 hours. The amplified products were visualized by Blue Green® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) staining and were compared to 100 bp DNA ladder (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil).

2.6 Statistical analysis

Levels of relatedness of the isolates were determined by comprehensive pairwise comparison of restriction fragment sizes using the Dice coefficient. Mean values obtained from Dice coefficient were used in the UPGMA using NTSYS software to generate dendrograms.

The AFLP discriminatory index was calculated according to the described method [9].

3. RESULTS

146 isolates presented two amplification fragments (407 bp and 937 bp), meaning that these are representatives of *E. rhusiopathiae* species. The five remaining isolates showed a single amplicon (407 bp) and were considered as other species (Figure 1).

In this study were identified 18 different serotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 21, 24 and 25). The serotype most prevalent was serotype 2b, and 12 isolates were not typeable with available antisera (Table 1). Among the five isolates that were not from species *E. rhusiopathiae*, four belonged to serotype 7 and one to 25, which suggests that these can belong to *E. tonsillarum* species.

Initial experiments were conducted to assess the suitability of the three selective primers (HI-A, HI-G and HI-T). Despite the use of HI-A and HI-T primers have ensured good reproducibility and discrimination between the isolates, HI-G primer was the most appropriate to AFLP analysis, due to the higher discriminatory index (HI-A and HI-T obtained 0.96 against 0.98 of HI-G), the clarity of bands and the clusters formed from its use. Therefore, only HI-G results will be presented here.

Banding patterns of AFLP were obtained from all 151 isolates, regardless of the selective primer used in the reaction. The AFLP generated 85 different profiles, which were composed of five to 12 DNA fragments (an average of nine fragments per profile) ranging approximately in size from 380 to 3500 bp (Figure 2). DNA fragments observed were different from each other by the presence or absence of at least one band and DNA fragment in common to all profiles was not found. The discriminatory index obtained by AFLP was 0.98.

The generated dendrogram (Figure 3) highlighted the distribution of 151 isolates tested in two main groups (I and II) with similarity coefficient between them of 0.56. Group I comprised five isolates (each of it belonging to a different profile), which are representatives of *E. tonsillarum* species. Four of these represented serotype 7 and had coefficients of similarity ranged from 0.80 to 0.95. The last isolate of group I belonged to serotype 25 and presented similarity coefficient 0.64 for the other isolates of the group. Group II took over the remaining 146 isolates tested (distributed over 80 different profiles) and with coefficients of similarity between them varying from 0.58 to 1.00.

Isolates collected from the same clinical specimen were grouped within the same AFLP profile, in other words, were genotypically identical. Although the groups obtained by AFLP did not follow an epidemiological pattern of grouping, the technique was able to cluster small, discrete and isolated groups according to serotype, animal health condition and year and place of isolation (Figure 3).

4. DISCUSSION

This is the first report of *Erysipelothrix* spp. typing by AFLP. The AFLP is a method based on detection of natural occurrence of DNA polymorphisms and is

the result of mutations and rearrangements (insertion, deletion, etc.) on DNA, which could be detected by the presence or absence of bands in patterns generated by enzymatic digestion, amplification procedures or both [11]. In other words, the main idea is that the banding pattern variation generated by AFLP is the direct reflection of genetic relationship between bacterial strains. Therefore, these banding patterns may be considered as genomic fingerprinting, which allows the numerical analysis for characterization and identification purposes [11].

The primer that apparently showed up more suitable for *Erysipelothrix* spp. typing by AFLP was the HI-G. Besides it presented discriminatory index higher than other primers, its use allowed the *E. tonsillarum* strains remain together in same single group.

A reliable quantity of AFLP fragments that ensure representativeness of a profile remains unknown. This fact could lead to incorrect conclusions about real identity of individuals within a study, since an insufficient number of fragments could cover the existence of genetic differences [15]. Using HI-G primer were obtained from five to 12 AFLP fragments with an average of nine fragments and it certainly assured the representativeness of most generated profile, if not all.

The results presented here suggest that AFLP technique is highly discriminatory, since 85 different profiles were recognized from 151 examined isolates and the discriminatory index was 0.98. The acceptable level of discrimination will depend on a number of factors, but an index of greater than 0.90 would seem to be desirable if the typing results are to be interpreted with confidence [9]. The detection of different AFLP profiles in isolates of same serotype, animal health condition and year or place of isolation also helps to suggest the high discriminatory power of technique.

Even though the phenotypic characteristics make the species *E. tonsillarum* and *E. rhusiopathiae* virtually indistinguishable (except for *E. tonsillarum* ability to ferment sucrose over the inability of *E. rhusiopathiae*) [21], there are molecular techniques, as DNA hybridization and PCR, which distinguish one species from another [20, 23, 25, 27, 29]. According to the results found here the AFLP technique could be an alternative to other molecular tools to discriminate between *E. rhusiopathiae* and *E. tonsillarum*, since it clustered *E.*

tonsillarum strains in an isolated group. Additionally, AFLP technique is a little cumbersome, easy to perform and particularly applicable to the analysis of large numbers of isolates [14]. Although this study has involved a small number of *E. tonsillarum* isolates (five), a greater number of isolates is likely to confirm the use of AFLP for differentiation of these two species.

The isolates from the same animal were allocated in the same AFLP profile. However, this result does not guarantee that animals are always infected with clonal populations of *Erysipelothrix* spp., since the harvest of more than one colony from infected specimen submitted to AFLP were performed in only four occasions. Future studies involving multiple harvests of colonies from the same infected animal can clarify this doubt.

Despite the AFLP did not cluster the *Erysipelothrix* spp. isolates according to serotype, origin, disease or isolation data, as could be expected, it still was a good choice to study this genus and discriminate their species with low cost, promptness and high discriminatory index.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by FAPESP- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – research project 06/55502-7.

6. REFERENCES

- [1] Ahrné, S., Stenström, I.-M., Jensen, N.E., Pettersson, B., Uhlen, M., Molin, G. 1995. Classification of *Erysipelothrix* strains on the basis of restriction fragment length polymorphisms. *Int J Syst Bacteriol* 45:382-385.
- [2] Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:459-453.
- [3] Brooke, C.J., Riley, T.V., 1999. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol* 48:789-799.
- [4] Colorni, A., Diamant, A., Eldar, A., Kvitt, H., Zlotkin A., 2002. *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes. *Dis Aquat Org* 49:165-170.
- [5] Duim, B., Wassenaar, T. M., Rigter, A., Wagenaar, J. 1999. High resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 65:2369-2375.
- [6] Dunbar, S.A., Clarridge, J.E., 2000. Potential errors in recognition of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J Clin Microbiol* 38:1302-1304.
- [7] Eamens, G.J., Forbes, W.A., Djordjevic, S.P., 2006. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. *Vet Microbiol* 115:329-338.
- [8] Eriksson, H., Jansson, D. S., Johansson, K-E., Båverud, V., Chirico, J., Aspán, A. 2009. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from poultry, pigs, emus, the poultry red mite and other animals. *Vet Microbiol* 137:98-104.
- [9] Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26:2465-2466.
- [10] Imada, Y., Takase, A., Kikuma, R., Iwamaru, Y., Akachi, S., Hayakawa, Y. 2004. Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erisipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. *J Clin Microbiol* 42:2121-2126.

- [11] Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142:1881-1893.
- [12] Kucsera, G., 1973. Proposal for standardization of the designations used for serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Migula) Buchanan. *Int J Syst Bacteriol* 23:184-188.
- [13] Makino, S., Okada, Y., Maruyama, T., Ishikawa, K., Takahashi, T., Nakamura, M., Ezaki, T., Morita, H. 1994. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. *J Clin Microbiol* 32:1526-1531.
- [14] Mclauchlin, J., Ripabelli, G., Brett, M.M., Threlfall, E. J. 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *Int J Food Microbiol* 56:21-28.
- [15] Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evolut* 14:389-394
- [16] Naiemi, N.A., Heddema, E. R., Bart, A., Jonge, E., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Savelkoul, P. H. M., Duim, B. 2006. Emergence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria during selective decontaminant of the digestive tract on an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 58:853-856.
- [17] Okatani, A.T., Hayashidani, H., Takahashi, T., Taniguchi, T., Ogawa, M., Kaneko, K-I 2000. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Erysipelothrix* spp. *J Clin Microbiol* 38:4332-4336.
- [18] Okatani, A.T., Uto, T., Taniguchi, T., Horisaka, T., Horikita, T., Kaneko, K-I., Hayashidani, H. 2001. Pulsed-field gel electrophoresis in differentiation of *Erysipelothrix* species strains. *J Clin Microbiol* 39:4032-4036.
- [19] Opriessnig, T., Hoffman, L. J., Harris, D. L., Gaul, S. B., Halbur, P. G. 2004. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. *J Vet Diagn Invest* 16:101-107.
- [20] Pal, N., Bender, J.S., Opriessnig, T. 2010. Rapid detection and differentiation of *Erysipelothris* spp. by a novel multiplex real-time PCR assay. *J Appl Microbiol* 108:1083-1093.

- [21] Reboli, A.C., Farrar, W.E. 1992, The genus *Erysipelothrix*, The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, isolation, Identification, Applications, 2nd edition, eds. Balows, A.; Trüper, H. et al., Springer, New York, p.1629-1642.
- [22] Sawada, T., Hassanein, R., Takahashi, E., Ando, S., Entomack, B., Kataoka, Y., Takagi, M., Yamamoto, K., Kojima, A. 2006. Pathogenic and genetic characterization of acriflavine resistant *Erysipelothrix* isolates from arthritic pigs. *J Vet Epidemiol* 10:21-28.
- [23] Shimoji, Y., Mori, Y., Hyakutake, K., Sekizaki, T., Yokomizo, Y. 1998. Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. *J Clin Microbiol* 36:86-89.
- [24] Takahashi, T. et al., 1987. *Erysipelothrix tonsillarum* sp. nov. isolated from tonsils of apparently healthy pigs. *Int J Syst Bacteriol* 37:166-168.
- [25] Takahashi, T., Fujisawa, T., Benno, Y., Tamura, Y., Sawada, T., Suzuki, S., Muramatsu, M., Mitsuoka, T. 1992. DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. *Int J Syst Bacteriol* 42:469-473.
- [26] Takahashi, T., Nagamine, N., Kijima, M., Suzuki, S., Takagi, M., Tamura, Y., Nakamura, M., Muramatsu, M., Sawada, T. 1996. Serovars of *Erysipelothrix* strains isolated from pigs affected with erysipelas in Japan. *J Vet Med Sci* 58:587-589.
- [27] Takeshi, K., Makino, S., Ikeda, T., Takada, N., Nakashiro, A., Nakanishi, K., Oguma, K., Katoh, Y., Sunagawa, H., Ohyama, T. 1999. Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. *J Clin Microbiol* 37:4093-4098.
- [28] Verborg, S., Rheims, H., Emus, S., Frühling, A., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., Schumann, P. 2004. *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth and description of Erysipelotrichaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Micr* 54:221-225.
- [29] YAMAZAKI, Y., 2006. A multiplex polymerase chain reaction for discriminating *Erysipelothrix rhusiopathiae* from *Erysipelothrix tonsillarum*. *J Vet Diagn Invest* 18:384-387.

Table 1. Serotypes of *Erysipelothrix* spp. isolates

Isolates		Number of isolates per serotype																		
		1a	1b	2a	2b	4	5	6	7	8	10	11	12	15	17	19	21	24	25	UT ^a
Reference	UK ^b			1																
	AUS ^c	1	1	1	3	1	1	2	1		1	1	1	1					1	2
Historical ^d	Carrier				14		7	3*	3	4		1	7		2	1	4*			5
	Diseased							3				2	2			2**		1**		
Recent ^d	Carrier		9		24		2	5		3	2					4				5
	Diseased				19															
SUBTOTAL		1	10	2	60	1	10	13	4	7	3	4	10	1	2	7	4	1	1	12

^a untypeable isolate

^b reference strain from United Kingdom

^c reference strain from Australia

^d strains of swine origin

* isolate reacted simultaneously against serotypes 19 and 24

** isolate reacted simultaneously against serotypes 6 and 21

Figure 1. PCR – amplification of 407 bp fragment (*Erysipelothrix* spp.) and simultaneously amplification of 407 bp and 937 bp fragments (*E. rhusiopathiae*). Lanes 4, 5, 10, 11 and 18 represent strains positive for *E. tonsillarum* species. Lanes 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 and 15 show strains positive for *E. rhusiopathiae* species. Lanes 16 to 21 – negative samples. Lanes 22, 23 and 24 represent respectively positive control, negative control and 100 bp DNA ladder.

Figure 2. AFLP patterns produced by *Erysipelothrix* spp. with HI-G primer. Lane 1 contain a 100 bp DNA ladder. Lanes 2 - 29 represent generated patterns, lane 3 – negative sample.

¹ number of isolates per generated profile, ² C= carrier swine, D= diseased swine, N= not known, ³ 1980 = before 1980, ⁴ RS= Rio Grande do Sul, AUS= Australia, SP= São Paulo e UK= United Kingdom.

Figure 3. Dendrogram showing the relationship between *E. rhusiopathiae* and *E. tonsillarum* isolates on the basis of AFLP patterns. Percentages of similarity between patterns were calculated by use of Dice's coefficient. The dendrogram was constructed by use of UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average).

Apêndice D

PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RECENT AND
ARCHIVED *ERYSIPELOTHRIX* spp. ISOLATED FROM BRAZILIAN SWINE

Será submetido: **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**

Phenotypic and molecular characterization of recent and archived *Erysipelothrix* spp. isolated from Brazilian swine

Tania Alen Coutinho ^a, Yumiko Imada ^b, David Emílio Santos Neves de Barcellos ^c, Sérgio José de Oliveira ^d, Andrea Micke Moreno ^{a, *}

^a Laboratório de Sanidade Suína e Virologia , Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

^b Department of Biologicals Production, National Institute of Animal Health, Tsukuba, Japan.

^c Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

^d Laboratório de Microbiologia Clínica e de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil.

* Corresponding author: Laboratório de Sanidade Suína e Virologia – FMVZ/USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, CEP 05508 270 - São Paulo/ SP – Brazil. Phone + 55 11 3091-1377, Fax: +55 11 3091-7928.
E-mail: morenoam@usp.br

ABSTRACT

One hundred fifty one *Erysipelothrix* spp. isolates were characterized by serotyping, determination of antimicrobial susceptibility, AFLP and PFGE. Among all isolates, 139 were classified in 18 different serotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 21, 24 and 25) and serotype 2b was the most frequent. The susceptibility profiles were very similar among the isolates, which permitted not the subtyping of *Erysipelothrix* spp. isolates by antimicrobial susceptibility testing. Despite AFLP and PFGE provided the same discriminatory index (0.98), PFGE was more discriminatory than AFLP, given the types of groups generated by it. Regardless of the molecular technique employed, no discrimination between recent and historical isolates was established and a fixed epidemiological pattern of grouping them was also not observed. Nevertheless AFLP could be an interesting alternative for *Erysipelothrix* species discrimination, even as PFGE could discern this bacterium according to serotypes.

KEY WORDS

Erysipelothrix spp., swine, serotyping, antimicrobial susceptibility, AFLP and PFGE

INTRODUCTION

The Gram positive, facultative anaerobic rod *Erysipelothrix rhusiopathiae* is an important pathogen in swine which causes great economic losses and remains to be a major problem in pig-producing areas around the world. At present, the genus *Erysipelothrix* contains three species, *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum* (Takahashi et al., 1992) and *E. inopinata* (Verbarg et al., 2004). *E. rhusiopathiae* causes a variety of disease conditions in many species of wild and domestic animals and birds, as well as erysipeloid, a skin disease of humans (Wood, 1999). *E. tonsillarum* has been isolated from pigs, cattle and chickens apparently healthy (Takahashi et al., 1987; Hassanein et al., 2003; Nakazawa et al., 1998), however it already been identified as etiologic agent of endocarditis in dogs (Takahashi et al., 2000). The species *E. inopinata* has a single representative, which was isolated as contaminant of a plant-based culture medium and allocated as new species within the genus *Erysipelothrix* due to differences in phylogenetics and peptidoglycan structure (Verbarg et al., 2004). Around 30 to 50 % of swine are known to be harbor *E. rhusiopathiae* in their tonsils and others lymphoid tissues (Wood, 1999). Subclinically infected pigs are thought to be the reservoir for acute erysipelas outbreaks and *E. rhusiopathiae* is shed by feces, urine, saliva and nasal secretions. Swine younger than three months or with more than three years of age used to be less predisposed to erysipelas and it may be explained by naturally acquired passive immunity in the young and active immunity following subclinical infection in older animals (WOOD, 1999). About thirty years ago, the occurrence of swine erysipelas was quite common in commercial pig farms in Brazil. This situation was controlled with immunization programs against *E. rhusiopathiae* in most of swine herds. However, in recent years clinical manifestations of this infection have been observed and diagnosed more often. The present report describes the phenotypic and molecular characteristics of recent and archived *Erysipelothrix* spp. isolated from Brazilian swine. Reference strains from Australia and United Kingdom were also examined.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

One hundred fifty one isolates of *Erysipelothrix* spp. were selected from different culture collections and divided into three main groups of samples: reference, historical and recent. Nineteen isolates represent reference strains for hyperimmune sera production against *Erysipelothrix* spp. (18 are from Australia and 1 from United Kingdom), 59 historical strains were isolated from southern brazilian swine herds (comprising 9 symptomatic and 50 carrier swine) and 73 recent strains were isolated from southern (comprising 4 symptomatic and 51 carrier pigs) and southeastern (15 symptomatic and 3 carrier swine) Brazil.

DNA preparation and identification of genus and species of isolates

An aliquot of 200 µL of *Erysipelothrix* spp. fresh culture in brain heart infusion (BHI - Difco/BBL) supplemented with 5% of horse serum was submitted to DNA extraction based on method described by Boom et al. (1990), with a previous enzymatic treatment during 60 min at 37 °C with 10 µg of lysozyme (US Biological, Swampscott, MA, USA) and 400 µg of proteinase K (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil). The DNA samples were amplified using simultaneously the primers MO101-MO102 (Makino et al. 1994) and ER1-ER2 (Shimoji et al. 1998). The amplification was carried out in 50 µl reaction mixture containing 5 µl of DNA template, 1.5 mM of MgCl₂, 200 mM of each dNTP, 20 pmol of MO101 and MO102, 30 pmol of ER1 and ER1 and 1U of Taq DNA polymerase (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 1X PCR buffer and ultra pure water. The PCR was performed for 35 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 59.3 °C for 1.5 min and extension at 72 °C for 1 min. Amplified products were subjected to electrophoresis in 1.5 % agarose gel (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil), stained with BlueGreen® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) and identified by using 100 bp DNA ladder (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil). Strains that presented at electrophoresis only the 407 bp band were considered as *Erysipelothrix* spp., while those that showed 407 bp and 937 bp bands were identified as *E. rhusiopathie* species.

Serotyping

Serotyping was performed at National Institute of Animal Health in Tsukuba / Japan by double immunodiffusion test with autoclaved cell extracts and rabbit antisera against formalin-killed cells of reference strains of serotypes 1 to 26 as previously described (Kucsera, 1973; Takahashi et al., 1996).

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility tests were performed by microdilution technique according to the standardized protocol of the M31-A3/CLSI (CLSI, 2008). Minimal inhibitory concentrations (MICs) of drugs were determined by using Sensititre panels (BOPO6F – Trek Diagnostics Systems), using a modified veterinary fastidious medium (VFM), which had the composition of the VFM originally described in M31-A3/CLSI (CLSI, 2008), except for lysated horse blood, which was replaced, at the same concentration, by fetal calf serum. The antimicrobial agents as well as their tested concentration ranges are shown in Table 1. As quality controls of the panels were tested the reference strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, according to M31-A3/CLSI (CLSI, 2008) instructions.

AFLP typing

The AFLP protocol was performed according to McLauchlin et al. (2000) description and the electrophoresis was conducted on 1.5% agarose gel and at 22V for 24 hours. The amplified products were stained by Blue Green® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) and compared to 100 bp DNA ladder (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil).

PFGE typing

The extraction of genomic DNA was performed according to Chang and Chui (1998), differing in the original protocol only for the concentration of bacterial inoculum used (McFarland turbidity 0.5 to 5). The digestion of genomic DNA was carried out with 30U of restriction endonuclease *Sma* I at 30 °C for 24 hours. The electrophoresis was performed with a 1 % Seakem Gold Agarose (Bio-Rad Laboratories, California, USA) by using CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad Laboratories, California, USA) in 0.5 X TBE at 12 °C. DNA fragments were separated at 6 V/cm with pulse times from 5 to 55 s for 15 hours. The gel was stained with 1 X Sybr®Safe (Invitrogen Corporation, California, USA) for 2 hours and photographed under UV transillumination. DNA fragments were identified based on the use of Lambda DNA-PFGE marker (New England BioLabs Inc., USA). PFGE patterns were inspected visually; each of them differed by one or more DNA fragment bands.

Statistical analysis

Levels of relatedness of the isolates were determined by comprehensive pairwise comparison of restriction fragment sizes using the Dice coefficient. Mean values obtained from Dice coefficient were used in the UPGMA using NTSYS software to generate dendrograms of AFLP and PFGE. The discriminatory index was calculated for AFLP and PFGE, according to method described by Hunter and Gaston (1988).

RESULTS

Species of isolates

One hundred forty six strains were characterized as *E. rhusiopathiae* species, through PCR. The five remaining strains showed a single amplicon (407 bp) and were considered as other species.

Serotyping

This study identified 18 different serotypes (1a, 1b, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 21, 24 and 25), among which serotype 2b was the most prevalent. In addition, two isolates were reported as serotypes 19-24 and 6-21 (isolates that reacted with sera for two serotypes). Twelve isolates were not typeable with available antisera. Among the five isolates that were not confirmed as *E. rhusiopathiae* by PCR, four belonged to serotype 7 and one to 25, which suggests that these can belong to *E. tonsillarum* species.

Antimicrobial susceptibility

The MIC distributions of all antimicrobial agents are presented in Table 1. The results were similar for all isolates which showed 100% of sensitivity to ampicillin, ceftiofur, clindamycin, penicillin, tiamulin, tilmicosin, tulathromycin and 100% of resistance to gentamicin, neomycin, sulfadimethoxine, cotrimoxazole. The most part of isolates were also considered sensitive to chlortetracycline, danofloxacin, enrofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tylosin, however in the case of these drugs some isolates presented intermediate sensitivity or resistance. Among recent group of samples some isolates were reported as resistant to chlortetracycline, danofloxacin, enrofloxacin, oxytetracycline and intermediate to tylosin. The MICs of the reference strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were within the recommended ranges (CLSI, 2008).

AFLP typing

Banding patterns of AFLP were obtained from all 151 isolates and generated 85 different profiles. The discriminatory index obtained by AFLP was 0.98. The generated dendrogram (Figure 1) highlighted the distribution of 151 isolates tested in two main groups (I and II) and group I comprised five isolates, which were representatives of *E. tonsillarum* species (four of these represented

serotype 7 and the last isolate belonged to serotype 25). Group II took over the remaining 146 isolates tested, distributed over 80 different profiles. Isolates collected from the same clinical specimen were grouped within the same AFLP profile, in other words, were genotypically identical. Although the groups obtained by AFLP did not follow an epidemiological pattern of grouping, the technique was able to cluster small, discrete and isolated groups according to serotype, animal health condition and year and place of isolation (Figure 1).

PFGE typing

The discriminatory index obtained by PFGE was 0.98 and its dendrogram is presented in Figure 2. Of all tested strains only one did not form electrophoretical profile and from the remaining 150 isolates were observed 94 different profiles. Clusters were formed according to serotypes; despite it had not happened in absolute form. Strains from same animal specimen were genotypically identical and assigned to same profile. Although relative clusters were formed according to animal health status as well as year and place of isolation, there was no clear epidemiological pattern of grouping. As AFLP, PFGE also grouped together the serotype 7 strains (*E. tonsillarum*), but it allocated three of them in a single profile and the last one was positioned in a different and distant profile from the other serotype 7 strains. The three serotype 7 strains that were allocated in the same profile represent strains from Rio Grande do Sul State / Brazil, while the last serotype 7 strain were from Australia, meaning PFGE was able to discriminate among the serotype 7 strains according to geographical origins of isolation. The isolated of serotype 25 (also *E. rhusiopathiae*) was allocated in PFGE dendrogram close to the distinct and far profile of serotype 7 strain of Australia.

DISCUSSION

The relationship observed in this study between the results of serotyping and PCR to determine the species of *Erysipelothrix* agreed partly with suggested by Takahashi et al. (1992), that postulated *E. tonsillarum* could be distinguished from *E. rhusiopathiae* by serotyping. Thus, the *E. rhusiopathiae* species would included serotypes 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 and N, while the species *E. tonsillarum* would be constituted by serotypes 3, 7, 10, 14, 20, 22 and 23. Other authors suggested the serotyping might be a questionable method in identifying *Erysipelothrix* species (Chooromoney et al. 1994; Ahrne et al. 1995; Takahashi et al., 2008). Takahashi et al. (2008) suggested that serotyping of *Erysipelothrix* spp. is not an absolute or essential taxonomic tool and should be considered of lesser magnitude ahead molecular methods to process species identification. The sensitivity and resistance presented by isolates against the tested antimicrobials were expected and were in according to previous reports (Venditti et al., 1999; De Rosa et al., 2000; Yamamoto et al., 2001; Fidalgo et al., 2002; Jones et al., 2002). Tulathromycin is a fairly recent semi synthetic macrolide and has been widely used in swine for treatment and prevention of respiratory diseases. There are no reports in literature about tulathromycin trials against *E. rhusiopathiae*, but this study verified the good antimicrobial action of this principle against it. Antimicrobial susceptibility testing was not a useful method for subtyping of *Erysipelothrix* spp., as most isolates in this study presented similar results. This kind of occurrence was also reported by other studies (Opriessnig et al. 2004, Eriksson et al. 2009). In view of the evolution of the susceptibility profiles of chlortetracycline, danofloxacin, enrofloxacin, oxytetracycline and tylosin, the choice of these antimicrobial agents for *Erysipelothrix* spp. control should be evaluated carefully. The pressure of the indiscriminate use of antimicrobial agents over the years in pigs should be associated with these changes over susceptibility profiles (Takahashi et al., 1984). Opriessnig et al. (2004) evaluating historical and recent isolates of *E. rhusiopathiae* stated that susceptibility profiles remained stable over time, except for oxytetracycline, chlortetracycline, florfenicol,

gentamicin, and trimethoprim. The results presented here suggest that AFLP as well as PFGE were techniques highly discriminatory, since both presented 0.98 of discriminatory index. The acceptable level of discrimination will depend on a number of factors, but an index of greater than 0.90 would seem to be desirable if the typing results are to be interpreted with confidence (Hunter and Gaston, 1988). The detection of different profiles in isolates of same serotype, animal health condition and year or place of isolation also helps to suggest the high discriminatory power of the methods. Both techniques, AFLP and PFGE, did not cluster the *Erysipelothrix* spp. isolates according to serotype, origin, disease or isolation data, as could be desired, meaning that these methods were not able to profile this bacterium genus in an epidemiological pattern of grouping or that the variability of the microorganism are too large. However, AFLP still was an alternative to other molecular methods to discriminate between *E. rhusiopathiae* and *E. tonsillarum*, since it clustered *E. tonsillarum* strains in an isolated group. At the same time, PFGE demonstrated the competency of clustering, in relative terms, strains of same serotype within a profile or contiguous ones. Other authors (Opriessnig et al. 2004, Eriksson et al. 2009) reported that serotypes followed no specific pattern within PFGE dendrogram and were distributed throughout it. In both studies (Opriessnig et al., 2004; Eriksson et al., 2009) the variety of serotypes involved was small, which might have led researchers to conclude that serotyping was unsuitable to epidemiological studies. Possibly, the serotype clusters found in the present study were evident due to the greater variability of serotypes among the examined samples. Opriessnig et al. (2004) also compared historical and recent strains of *E. rhusiopathiae* by PFGE and they reported no changes in terms of genotype among the isolates, despite of reduced number of historical strains available. The number of historical isolates employed in this study was 59 (39.1%) and the absence of clusters for the year of isolation was also observed. This finding refutes speculation about the emergence new strains of *E. rhusiopathiae* circulating in Brazilian swine farms and that they are responsible for the resurgence of swine erysipelas outbreaks. For phylogenetics purpose of study other techniques should be applied as the already successful described RAPD (Eamens et al., 2006). PFGE and AFLP did not discriminate

isolates from the same animal specimen, allocating them in the same profile. However, this result does not guarantee that animals are always infected with clonal populations of *Erysipelothrix* spp., since the harvest of more than one colony from infected specimen submitted the two techniques were performed in only four occasions and reports about this type of event are absent in literature. Although the AFLP showed itself as a good method for typing *Erysipelothrix* spp., presenting discriminatory index identical to the PFGE, the last method was considered a better choice for *Erysipelothrix* spp. genotyping, since it clustered, relatively, the isolates according to serotypes and segregated the *E. tonsillarum* isolates, as AFLP, but still made discrimination among them by geographic matters.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Research Project 06/55502-7.

REFERENCES

- Ahrné S, Stenström I-M, Jensen N E, Pettersson B, Uhlen M, Molin G (1995) Classification of *Erysipelothrix* strains on the basis of restriction fragment length polymorphisms. *Int J Syst Bacteriol* 45:382-385.
- Chang N, Chui L (1998) A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Diagn Micr Infec Dis* 31:275-279.
- Chooromoney K N, Hampson D J, Eamens G J, Turner M J (1994) Analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Erysipelothrix tonsillarum* by Multilocus Enzyme Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 32:371-376.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): 2005, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Fifteenth Informational Supplement, approved standard, M100-S15. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): 2008, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 3rd ed., approved standard, M31-A3. CLSI, Wayne, PA.
- De Rosa D C, Veenhuizen M F, Bade D J, Shryock T R (2000) *In vitro* susceptibility of porcine respiratory pathogens to tilmicosin. *J Vet Diagn Invest* 12:541-546.
- Eamens G J, Forbes W A, Djordjevic S P (2006) Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. *Vet Microbiol* 115:329-338.
- Eriksson H, Jansson D S, Johansson K-E, Båverud V, Chirico J, Aspán A (2009) Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from poultry, pigs, emus, the poultry red mite and other animals. *Vet Microbiol* 137:98-104.
- Fidalgo S G, Longbottom C J, Riley T V (2002) Susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to antimicrobial agents and home disinfectants. *Pathology* 34:462-465.
- Hassanein R, Sawada T, Kataoka Y, Gadallah A, Suzuki Y (2003) Molecular identification of *Erysipelothrix* isolates from the tonsils of healthy cattle by PCR. *Vet Microbiol* 95:239-245.

- Hunter PR, Gaston M A (1988) Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26:2465-2466.
- Jones R N, Pfaller M A, Rhomberg P R, Walter D H (2002) Tiamulin activity against fastidious and nonfastidious veterinary and human bacterial isolates: initial development of *in vitro* susceptibility test methods. *J Clin Microbiol* 40:461-465.
- Kucsera G (1973) Proposal for standardization of the designations used for serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Migula) Buchanan. *Int J Syst Bacteriol* 23:184-188.
- Makino S, Okada Y, Maruyama T, Ishikawa K, Takahashi T, Nakamura M, Ezaki T, Morita H (1994) Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. *J Clin microbial* 32:1526-1531.
- Mclauchlin J, Ripabelli G, Brett M M, Threlfall E J (2000) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *Int J Food Microbiol* 56:21-28.
- Nakazawa H, Hayashidani H, Higashi J, Kaneko K-I, Takahashi T, Ogawa M (1998) Occurrence of *Erysiploethrix* spp. in chicken meat parts from a processing plant. *J Food Protect* 61:1207-1209.
- Okatani A T, Uto T, Taniguchi T, Horisaka T, Horikita T, Kaneko K-I, Hayashidani H (2001) Pulsed-field gel electrophoresis in differentiation of *Erysipelothrix* species strains. *J Clin Microbiol* 39: 4032-4036.
- Opriessnig T, Hoffman L J, Harris D L, Gaul S B, Halbur P G (2004) *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. *J Vet Diagn Invest* 16:101-107.
- Shimoji Y, Mori Y, Hyakutake K, Sekizaki T, Yokomizo Y(1998) Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. *J Clin Microbiol* 36:86-89.
- Takahashi T, Sawada T, Ohmae K, Terakado N, Muramatsu M, Seto K, Maruyama T, Kanzaki M (1984) Antibiotic resistance of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from pigs with acute septicemic erysipelas. *Jpn J Vet Sci* 46:921-923.

- Takahashi T, Fujisawa T, Benno Y, Tamura Y, Sawada T, Suzuki S, Muramatsu M, Mitsuoka T (1987) *Erysipelothrix tonsillarum* sp. nov. isolated from tonsils of apparently healthy pigs. *Int J Syst Bacteriol* 37:166-168.
- Takahashi T, Fujisawa T, Tamura Y, Suzuki S, Muramatsu M, Sawada T, Benno Y, Mitsuoka T (1992) DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. *Int J Syst Bacteriol* 42:469-473.
- Takahashi T, Nagamine N, Kijima M, Suzuki S, Takagi M, Tamura Y, Nakamura M, Muramatsu M, Sawada T. (1996) Serovars of *Erysipelothrix* strains isolated from pigs affected with erysipelas in Japan. *J Vet Med Sci* 58:587-589.
- Takahashi T, Fujisawa T, Umeno A, Kozasa T, Yamamoto K, Sawada T (2008) A taxonomic study on *Erysipelothrix* by DNA-DNA hybridization experiments with numerous strains isolated from extensive origins. *Microbiol Immunol* 52:469-478.
- Takahashi T, Fujisawa T, Yamamoto K, Kijima M, Takahashi T (2000) Taxonomic evidence that serovar 7 of *Erysipelothrix* strains isolated from dogs with endocarditis are *Erysipelothrix tonsillarum*. *J Vet Med B* 47:311-313.
- Venditti M, Gelfusa V, Tarasi A, Brandimarte C, Serra P (1990) Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2038-2040.
- Verbarg S, Rheims H, Emus S, Frühling A, Kroppenstedt R M, Stackebrandt E, Schumann P (2004) *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth and description of Erysipelotrichaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Micr* 54:221-225.
- Wood R L (1999) Erysipelas. In: *Diseases of Swine*. Eds, B Straw et al. Ames, Iowa: Iowa State University Press, pp 419-430.
- Yamamoto K, Kijima M, Yoshimura H, Takahashi T (2001) Antimicrobial Susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan, 1988-1998. *J Vet Med B* 48:115-126.

Table 1. Results of MIC determination of 18 antimicrobial agents for 151 *Erysipelothrix* spp. isolates

Antimicrobial agent	MIC (µg/mL)								Interpretation
	Range tested	Range results	Mode	MIC ₅₀ ^a	MIC ₉₀ ^a	Criteria ^b			
						S ^c	I ^d	R ^e	
Ampicillin	0.25 - 16	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	0.5 - 4	≥ 8	S
Ceftiofur	0.25 - 8	≤ 0.25 - 1	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 2	4	≥ 8	S
Clindamycin	0.25 - 16	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.5	1 - 2	≥ 5	S
Chlortetracycline	0.5 – 8	≤ 0.5 - □ 8	≤ 0.5	≤ 0.5	□ 8	≤ 4	8	≥ 16	S
Cotrimoxazole ^f	2/38	□ 2/38	□ 2/38	□ 2/38	□ 2/38	≤ 2/38	-	≥ 4/76	R
Danofloxacin	0.12 – 1	≤ 0.12 - □ 1	0.25	0.25	□ 1	≤ 0.25	-	-	S
Enrofloxacin	0.12 - 2	≤ 0.12 - □ 2	0.25	0.25	□ 2	≤ 0.25	0.5 - 1	≥ 2	S
Florfenicol	0.25 – 8	2 - 4	0.25	4	4	≤ 4	8	≥ 16	S
Gentamycin	1 - 16	□ 16	□ 16	□ 16	□ 16	≤ 2	4	≥ 8	R
Neomycin	4 - 32	□ 32	□ 32	□ 32	□ 32	≤ 8	-	-	R
Oxytatreacycline	0.5 – 8	≤ 0.5 - □ 8	1	2	□ 8	≤ 4	8	≥ 16	S
Penicillin	0.12 – 8	≤ 0.12	0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	-	S
Spectinomycin	8 – 64	≤ 8 - □ 64	32	32	32	≤ 32	64	≥ 128	S
Sulfadimethoxine	256	□ 256	□ 256	□ 256	□ 256	≤ 256	-	≥ 512	R
Tiamulin	0.5 – 32	≤ 0.5 - 8	4	4	4	≤ 16	-	≥ 32	S
Tilmicosin	4 – 64	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 16	-	≥ 32	S
Tulathromycin	1 – 64	≤ 1 - 8	4	4	8	≤ 16	32	≥ 64	S
Tylosin	0.5 - 32	≤ 0.5 - 4	≤ 0.5	≤ 0.5	2	≤ 1	2 - 4	□ 4	S

^a Concentrations at which 50 % and 90 % of the isolates respectively were inhibited

^b Tylosin criterion is according to Ronne and Szancer (1990), oxytetracycline criterion is according to M10-S5 Document of CLSI (2005) and the others antimicrobials criteria are according to M31-A3 Document of CLSI (2008). A specific criterion for chlortetracycline was not found, so the oxytetracycline criterium was used for it.

^c sensible, ^d intermediate, ^e resistant, ^f association of trimethoprim and sulfamethoxazole

¹ number of isolates per generated profile, ² C= carrier swine, D= diseased swine, N= not known, ³ 1980 = before 1980,

⁴ RS= Rio Grande do Sul, AUS= Australia, SP= São Paulo e UK= United Kingdom.

Figure 1. Dendrogram showing the relationship between *E. rhusiopathiae* and *E. tonsillarum* isolates on the basis of AFLP patterns. Percentages of similarity between patterns were calculated by use of Dice's coefficient. The dendrogram was constructed by use of UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average).

Figure 2. PFGE Dendrogram. Percentages of similarity between profiles were calculated by use of Dice's coefficient. The dendrogram was constructed by use of UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average).