

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

MONITORIA DA ERISPELA SUÍNA POR ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E MOLECULARES EM SUÍNOS DE ABATE DE GRANJAS DO RIO GRANDE DO SUL

S.J. de Oliveira¹, P.C. Rodrigues¹, A.T. Okatani², V.R. Lunge³¹Universidade Luterana do Brasil, Hospital Veterinário, Laboratório de Bacteriologia e Micologia, Av. Farroupilha, 8001, CEP 92425-900, Canoas, RS, Brasil. E-mail: serjol@terra.com.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de *Erysipelothrix* spp. em suínos abatidos em frigorífico, procedentes de granjas que usam ou não a vacinação e desenvolver técnica de *nested* PCR baseada na amplificação do gene do antígeno protetor de superfície (*spaA*) específico de *Erysipelothrix rhusiopathiae* e testar a sua utilização na análise de culturas padrão. Foram isoladas 56 (14,9%) amostras de *Erysipelothrix* spp. de tonsilas de suínos abatidos em frigorífico no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo 13/275 de suínos vacinados (4,7%) entre 275 tonsilas e 43/100 de suínos não vacinados (43%), bem como foi obtido um isolado de lesão de pele também colhida em frigorífico. Os micro-organismos foram identificados por características fenotípicas por meio de exame bacteriológico e foi realizado teste de *nested* PCR em 13 isolados de suínos procedentes de granjas que utilizavam vacinação contra a erisipela suína, sendo positivo para 8 isolados, classificados como *E. rhusiopathiae*. As oito amostras confirmaram a classificação como *E. rhusiopathiae* também por exames sorológicos. Entre as amostras isoladas de suínos não vacinados, foram testados, por sorologia e PCR, 19 cultivos de *Erysipelothrix* spp., sendo classificados 9 como *E. rhusiopathiae* por ambos os testes, todos do sorotipo 2 e 7 negativos. Três isolados de *Erysipelothrix* sp. foram positivos somente por PCR e negativos por imunodifusão para os sorotipos 1A, 1B e 2, que são os encontrados com maior frequência em casos clínicos de erisipela suína.

PALAVRAS-CHAVE: Erisipela suína, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, tonsilas, suínos vacinados, *nested* PCR.

ABSTRACT

SURVEILLANCE OF SWINE ERYSIPELAS BY BACTERIOLOGIC AND MOLECULAR ANALYSIS ON SLAUGHTERED PIGS FROM FARMS IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL. The objective of the present work was to detect *Erysipelothrix* spp in slaughtered pigs, from erysipelas-vaccinated and nonvaccinated herds, developing nested PCR based on the amplification of the surface protective antigen (*spa A*) gene specific for *E. rhusiopathiae*. Samples of *Erysipelothrix* spp. were isolated from the tonsils of slaughtered pigs in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, respectively 13 (4.7%) from vaccinated (total of 275 tonsils examined) and 43 (43%) from nonvaccinated pigs (100 tonsils examined). Also 1 isolate from a skin lesion was obtained from the abattoir. *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from vaccinated pigs (8 samples) were identified by phenotypic characteristics and by nested PCR. Identical results were obtained by serological classification, showing the usefulness of the molecular test. Nineteen strains isolated from nonvaccinated pigs were examined by serology and PCR. Results for both tests identified serotype 2 of *E. rhusiopathiae* in 9 samples, there being 7 nonreactors to the tests. Three isolates were positive only by PCR and negative by the immunodiffusion test.

KEY WORDS: Swine erysipelas, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, tonsils, vaccinated pigs, nested PCR.

Bactérias do gênero *Erysipelothrix* causam a erisipela suína. Atualmente, reconhece-se 24 sorotipos (TAKAHASHI *et al.*, 1992), distribuídos entre as espécies *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Sorotipos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9,

11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21 e N) e *E. tonsillarum* (Sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22 e 23). No Brasil, foram classificadas sorologicamente amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de tonsila, baço e fezes de

²Azabu University, Sagamihara, Kanagawa, Japão.

³Universidade Luterana do Brasil, Simbios Biotecnologia, Hospital de Clínicas, Laboratório de Diagnóstico Molecular, Canoas, RS, Brasil.

suínos e da superfície corporal de peixes, demonstrando a presença dos Sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11 e N (BARCELLOS *et al.*, 1984; ALBERTON *et al.*, 2003). Na época em que foram isoladas e classificadas as bactérias por CASTRO *et al.* (1972) e BARCELLOS *et al.* (1984) ainda não era conhecida a espécie *E. tonsillarum*, pois esta foi identificada pelo genoma em 1987 por TAKAHASHI *et al.* (1987). A comprovação laboratorial da presença dessas bactérias normalmente é realizada por isolamento a partir de tonsilas, lesões de pele, baço ou fezes em cultura em meio líquido adicionado de antibióticos e realização de repiques para meio sólido de agar sangue (OLIVEIRA, 2000). A identificação da espécie e sorovares dependem da caracterização sorológica de imunodifusão em gel (TAKAHASHI *et al.*, 1989). MAKINO *et al.* (1994) desenvolveram um teste de PCR com primers para detecção do gênero, sem distinção das espécies das bactérias. Testes de PCR foram desenvolvidos posteriormente visando a identificação de espécies (SHIMOJI *et al.*, 1998; TAKESHI *et al.*, 1999). O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de *Erysipelothrix* spp. em suínos abatidos em frigorífico, procedentes de granjas que usam ou não a vacinação, desenvolver técnica de *nested* PCR baseada na amplificação do gene do antígeno protetor de superfície (*spaA*) específico de *E. rhusiopathiae* e testar a sua utilização na análise de culturas padrão e de isolados de tonsilas de suínos.

Foram trabalhadas 375 tonsilas de suínos colhidas em dois frigoríficos no Rio Grande do Sul, respectivamente, 275 de granjas que vacinam contra erisipela e 100 de granjas que não vacinam. Cada tonsila foi colhida e embalada em plástico individualmente, sendo processada duas horas após no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), como segue: a superfície era flambada e era feito um corte com bisturi estéril, colhendo-se material com "swab" estéril, sendo inoculado em meio de cultura líquido de BHI em tubos, adicionado de soro equino (5%) e antibióticos canamicina (400 mg/L), gentamicina, (25 mg/L), vancomicina, (25 mg/L), sendo incubado a 37°C por 48 horas em aerobiose (OLIVEIRA, 2000). Após esse período, inoculava-se em agar base enriquecido com 8% de sangue de carneiro incubando-se igualmente a 37°C. Bactérias foram identificadas baseando-se na apresentação de hemólise fraca em agar sangue, tipo de colônias e através de microscopia em lâminas coradas pelo Gram, provas de catalase e oxidase, inoculação em TSI (CASTRO *et al.*, 1972). Foram consideradas para identificação de gênero reação negativa para catalase e oxidase e produção de H₂S de forma a revelar coloração escura (negra) em meio de

TSI apenas na linha de semeadura (bactérias imóveis, positivas para gás sulfídrico).

Os isolados de *Erysipelothrix* spp. foram transferidos para meio BHI e centrifugados, conservando-se o sedimento congelado a -20°C para realização de exames por PCR. Em paralelo, sequências nucleotídicas do gene *spaA* de *E. rhusiopathiae* foram obtidas de bancos de dados de genes e avaliadas para a seleção de iniciadores (*primers*) específicos. Os *primers* escolhidos (Eris 1F: 5'GTGAATTACGAGGTGAAA CACCG3', Eris 2R: 5'CGATTTCTCCGCATAGCA TAAAG3', Eris 3F: 5'TCGTAGTATGAA TGA AAT TGCTGCAG3' e Eris 4R: 5'GCCGGTTATAGTCAA TAAACTCGCTG3') foram sintetizados por empresa especializada (Applied Biosystems) e utilizados numa reação de *nested* PCR (dupla amplificação). Testes pilotos para a implementação e determinação das condições de amplificação da técnica de *nested* PCR foram realizados com cepas de referência de *E. rhusiopathiae* (Sorovares 1A e 2), *E. tonsillarum* (Amostra 10) e outras bactérias (*Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Corynebacterium* sp.). Os produtos amplificados (Fragmentos de 155 pares de bases) foram visualizados após eletroforese em gel de poli-acrilamida e coloração com prata (SAMBROOK *et al.*, 1989). A técnica de *nested* PCR foi utilizada para caracterizar os isolados de *Erysipelothrix* spp. obtidos de suínos abatidos em frigorífico. Estes isolados foram também enviados à Azabu University (Japão) visando a classificação sorológica sendo testadas frente a antissoros 2, 1A e 1B (amostras patogênicas mais frequentes).

Foram isoladas 56 (14,9%) amostras de *Erysipelothrix* spp., de tonsilas de suínos abatidos em frigorífico, respectivamente, 13 de suínos vacinados (4,7% entre 275 tonsilas trabalhadas) e 43 de suínos não vacinados (43% entre 100 tonsilas), bem como foi obtido um isolado de lesão de pele também colhida em frigorífico. Foi realizado teste de *nested* PCR em 13 amostras isoladas de suínos procedentes de granjas que utilizavam vacinação contra a erisipela, sendo positivo para oito isolados, classificados como *E. rhusiopathiae* (Tabela 1). As oito amostras confirmaram a classificação como *E. rhusiopathiae* também nos testes sorológicos, tendo sido classificadas como sorotipo 2 (5 amostras) e sorotipo 1B (3 amostras). Apenas 32 amostras de isolados foram recuperadas após o envio ao Japão, sendo estas então testadas por sorologia naquele país (19 de suínos de granjas que não vacinavam contra a erisipela e 13 de granjas que vacinavam). Assim sendo, optou-se por considerar os resultados comparativos de PCR e sorologia naquelas amostras (Tabelas 1 e 2).

O teste de PCR demonstrou ser de utilidade para detecção de *E. rhusiopathiae* (amplificação de frag-

mento do tamanho esperado de 155 pares de bases), não detectando *E. tonsillarum* e bactérias de outros gêneros. Embora a amostra classificada por sorologia como sendo Sorovar 10, portanto *E. tonsillarum*, não apresentou o produto de PCR observado em amostras de *E. rhusiopathiae*, seria importante verificar a que sorovar pertencem os isolados que igualmente não apresentaram aquele produto, o que não foi possível, visto que a sorologia foi realizada somente para detectar amostras patogênicas de ocorrência mais frequente em suínos. Na Tabela 2 observa-se que entre 19 amostras testadas por PCR e sorologia, isoladas de suínos de granjas que não vacinavam contra a erisipela, em apenas três casos houve resultados diferentes comparando os testes, isto é, essas amostras foram positivas no PCR e negativas na sorologia. Isto não significa que as amostras não sejam *E. rhusiopathiae*, pois testaram-se apenas para os sorotipos mais frequentes. Há grande possibilidade destas serem classificadas como outros sorotipos cujos antissoros não foram incluídos no teste. Conforme as Tabelas 1 e 2, houve concordância na identificação pelos dois testes, negativos e positivos com predominância do Sorotipo 2 e apenas 3 amostras classificadas como 1B. Desde a utilização de testes moleculares para classificação de *Erysipelothrix* spp., sendo identificada a espécie *E. tonsillarum* (TAKAHASHI *et al.* 1987), até o momento não havia sido confirmada por PCR a presença desta espécie no Brasil, tendo sido considerada a existência de apenas *E. rhusiopathiae* apresentando maior ou menor patogenicidade (CASTRO *et al.*, 1972; BARCELLOS *et al.*, 1984). O teste específico para *E. rhusiopathiae*, desenvolvido no presente trabalho, significa o primeiro passo para a identificação das espécies deste gênero de bactérias. Por meio de PCR constatou-se neste trabalho que oito amostras de *E. rhusiopathiae* estavam presentes nas tonsilas de suínos procedentes de granjas que utilizam vacinação. As perdas econômicas por erisipela suína não estão ainda bem mensuradas, principalmente quanto à ocorrência de artrites constatadas em frigorífico. Em relato de ALBERTON *et al.* (2003) em Santa Catarina, foi isolado *E. rhusiopathiae* de 14% dos casos de artrite infecciosa. A elevada taxa de isolamentos de *Erysipelothrix* spp. de tonsilas de suínos, procedentes de granjas que não utilizavam vacinação contra a erisipela suína (43%), sugere que sejam acompanhados os suínos nas granjas, em próxima pesquisa, para estudos sobre ocorrência de sinais clínicos, mortes por septicemia, problemas reprodutivos e verificação de artrite em suínos de abate. Os testes moleculares poderão ser de grande utilidade quando em um futuro breve seja obtido diagnóstico por meio do exame direto em tonsilas, articulações ou vísceras.

Tabela 1 - Resultados da identificação de amostras de *Erysipelothrix* spp. testadas por PCR e sorologia, isoladas de suínos procedentes de granjas que utilizavam vacinação contra a erisipela.

Amostras	Nested PCR	Sorologia	Identificação
65 S	positivo	positivo	Sorotipo 2
69 S	positivo	positivo	Sorotipo 2
82 S	positivo	positivo	Sorotipo 2
88 S	positivo	positivo	Sorotipo 2
118 S	positivo	positivo	Sorotipo 2
148 G	positivo	positivo	Sorotipo 1B
151 S	positivo	positivo	Sorotipo 1B
157 S	positivo	positivo	Sorotipo 1B
51 G	negativo	negativo	-
97 S	negativo	negativo	-
105 G	negativo	negativo	-
162 S	negativo	negativo	-
172 S	negativo	negativo	-

Tabela 2 - Resultados da identificação de amostras de *Erysipelothrix* spp. testadas por PCR e sorologia, isoladas de suínos procedentes de granjas que não utilizavam vacinação contra a erisipela.

Amostras	Nested PCR	Sorologia	Identificação sorológica
V4	negativo	negativo	-
V9	negativo	negativo	-
V12	positivo	positivo	Sorotipo 2
V14	negativo	negativo	-
V17	positivo	positivo	Sorotipo 2
V18	positivo	negativo	?
V19	positivo	positivo	Sorotipo 2
V20	negativo	negativo	-
V23	positivo	positivo	Sorotipo 2
V29	negativo	negativo	-
V51	positivo	positivo	Sorotipo 2
V55	negativo	negativo	-
V56	positivo	positivo	Sorotipo 2
V57	positivo	negativo	?
V59	positivo	positivo	Sorotipo 2
V60	positivo	positivo	Sorotipo 2
V61	positivo	positivo	Sorotipo 2
V64	negativo	negativo	-
V91	positivo	negativo	?

Foi desenvolvido teste de PCR específico para *E. rhusiopathiae* e através deste teste foi, possível identificar a bactéria a partir de isolados de tonsilas de suínos. É importante a presença de amostras potencialmente patogênicas em suínos vacinados, estes sendo portadores, demonstrando a possibilidade de

ocorrência de sinais clínicos e perdas nas granjas, em suínos introduzidos no rebanho, não imunizados (suscetíveis). *Erysipelothrix* spp. foram detectadas em suínos procedentes de granjas que não utilizaram vacinação contra a erisipela, sendo muito elevada a taxa de portadores das bactérias. Os resultados indicam que deve merecer atenção a ocorrência de bactérias do gênero *Erysipelothrix* spp. em suínos no Rio Grande do Sul, sugerindo a realização de pesquisas para a prevenção de infecções.

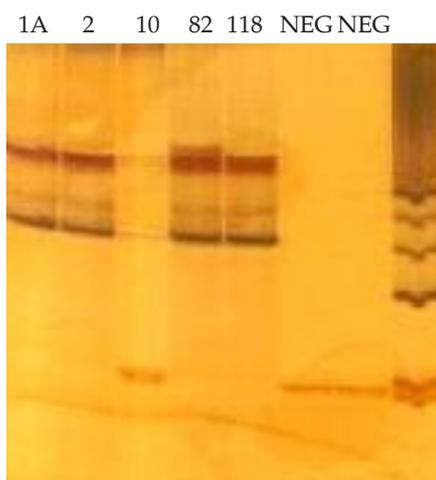


Fig. 1 - Nested PCR, observando-se produtos em 155 pb para as amostras de *Erysipelothrix rhusiopathiae* classificadas como 1A e 2 (padrões positivos), bem como para os isolados 82 e 118, de granjas que utilizam vacinação. Observaram-se resultados negativos (NEG) para a amostra sorotipo 10 (padrão) de *E. tonsillarum* bem como para *Pseudomonas aeruginosa* e *Arcanobacterium pyogenes*.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Auxiliar de Laboratório Jane Mendez Brasil e ao aluno do Curso de Medicina Veterinária da ULBRA e Bolsista de Iniciação Científica Vilson Benedito da Silva Júnior, pelos serviços em bacteriologia.

REFERÊNCIAS

- ALBERTON, G.C.; BANDARRA, E.P.; PIFFER, I.; MORES, M.A.Z.; PEREIRA M.C.; YAMAMOTO, M.T. Exame anatomopatológico, microbiológico, citológico e físico-químico das articulações de suínos artríticos no matadouro. *Archives of Veterinary Science*, v.8, n.1, p.81-91, 2003.
- 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.
- CASTRO, A.F.P.; TRABULSI, L.R.; CAMPEDELLI, F.O.; TROISE, C. Characteristics of strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated in Brazil. *Revista de Microbiologia*, v.3, p.11-24, 1972.
- MAKINO, S.; OKADA, Y.; MARUYAMA, T.; ISHIKAWA, K.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, M.; EZAKI, T.; MORITA, H. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.1526-1531, 1994.
- OLIVEIRA, S.J. *Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático*. 2.ed. Canoas: Editora da Universidade Luterana do Brasil, 2000. 237p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
- SHIMOJI, Y.; MORI, Y.; HYAKUTAKE, K.; SAKIZAKI, 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.
- TAKAHASHI, T.; FUJISA, W.AT.; BENNO, Y.; TAMURA, T.; SAWADA, S.; SUZUKI, M.; 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, 1987.
- TAKAHASHI, T.; ZARKASIE, K.; MARIANA, S.; SUMADI, M.; 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.
- 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.
- 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, n.12, p.4093-4098, 1999.

Recebido em 20/8/08

Aceito em 5/8/09