

GRACIELA BERGAMASCHI PEZERICO

**ISOLAMENTO DE *Erysipelothrix* sp. DE TONSILAS DE
SUÍNOS EM FRIGORÍFICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

DEDICATÓRIA

“A Deus, pela perseverança, força e por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais;

A minha mãezinha, pelos ensinamentos, dedicação, amor, compreensão e razão de minha existência;

Ao meu pai, pelo apoio e carinho;

Aos meus admiráveis irmãos, Sandia e Ronaldo, pelo estímulo e carinho;

Ao meu irmãozinho Giovanne, pela sua alegria;

A minha madrinha Divina, pelo carinho e companheirismo;

À tia Neide, pela enorme amizade a minha família;

Às amigas Tércia, Walda, Fernanda e Karlinha, pela força;

A minhas colegas de república, pela amizade e agradável convivência;

E ao meu grande amor Ivson, pela paciência e cumplicidade.”

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pelo oferecimento do curso de Mestrado em Medicina Veterinária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela concessão da bolsa de pesquisa.

Aos Estabelecimentos de Carne e Derivados, por permitirem a realização das coletas.

Aos proprietários e funcionários do Laboratório MICROVET®, pela orientação laboratorial e apoio na liofilização das amostras isoladas.

Ao Prof. José Lúcio dos Santos, pela orientação científica, apoio nas atividades de pesquisa e ensinamentos de cunho profissional.

A Prof^ª. Paula Dias Bevilacqua, pela enorme ajuda nas análises estatísticas e na correção da dissertação.

Ao Prof. Walter Vieira Guimarães, pelas sugestões na elaboração da dissertação.

Ao Prof. Mauro Pires Moraes, pela ajuda solicitada diversas vezes.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária da UFV, em especial, ao Luís Carlos, Batalha, Ademir, Renato, Luís Márcio, Zé de Oliveira, Maninha, Heloísa e à querida Rose, pela amizade cultivada e imprescindível ajuda.

A minha admirável irmã Sandia, pelas sugestões e correção da dissertação.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA

GRACIELA BERGAMASCHI PEZERICO, filha de Dinorá Bergamaschi e Dilermando Ângelo Pezerico, nasceu em Dourados – MS, em 04 de novembro de 1978.

Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa – MG, em 10 de maio de 2002.

Ingressou no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - MG, em Setembro de 2002.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Características culturais	03
2.2. Características celulares	03
2.3. Características sorológicas	04
2.4. Características biológicas	06
2.5. Características bioquímicas	09
2.6. Erisipela suína	10
2.6.1. Histórico	10
2.6.2. Epidemiologia	12
2.6.3. Patogenia	15
2.6.4. Sinais clínicos	16
2.6.5. Patologia	18
2.6.6. Diagnóstico	18
2.6.6.1. Técnicas de isolamento	19
2.6.7. Prevenção	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Seleção dos locais de coleta	23
3.2. Seleção dos animais	23
3.3. Coleta das tonsilas	24
3.4. Processamento das tonsilas	24

3.4.1. Técnica de isolamento cristal violeta (CV) modificada	25
3.4.2. Técnica de isolamento triptose fosfato (TP)	25
3.5. Identificação das amostras isoladas	25
3.5.1. Avaliação das características culturais	25
3.5.2. Avaliação das características celulares	26
3.5.3. Avaliação das características bioquímicas	28
3.6. Liofilização das amostras	30
3.7. Análise dos dados	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Frequência de suínos portadores de <i>Erysipelothrix</i> sp. nas tonsilas segundo a técnica de isolamento	31
4.2. Frequência de suínos portadores de <i>Erysipelothrix</i> sp. nas tonsilas segundo a categoria produtiva	34
4.3. Frequência de suínos portadores de <i>Erysipelothrix</i> sp. nas tonsilas segundo a origem dos animais	37
4.4. Frequência de suínos portadores segundo a espécie de <i>Erysipelothrix</i>	40
4.5. Frequência de suínos portadores de <i>E. rhusiopathiae</i> nas tonsilas segundo a morfologia celular	42
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	45
6. BIBLIOGRAFIA	47
7. ANEXO	58
7.1. Relação dos reagentes utilizados	58
7.2. Elaboração de meios de cultura	58
7.2.1. Ágar e caldo triptose fosfato	58

7.2.2. TSI	59
7.2.3. Gelatina	59
7.2.4. BHI	59
7.2.5. Açúcares	60
7.2.5.1. Indicador de Andrade	60
7.2.5.2. Água peptonada	60
7.2.6. Coloração de gram	61
7.2.6.1. Fucsina	61
7.2.6.2. Cristal violeta	61
7.2.6.3. Lugol	61
8. APÊNDICE	62
8.1. Meio seletivo cristal violeta modificado	62
8.2. Custo de reagentes segundo a técnica	62
8.3. Tabela 04	63

RESUMO

PEZERICO, Graciela Bergamaschi, M. S. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004. **Isolamento de *Erysipelothrix* sp. de tonsilas de suínos em frigoríficos.** Orientador: José Lúcio dos Santos. Conselheiros: Paula Dias Bevilacqua e Walter Vieira Guimarães.

A erisipela suína, causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*, apresenta relevância pelas perdas econômicas relacionadas com os abortamentos e, principalmente, com o quadro crônico da doença em cevados, devido aos custos com o tratamento, à redução da taxa de crescimento e à pior qualidade da carcaça na tipificação. Embora *Erysipelothrix* sp. não seja uma bactéria muito exigente, há dificuldades associadas a sua identificação laboratorial. A escassez de dados sobre a epidemiologia da doença no plantel brasileiro, somada à importância econômica e sanitária do patógeno, reforçam a necessidade da realização de pesquisas de isolamento e de caracterização das amostras de *E. rhusiopathiae*. Os objetivos deste estudo foram: verificar a existência de suínos portadores de *E. rhusiopathiae* em regiões produtoras de suínos no país; verificar a taxa de isolamento de amostras de *Erysipelothrix* sp. de tonsilas de suínos aparentemente saudáveis, utilizando-se o meio seletivo cristal violeta (CV) modificado e o meio de enriquecimento triptose fosfato (TP); verificar a distribuição dos animais portadores, segundo as variáveis categoria produtiva (cevado e matriz), origem dos animais (estado da federação), técnica de isolamento (CV e TP), morfologia celular (lisa, lisa à intermediária, intermediária, intermediária à rugosa e rugosa) e espécie de *Erysipelothrix* (*E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum*). As tonsilas de 398 cevados, de ambos os sexos, e de 112 porcas reprodutoras descartadas, oriundas de 46 propriedades em 28 municípios dos estados de Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG), foram coletadas em estabelecimento de carne e derivados e processadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - MG. Os dados obtidos foram expressos pela taxa de frequência e avaliados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), através dos programas Epi Info versão 6.04b (WHO, 1997) e Bio Estat 2.0 (AYRES *et al.*, 2002). Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5% e um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Dos 510 suínos aparentemente saudáveis pesquisados, 99 (19,41%)

foram diagnosticados carreadores tonsilares de *Erysipelothrix* sp. A técnica CV diagnosticou 18,24% (93/510) de suínos portadores, enquanto que a TP diagnosticou 5,69% (29/510), havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre as percentagens de cada técnica. Não se observou diferença estatística ($p > 0,05$) quanto à frequência de suínos carreadores de *Erysipelothrix* sp. segundo a categoria produtiva, ressaltando que tanto os cevados como as matrizes assumem o status de disseminadores do microrganismo na granja. A percentagem de suínos portadores foi de 25,93% em GO, 23,08% no PR, 20,51% em MG, 14,67% em SP e 12,71% em MS, indicando que a presença do *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas de suínos aparentemente sadios não é um fenômeno local. Constatou-se maior percentagem (75,76%) de suínos carreadores exclusivamente de *E. rhusiopathiae*, e que os suínos podem ser portadores concomitantemente de *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum*. Avaliando-se a morfologia celular das amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas, a morfologia lisa (53,40%) foi a mais frequente, seguida da forma lisa à intermediária (27,18%). As morfologias intermediária e intermediária à rugosa apresentaram as menores percentagens (9,71%), enquanto que a forma rugosa não foi identificada em nenhuma amostra.

ABSTRACT

PEZERICO, Graciela Bergamaschi, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2004. **Isolation of *Erysipelothrix* sp. from tonsils of slaughter pigs.** Advisor: José Lúcio dos Santos. Committee members: Paula Dias Bevilacqua and Walter Vieira Guimarães.

Swine erysipelas, caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*, is responsible for enormous economic losses related to abortions and mainly to the chronic form of the disease, due to the costs of treatment, reduced growth rate and carcass's quality. Although *Erysipelothrix* sp. is not a demanding organism, there are difficulties associated to its laboratorial identification. Lack of information about epidemiology of swine erysipelas in Brazil and the economical and sanitary importance of this disease reveal the necessity of isolation studies and characterization of the *Erysipelothrix* sp. isolates. The objectives of the present study were to verify the existence of health carriers pigs of *E. rhusiopathiae* in swine producing regions; to verify isolation rate of *Erysipelothrix* sp. strains from the tonsils of apparently normal swine by the methods crystal violet selective modified media (CV) and tryptose phosphate enrichment media (TP); to investigate the distribution of carriers pigs according to productive category (finishing pig and sow), animal localization (state of federation), isolation method (CV and TP), cellular morphology (smooth, smooth-intermediate, intermediate, intermediate-rough and rough forms) and *Erysipelothrix* species (*E. rhusiopathiae* and *E. tonsillarum*). Tonsils from 398 finishing pigs, male and female, and 112 sows, obtained from 46 farms in 28 cities of Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), Paraná (PR), São Paulo (SP) and Minas Gerais (MG), were collected from slaughterhouses and were examined in the Laboratório de Microbiologia, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa – MG. Obtained data were expressed in frequency and analyzed by Qui-square test, using Epi Info version 6.04b (WHO, 1997) and Bio Estat 2.0 (AYRES *et al.*, 2002) programs, adopting significance level of 5%, with p value $\leq 0,05$ considered significant. Of 510 apparently health slaughter pigs, 99 (19,41%) were detected as carriers of *Erysipelothrix* sp. The percentage of isolation by CV technique was 18,24% (93/510), while TP technique was 5,69% (29/510). There was no difference of

tonsillar carriers of *Erysipelothrix* sp. according to the animal productive category ($p > 0,05$), suggesting that finishing pigs and sows may be potential source for infection to other animals in swine herds. The percentage of tonsillar carriers was 25,93% in GO, 23,08% in PR, 20,51% in MG, 14,67% in SP and 12,71% in MS, indicating that the presence of the organism is not a local phenomenon. It was observed mainly carriers pigs of only *E. rhusiopathiae* strains (75,76%), and it was demonstrated that slaughter pigs may be carriers of *E. rhusiopathiae* and *E. tonsillarum* simultaneously. In this study, the smooth form (53,4%) was predominant in samples of *E. rhusiopathiae*, followed by smooth-intermediate form (27,18%). Intermediate and intermediate-rough forms were observed with a low frequency (9,71%), while rough form was not identified in this report.

1. INTRODUÇÃO

Erysipelothrix rhusiopathiae é uma bactéria amplamente disseminada na natureza e tem sido isolada de uma grande variedade de animais domésticos e silvestres, incluindo mamíferos, pássaros, répteis, anfíbios, crustáceos e peixes, bem como de insetos, carne infectada, carcaças em decomposição e resíduos de abatedouros (WOOD, 1970; BRUNER & GRIFFITH, 1984; STENSTROM *et al.*, 1992; GYLES, 1993; ROBSON *et al.*, 1998). É agente etiológico de uma zoonose, o erisipelóide, e de enfermidades que acometem galinhas, patos, perus, avestruzes, bovinos, ovinos, caprinos, javalis, entre outras criações, porém são os suínos a espécie afetada com maior frequência e gravidade.

A erisipela suína, também denominada de ruiva suína, é manifestada pela septicemia subaguda e aguda, bem como por lesões crônicas proliferativas. É uma doença mundialmente distribuída e economicamente prejudicial para a atividade suinícola (WOOD, 1992).

As perdas econômicas estão relacionadas com os abortamentos, resultantes das formas aguda e subaguda, e, principalmente, com o quadro crônico da doença em suínos terminados, devido aos custos com a medicação dos animais enfermos, à redução da taxa de crescimento e à pior qualidade da carcaça. O uso frequente de vacina para o controle da doença também configura outro custo para a produção de suínos. Além disso, a erisipela é um entrave para a exportação de carne suína brasileira, uma vez que as barreiras sanitárias dos países importadores são rigorosas e há a tendência mundial pela demanda de alimentos produzidos com o uso mínimo de antibióticos.

Apesar de ser um microrganismo pouco exigente, há dificuldades associadas à identificação laboratorial de *Erysipelothrix* sp., devido ao tamanho reduzido de suas colônias e ao uso rotineiro de antibióticos na ração para a prevenção de doenças, em especial na terminação, inibindo assim, o crescimento do patógeno nos meios de cultivo. Além do mais, bactérias contaminantes e da microbiota normal que coabitam nas tonsilas e nas lesões podem mascarar ou mesmo impedir o desenvolvimento das colônias de *Erysipelothrix* sp. A baixa concentração do patógeno em animais aparentemente sadios também dificulta a identificação do estado de portador. Dessa forma, justificam-se o estudo e o

aperfeiçoamento de metodologias de isolamento desse patógeno, para se evitar diagnósticos falso-negativos.

Em diversos países, tais como Japão, Tailândia, Indonésia, Hungria, Estados Unidos, Austrália, Argentina e Chile, vários autores isolaram e caracterizaram amostras de *E. rhusiopathiae* de suínos clinicamente sadios, principalmente de tonsilas, ou de suínos apresentando quadro clínico agudo ou crônico. Nesses países, as características epidemiológicas da doença estão sendo bem estudadas (WOOD & HARRINGTON, 1978; EAMENS *et al.*, 1988; TAKAHASHI *et al.*, 1989; SÁNCHEZ *et al.*, 1991; TAKAHASHI *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 1999; COPES *et al.*, 2001; HASSANEIN *et al.*, 2001).

No Brasil, a erisipela suína também é um problema sanitário comumente observado nas granjas de todas as regiões produtoras de suínos, tanto é que a bacterina comercial e as vacinas autógenas são amplamente utilizadas para a prevenção da doença. Entretanto, há poucas informações a respeito da epidemiologia da doença no plantel brasileiro. Essa escassez de dados, somada à importância econômica e sanitária do patógeno, reforçam a necessidade da realização de pesquisas de isolamento e de caracterização das amostras de *E. rhusiopathiae* que acometem o plantel suíno brasileiro.

O **objetivo geral** do presente estudo foi verificar a existência de suínos portadores de *E. rhusiopathiae* em regiões produtoras de suínos no país.

Os **objetivos específicos** foram verificar a taxa de isolamento de *Erysipelothrix* sp. de tonsilas de suínos aparentemente sadios, utilizando-se as técnicas cristal violeta (CV) modificada e triptose fosfato (TP); e verificar a distribuição dos suínos portadores segundo as variáveis categoria produtiva (cevado e matriz), origem dos animais (estado da federação), técnica de isolamento (CV e TP), morfologia celular (lisa, lisa à intermediária, intermediária, intermediária à rugosa e rugosa) e espécie de *Erysipelothrix* (*E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O microrganismo *Erysipelothrix rhusiopathiae* é membro da família Corynebacteriaceae, ordem Eubacteriales e classe Schizomycetos (ALBUQUERQUE, 1957; WOOD, 1970).

Foi descrito como agente etiológico da erisipela suína em 1886 por LOEFFLER, citado por ROBSON *et al.* (1998). Inicialmente, o organismo foi denominado de *E. insidiosa*, entretanto, este termo foi substituído por *E. rhusiopathiae* em 1966 (BROOKE & RILEY, 1999).

No gênero *Erysipelothrix*, também é classificado o *Erysipelothrix tonsillarum* e são propostas outras espécies, ainda sem denominações (TAKAHASHI *et al.*, 1987; TAKAHASHI *et al.*, 1992; SHIMOJI, 2000; WANG *et al.*, 2002).

2.1. Características culturais

As colônias de *Erysipelothrix* sp. são puntiformes (0,1-0,5 mm de diâmetro após 24h de incubação; 0,5-1,5 mm após 48h), lisas ou rugosas, convexas e translúcidas. Inicialmente, mostram-se não hemolíticas em ágar sangue, mas após a permanência a 4°C e, posteriormente, em meio ambiente, desenvolvem hemólise parcial ou tipo α , caracterizada por pequeno halo esverdeado ao redor da colônia. As colônias rugosas não são hemolíticas (WOOD, 1999).

2.2. Características celulares

Erysipelothrix sp. é um bastonete delgado, gram-positivo, mas facilmente descolorido, especialmente em culturas velhas. É anaeróbio facultativo, imóvel, não produz esporos e não resiste em pH ácido. Sua morfologia é variável, tanto no tamanho (0,5 - 2,5 μm \times 0,2 - 0,3 μm) como na forma, e apresenta-se isolado, aos pares ou em pequenos agrupamentos celulares (ALBUQUERQUE, 1957; WOOD, 1970). Recentemente, verificou-se que é um microrganismo capsulado (SHIMOJI, 2000).

A morfologia celular está intimamente relacionada com as características culturais de cada forma: *lisa*, *intermediária* e *rugosa*. A apresentação lisa é de bastonetes curtos (2,5 µm de comprimento), retilíneos ou ligeiramente curvados. A forma rugosa exhibe morfologia predominantemente filamentosa, semelhante a de micélios fúngicos, apesar de não ocorrerem ramificações. Os filamentos podem ter comprimentos superiores a 60 µm e apresentam-se ligeiramente curvos ou em forma de V. A forma intermediária apresenta características de ambas as formas lisa e rugosa (ALBUQUERQUE, 1957; BROOKE & RILEY, 1999; WOOD, 1999).

Nas culturas jovens, são observadas normalmente colônias lisas. Com o envelhecimento da cultura, bem como em lesões crônicas e em subculturas resultantes de várias passagens em meios artificiais, o patógeno frequentemente é observado como bacilo gram-negativo e há acentuada tendência ao pleomorfismo (BERSANO *et al.*, 1982; WOOD, 1970; WOOD, 1999).

2.3. Características sorológicas

A estrutura antigênica do *Erysipelothrix* sp. é complexa. Existem antígenos termolábeis, comuns à maioria das amostras, e antígenos termoestáveis, considerados tipos específicos, que permitem a diferenciação sorológica entre as amostras. Algumas cepas não apresentam antígenos termoestáveis, sendo classificados como sorotipo N (WOOD, 1999).

A heterogeneidade do *E. insidiosa*, depois denominado de *E. rhusiopathiae*, foi reportada por WATTS (1940) e por ATKINSON (1941), citados por WOOD *et al.* (1978), quando verificaram dois grupos sorológicos distintos através de estudos de absorção de aglutininas.

KUCSERA (1973), citado por WOOD *et al.* (1978), reorganizou os sorotipos de *E. rhusiopathiae* até então isolados, eliminando as duplicações e introduzindo um sistema de designação numérica. Neste sistema, os sorotipos passaram a ser nomeados com números árabes e os subtipos por letras minúsculas, por exemplo, 1a, 1b, 2a, 2b, dessa forma, padronizando a nomenclatura e possibilitando a adição ilimitada de novos sorotipos, bem como a comparação de resultados de sorotipagens realizadas em diferentes laboratórios.

WOOD *et al.* (1978) reportaram quatro variantes de *Erysipelothrix* sp. com características antigênicas distintas dos 16 sorotipos até então conhecidos, e as designaram de sorotipos 17, 18, 19 e 20.

NORRUNG (1979), ao sorotipar um grupo de 16 amostras argentinas de *Erysipelothrix* sp., verificou dois sorotipos, até então não descritos, e os denominou de sorotipos 21 e 22.

NORRUNG & MOLIN (1991), citados por BROOKE & RILEY (1999), relatam que as amostras de *Erysipelothrix* sp. são classificadas nos sorotipos de 1 a 26.

Os estudos moleculares de hibridização de DNA (TAKAHASHI *et al.*, 1992), eletroforese em gel de poliacrilamida (TAMURA *et al.*, 1993) e análise enzimática por eletroforese (CHOOROMONEY *et al.*, 1994) classificaram os sorotipos 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21, 25 e N na espécie *E. rhusiopathiae*, e os sorotipos 3, 7, 10, 14, 20, 22, 23 e 24 no *E. tonsillarum*. Foram observados diferentes resultados para os sorotipos 13 e 18, sendo inferido que possam ser membros de novas distintas espécies do gênero (CHOOROMONEY *et al.*, 1994).

Os sorotipos 1 e 2 são considerados os principais agentes etiológicos do quadro clínico da erisipela suína (TAKAHASHI *et al.*, 1985; EAMENS *et al.*, 1988; TAKAHASHI *et al.*, 1989; WOOD, 1999). O sorotipo 1a é o mais prevalente na forma clínica aguda, enquanto que o sorotipo 2a nos quadros crônicos da doença (KUCSERA, 1979; AMASS, 1998). Entretanto, ambos os sorotipos são capazes de causar todas as formas da doença (CHOOROMONEY *et al.*, 1994). É estimado que 75-80% das amostras isoladas de suínos pertençam aos sorotipos 1 e 2 (WOOD & HARRINGTON, 1978; WOOD, 1984; TAKAHASHI *et al.*, 1992; TAKAHASHI *et al.*, 1996). Os demais sorotipos são menos comuns na espécie suína e têm baixa patogenicidade, apresentando importância clínica duvidosa (WOOD, 1999).

KUCSERA (1979) relatou a inter-relação entre o tipo sorológico do agente e a forma clínica desencadeada no suíno. Observou-se que 93,9% dos quadros septicêmicos foram causados por amostras do sorotipo 1a; todas as amostras isoladas de urticária e de fetos suínos abortados pertenciam ao sorotipo 2a; 73,9% dos quadros crônicos da doença também foram causados por amostras do sorotipo 2a. Agrupando os dados da sorotipagem de todas as 201 amostras isoladas, 73,1%

e 23,4%, pertenciam, respectivamente, aos sorotipos 1a e 2a, e somente 3,5% representavam os demais sorotipos.

TAKAHASHI *et al.* (1985), ao estudarem a patogenicidade para suínos e camundongos de 37 amostras de *Erysipelothrix* sp. sorotipos 1a, 3, 5, 6, 8, 11, 21 e N, isoladas de suínos com quadro clínico crônico de erisipela, verificaram a ausência de correlação entre a patogenicidade e o sorotipo da cepa. Também foi observada a ocorrência de amostras de *E. rhusiopathiae* mais patogênicas para suínos que para camundongos.

Em outro estudo, TAKAHASHI *et al.* (1994) reportaram a ausência de correlação entre a patogenicidade do *E. rhusiopathiae* para galinhas e camundongos. Os autores sugeriram a realização de mais pesquisas para elucidação dos fatores de patogenicidade do agente, de maneira que sejam explicadas as diferenças de susceptibilidade das espécies de animais ao *E. rhusiopathiae*.

2.4. Características biológicas

ROSELL (1958), citado por CASTRO *et al.* (1963), demonstrou artificialmente que o *E. rhusiopathiae* resiste à acidez gástrica dos suínos, passando para o intestino e sendo eliminado junto às fezes.

Apesar de ser um microrganismo não-esporulado, é relativamente resistente a condições adversas, permanecendo viável no solo por até 90 dias, principalmente em terrenos alcalinos. Em temperaturas frias, o patógeno sobrevive durante 6 meses nas fezes de suínos e na mucosidade de peixes (WALKER, 1990).

E. tonsillarum é descrito ser apatogênico em suínos, camundongos e galinhas, porém patogênico em cães; em humanos, ainda não há estudos de sua patogenicidade (BROOKE & RILEY, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1987; TAKAHASHI *et al.*, 2000).

Na Argentina, COPES *et al.* (2001) isolaram três amostras de *E. tonsillarum* sorotipo 10 de suínos com lesões sistêmicas não cutâneas compatíveis com as da erisipela, e inferiram que era a primeira referência da patogenicidade de

tal sorotipo no país, todavia, as amostras isoladas não foram testadas para a reprodução experimental do quadro clínico que supostamente desencadearam.

TAKAHASHI *et al.* (1996) demonstraram que todas as amostras de *E. tonsillarum* isoladas de casos crônicos de erisipela suína não induziram experimentalmente qualquer sinal clínico da doença nos suínos desafiados. Os autores sugeriram que uma coinfeção dos suínos por vírus ou bactérias, por exemplo, *Streptococcus* sp., *Actinomyces pyogenes* e *Mycoplasma hyosynoviae*, ou causas não-infecciosas poderiam ser as responsáveis pelas alterações clínicas de onde amostras de *E. tonsillarum* foram isoladas.

A patogenicidade do *E. rhusiopathiae* não se limita apenas aos suínos. Nas espécies bovina, ovina e caprina, é agente etiológico incomum de artrites sépticas (MOULTON *et al.*; 1953; DREYFUSS & STEPHENS, 1990). Em criações de galinhas, patos e perus domésticos, *E. rhusiopathiae* promove perdas econômicas significativas (BROOKE & RILEY, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 2000). Na Austrália, o organismo é um problema emergente na estrutiocultura (GRIFFITHS & BULLER, 1991). No Japão, a erisipela tem apresentado importância econômica na criação comercial de javalis (YAMAMOTO *et al.*, 1999).

TAKAHASHI *et al.* (1994) investigaram a patogenicidade do *Erysipelothrix* sp. em galinhas, desafiando-as com amostras de 16 sorotipos de *E. rhusiopathiae*, 7 sorotipos de *E. tonsillarum* e com amostras dos sorotipos 13 e 18, pertencentes a outras espécies do gênero. O *E. tonsillarum* e as amostras dos sorotipos 13 e 18 mostraram-se apatogênicas para galinhas, enquanto que as amostras de *E. rhusiopathiae* apresentaram patogenicidade variável. Estes dados dão suporte ao fato de que, tal como ocorre em suínos, o *E. rhusiopathiae* é a única espécie do gênero que causa lesões em galinhas.

Em humanos, o *E. rhusiopathiae* é agente etiológico do erisipelóide, cujo termo foi adotado para evitar confusões com as lesões da erisipela humana causadas pelo *Streptococcus pyogenes*. A infecção ocorre através de lesões na pele, principalmente nas mãos, e é usualmente relatada pela exposição ocupacional ou recreacional, acometendo pessoas que têm contato com animais susceptíveis à infecção, seus subprodutos e dejetos, em especial, veterinários, trabalhadores rurais, pescadores e magarefes. A forma cutânea localizada é a manifestação mais comum da infecção e resolve-se espontaneamente em 4 semanas, porém pode ocorrer a recorrência das lesões, havendo a necessidade da

antibioticoterapia. A apresentação cutânea generalizada ocorre ocasionalmente, e os quadros de endocardite e septicemia são raros (PROCTER, 1965; POTVLIERGE & HANSEN, 1989; ROBSON *et al.*, 1998; BROOKE & RILEY, 1999). Sugere-se que a incidência de infecções em humanos decline em virtude dos avanços tecnológicos na indústria animal, entretanto ainda são registradas em ambientes específicos (BROOKE & RILEY, 1999).

É relatado que o *E. rhusiopathiae* permanece viável no limo que reveste peixes e tanques de piscicultura, configurando importantes fontes de infecção para humanos (BROOKE & RILEY, 1999).

Já foram descritos diversos casos de zoonose ocupacional relacionados ao *E. rhusiopathiae*. ROBSON *et al.* (1998) relataram a infecção por *E. rhusiopathiae* de um homem com 84 anos de idade que criava perus, patos e gansos em uma fazenda comercial de piscicultura; outro caso, foi de um homem com um corte recente na mão que apresentou quadro septicêmico de erisipelóide após uma pescaria.

CROSS & CLAXTON (1979) sorotiparam uma amostra de *E. rhusiopathiae* isolada de um homem, e verificaram que ela pertencia ao sorotipo 2b, que inclusive é um dos sorotipos mais frequentes em quadros de erisipela e em suínos portadores assintomáticos.

Em um trabalho de determinação da patogenicidade para suínos e camundongos, de amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas de tonsilas de bovinos sadios, verificou-se que as amostras eram patogênicas para camundongos e moderadamente para suínos. Os autores sugeriram que tais cepas também poderiam ser patogênicas para outros animais e, inclusive, para humanos (HASSANEIN *et al.*, 2003).

Já foram isoladas amostras de *E. rhusiopathiae* de cortes de carne suína, bovina, ovina, de frango e de peixe, bem como foi verificado que o ambiente de matadouros é altamente contaminado com o patógeno. Dessa forma, *E. rhusiopathiae* é um risco potencial tanto para a economia da indústria animal, como para a saúde pública (STENSTROM *et al.*, 1992; WANG *et al.*; 2002).

Com relação à sensibilidade aos antibióticos, *Erysipelothrix* sp. é sensível à penicilina, cefalosporina, eritromicina e clindamicina, mas é resistente aos aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprim e vancomicina (ROBSON *et al.*, 1998). A penicilina permanece como o antibiótico de escolha para o tratamento do

erisipelóide e da erisipela suína (TAKAHASHI *et al.*, 1989; ROBSON *et al.*, 1998; BROOKE & RILEY, 1999).

Apesar de ser uma bactéria pouco exigente, o crescimento do *Erysipelothrix* sp. é incrementado pela adição de soro ou de outro componente altamente nutritivo no meio de cultivo, temperatura de 30°C a 37°C, pH de 7,2 a 7,6 ($\pm 0,2$) e atmosfera contendo 5 a 10% de CO₂ (HUNTER, 1942; WALKER, 1990; BROOKE & RILEY, 1999). O patógeno cresce na presença de 0,2% de fenol, 0,1% de azida sódica e 0,001% de cristal violeta, sendo estes dois últimos utilizados na elaboração de meios seletivos (WOOD, 1970; WALKER, 1990).

2.5. Características bioquímicas

Os testes bioquímicos são utilizados para discriminar amostras de *Erysipelothrix* sp. de bactérias morfológicamente semelhantes, por exemplo, *Listeria* sp., *Actinomyces* sp., *Arcanobacterium* sp. e *Lactobacillus* sp. (WOOD, 1970; POTVLIERGE & HANSEN, 1989; ROBSON *et al.*, 1998), bem como permitem a diferenciação entre *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* (BROOKE & RILEY, 1999).

Nos testes bioquímicos comumente utilizados, *Erysipelothrix* sp. é relativamente inativo. Apresenta reações Voges-Proskauer, indol, catalase, oxidase e gelatinase negativos; não reduz nitratos a nitritos; não cresce em citrato de Simmons; e em TSI (ágar tríplice-açúcar com ferro), produz ácido sulfídrico na linha de picagem, após 6 a 36 horas de incubação a 37°C. Não fermenta a trealose, inosita, dulcita, glicerina, sorbita, arabinose, manita, adonita, ramnose, amido, inulina e xilose; fermenta a dextrina, glicose, lactose, maltose, manose, galactose, levulose e frutose, sem a produção de gás (VICKERS & BIERER, 1958; WHITE & SHUMAN, 1961; CASTRO *et al.*, 1963; WOOD, 1970; BROOKE & RILEY, 1999; WOOD, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 2000).

Morfológicamente, *E. rhusiopathiae* é indistinguível de *E. tonsillarum*, entretanto, pode ser diferenciado pela sorotipagem, pela patogenicidade em suínos e por não fermentar a sacarose (TAKAHASHI *et al.*, 1992; TAKAHASHI *et al.*, 1994). Outra forma de distinguir *E. rhusiopathiae* das demais espécies do gênero, é através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), padronizada por SHIMOJI *et al.* (1998).

Em gelatina, após 48 horas a 20°C, desenvolve-se, na linha de picagem, um traço branco uniforme que emite delicados micélios, conferindo à cultura, após 5 dias de incubação, a forma característica de escova para lavagem de tubo de ensaio, daí a denominação de “Test Tube Brush” (ALBUQUERQUE, 1957; WOOD, 1970).

2.6. Erisipela suína

2.6.1. Histórico

No Brasil, a erisipela suína foi descrita pela primeira vez em 1931, por MELLO & SOUZA, citados por CASTRO *et al.* (1963), em um suíno recém-chegado dos EUA.

ALBUQUERQUE (1957) isolou o *E. rhusiopathiae* de fragmentos de coração, em casos de erisipela suína no Rio Grande do Sul.

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

Posteriormente, CASTRO *et al.* (1967) realizaram o primeiro isolamento no Brasil de *E. rhusiopathiae* da superfície corporal de sardinhas.

Já em 1972, CASTRO *et al.* sorotiparam 73 (8,43%) das 866 amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas de tonsilas de suínos saudáveis, procedentes de SP, PR, SC e RS, e 29 (22,31%) das 130 amostras isoladas da superfície corporal de peixes frescos. Apenas 88 das 102 amostras isoladas reagiram com pelo menos um dos oito soros padrões testados: sorotipos 1 (8,82%), 2 (33,33%), 3 (13,72%), 4 (3,92%), 9 (2,94%), 10 (4,90%), 11 (1,96%) e N (16,66%). Em ambas as espécies, o sorotipo 2 foi o mais prevalente.

REIS *et al.* (1977) diagnosticaram dez surtos de erisipela suína em nove municípios de Minas Gerais, inclusive com o isolamento do patógeno. Em uma das criações, a doença se apresentou sob a forma de poliartrite em animais de 3 a 6 meses de idade, enquanto nas demais, ocorreu a forma septicêmica aguda, caracterizada por morbidade de até 30% nos setores de terminação e de reprodução e letalidade de 100% de animais não medicados.

Em 1981, BARCELLOS isolou o patógeno de 16 (14,04%) baços de suínos clinicamente doentes no Rio Grande do Sul.

No estado de São Paulo, o primeiro surto de erisipela suína ocorreu em Guarulhos, em 1982, em uma granja suinícola caracterizada por superlotação e precárias condições de higiene e alimentação. A doença acometeu cerca de 70 dos 1.300 suínos de diferentes idades e manifestou-se sob forma aguda com mortes rápidas, em até 20 horas após o aparecimento dos primeiros sintomas (BERSANO *et al.*, 1982).

Em 1984, BARCELLOS *et al.* detectaram os sorotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 5 e 11, entre os 16 soros padrões testados com 103 amostras de *Erysipelothrix* sp. isoladas de suínos sadios. Os sorotipos 2b (40,6%), 1b (19,5%) e 1a (5,2%) foram os de maior frequência. Também foi descrito, pela primeira vez, o sorotipo 11 associado ao quadro septicêmico da doença e o sorotipo 5 no Brasil.

Dentre os sorotipos de *E. rhusiopathiae* já isolados no Brasil, observa-se que o sorotipo 2 é o de maior frequência (CASTRO, 1972; BARCELLOS *et al.*, 1984), tal como ocorre em outros países.

WOOD & HARRINGTON (1978) sorotiparam 1.627 amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas de tecidos de suínos, procedentes de 39 estados dos EUA, e 166 amostras isoladas de solo e excretas de baias de suínos, em Iowa. Os sorotipos 1 (36,2%), 2 (41,2%), 5 (9,0%) e 6 (3,7%) foram os mais prevalentes.

KUCSERA (1979), ao sorotipar 382 amostras de *Erysipelothrix* sp. isoladas de tonsilas de suínos sadios, reportou a maior frequência dos sorotipos 2a (46,3%), N (26,7%), 11(10,7%) e 6 (4,7%).

Na Austrália, reportou-se que os sorotipos 1a e 2 são os menos comuns em carneiros e infreqüentes em aves domésticas, pássaros e animais silvestres. Enquanto que o sorotipo 1b apresentou-se amplamente distribuído, apenas não isolado de animais silvestres. Cerca de 97% das amostras isoladas de suínos doentes pertenceram aos sorotipos 1 e 2 (EAMENS *et al.*, 1988).

Na Indonésia, TAKAHASHI *et al.* (1989) caracterizaram 245 (35,7%) amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas de tonsilas de suínos aparentemente sadios e relataram que o sorotipo 2 apresentou a maior frequência (30,6%), seguido pelos sorotipos 11 (7,3%), 12 (5,3%), 1a (4,9%), 5 (4,9%) e 6 (4,1%).

Em 1992, na Suécia, STENSTROM *et al.* isolaram e sorotiparam amostras de *E. rhusiopathiae* de carne crua suína (50%), de bacalhau (60%) e de arenque

(30%). O sorotipo 2 foi o mais freqüente, tanto na espécie suína, como nas de peixe.

No Japão, em um estudo realizado em 1987, os sorotipos 7 (54%) e 2 (31,7%) foram os mais freqüentes em 63 (10,5%) amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas de suínos sadios (TAKAHASHI *et al.*, 1987). Em outra investigação, foi relatado que os sorotipos 1a (40,4%) e 2 (34,3%) foram os mais prevalentes em 943 amostras de *Erysipelothrix* sp. isoladas de suínos crônicos (artrite e linfadenite). Somente 0,5% das amostras pertenceram à espécie *E. tonsillarum* (TAKAHASHI *et al.*, 1996).

Na Tailândia, o sorotipo 2 também foi o mais prevalente (43,5%) em 46 (15,0%) amostras de *Erysipelothrix* sp. isoladas de tonsilas de suínos aparentemente sadios. Somente 4,3% das amostras isoladas pertenceram à espécie *E. tonsillarum* (TAKAHASHI *et al.*, 1999).

2.6.2. Epidemiologia

Suínos de todas as idades são susceptíveis à infecção por *E. rhusiopathiae*, entretanto, o quadro clínico ocorre com maior freqüência em animais de recria e de terminação (WOOD, 1999). Os animais com idade inferior a três meses e superior a três anos são os menos sensíveis (WALKER, 1990). Os leitões novos são mais resistentes, pois adquirem imunidade através do colostro (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

A tonsila é considerada o principal sítio de colonização do *E. rhusiopathiae* (WOOD, 1999; SHIMOJI, 2000). A existência do patógeno nas tonsilas de suínos sadios sugere que estas possam configurar fonte persistente de antígenos solúveis de *E. rhusiopathiae* em suínos cronicamente infectados (STEPHENSON & BERMAN, 1978).

O reservatório mais importante do *E. rhusiopathiae* é o suíno doméstico, estimando-se que 30% a 50% dos suínos sejam portadores do *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas e em outros tecidos linfóides (McKEAN, 1990; GYLES, 1993; WOOD, 1999; SHIMOJI, 2000). Já os pesquisadores SMITH & MORGAN (1995) sugerem que 70% ou mais dos suínos sadios podem ser portadores de *E. rhusiopathiae* nas tonsilas.

Suínos portadores eliminam o *Erysipelothrix* sp. pelas fezes e secreções oronasais e são considerados a principal fonte de contaminação do ambiente. Os animais que apresentam o quadro agudo da erisipela disseminam intensamente o patógeno pelas fezes, urina, saliva e secreções nasais (WOOD, 1999). Outras fontes de contaminação da granja são insetos, roedores, aves e animais domésticos e silvestres infectados (WOOD, 1999).

É provável que a penetração do patógeno no organismo ocorra através das tonsilas e do tecido linfóide ao longo do aparelho digestivo, sendo assim, a principal via de transmissão é a ingestão de água e alimentos contaminados. A infecção também ocorre através de feridas cutâneas quando em contato com solo e pisos contaminados, porém é pouco comum (WOOD, 1974; WOOD, 1992; WALKER, 1990; GYLES, 1993). Outra possível forma de transmissão são as picadas de artrópodes, por exemplo, de *Stomoxys* e *Tabanus*, se tiverem picado recentemente, um animal infectado (BRUNER & GRIFFITH, 1984; WALKER, 1990).

HASSANEIN *et al.* (2001), no Japão, isolaram 79 (6,39%) amostras de *Erysipelothrix* sp. de 1.236 tonsilas de bovinos aparentemente saudáveis, reforçando que os bovinos podem ser carreadores do patógeno e, assim, potenciais fontes de infecção para outros animais e humanos. Além do mais, somente uma amostra correspondeu ao *E. tonsillarum*, sendo sugerida a maior susceptibilidade da espécie bovina ao *E. rhusiopathiae* que ao *E. tonsillarum*.

CONNELL & LANGFORD (1953), no Canadá, MURASE & EBI (1960), no Japão e ANUSZ (1955), na Polônia, citados por TIMONEY (1970), detectaram variação sazonal na taxa de portador tonsilar de *E. rhusiopathiae* em suínos aparentemente saudáveis, porém sem correlacionar suas observações com os dados meteorológicos (umidade relativa do ar, temperatura ambiental e pluviosidade) do período de estudo. As maiores taxas de isolamento foram obtidas no verão e outono e as menores taxas, na primavera. Os quadros clínicos de erisipela também foram mais frequentes no verão. MURASE & EBI (1960) sugeriram que os suínos nascidos nos meses da estação fria, não estando expostos a um grande número de *Erysipelothrix* sp. no ambiente, não se tornariam portadores e não desenvolveriam imunidade ativa contra o patógeno. Assim, estes animais seriam facilmente infectados com o início da estação quente.

Na Irlanda, TIMONEY (1970) reportou menor taxa de isolamento de *Erysipelothrix* sp. na primavera, cerca de 12 vezes menor, e as maiores taxas no verão e em pleno inverno, contradizendo assim as observações de MURASE & EBI (1960). O pesquisador também comparou a taxa de isolamento do patógeno com os dados meteorológicos do período de estudo, e não verificou qualquer correlação entre eles. Inferiu-se que para a interpretação das variações sazonais na taxa de portador tonsilar de *E. rhusiopathiae*, não se deve considerar apenas a influência da estação do ano na multiplicação ambiental do patógeno, mas também a duração do estado de portador tonsilar, a qualidade microbiológica da água e da ração, entre outros fatores.

Com o objetivo de verificar se o *E. rhusiopathiae* poderia ser encontrado no solo e no esterco de suínos, WOOD & PACKER (1972) pesquisaram 19 granjas suinícolas localizadas em Iowa (EUA), sendo 11 com histórico de quadro clínico recente de erisipela suína, e as demais granjas sem quadro clínico há pelo menos cinco anos. O isolamento foi positivo em 95% das granjas, indicando que a presença do patógeno no solo não era um fenômeno local. A maior frequência (37,6%) do patógeno foi observada nas granjas que não apresentavam incidência de caso clínico de erisipela há anos. Além do mais, 95,2% das amostras isoladas eram patogênicas para suínos, sugerindo que os animais eram portadores assintomáticos e imunes às cepas patogênicas prevalentes, o que não impediria o desenvolvimento da doença em suínos recém introduzidos no plantel. Dessa forma, as informações obtidas estabelecem a importância do solo e do dejetos de suínos como fontes de infecção e reservatórios do *E. rhusiopathiae* no ambiente da granja.

Em 1974, WOOD conduziu uma investigação para determinar se amostras patogênicas de *E. rhusiopathiae* poderiam ser detectadas em fezes de suínos assintomáticos, em fazendas dos EUA que nunca haviam relatado quadro clínico de erisipela. O patógeno foi isolado em 2,63% das amostras de fezes, oriundas de porcas e de cevados, indicando que os suínos jovens associados com matrizes portadoras assumem rapidamente o status de disseminadores do microrganismo na granja. Além do mais, o isolamento foi positivo em 8 (27,59%) amostras de solo, sendo que todas as cepas isoladas mostraram-se patogênicas para suínos, reforçando a hipótese de que suínos portadores assintomáticos disseminam amostras patogênicas de *E. rhusiopathiae*.

NORRUNG *et al.* (1987) pesquisaram a ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas na matéria orgânica de currais e pocilgas, na Dinamarca. Verificou-se que o patógeno *E. rhusiopathiae* estava presente em 49% dos 84 rebanhos de bovinos, em 44% dos 32 plantéis de suínos e em 39% das 67 fazendas com ambas as criações de bovinos e suínos, totalizando 81 (44,26%) cepas de *Erysipelothrix* sp. isoladas. Deste montante, foram identificados 16 sorotipos diferentes, incluindo o sorotipo 23, até então não descrito na literatura. Os sorotipos 2 (31,4%) e 5 (16,3%) foram os mais freqüentes. Verificou-se então, que tanto os suínos como os bovinos podem assumir o estado de portadores do *E. rhusiopathiae*, contribuindo na disseminação do patógeno na natureza.

2.6.3. Patogenia

A gravidade das lesões é determinada por diversos fatores, por exemplo, pela idade do suíno à infecção; pelo nível de anticorpos, resultante da ingestão de colostro ou da vacinação; pela intensidade da contaminação ambiental; pela virulência da amostra e pela existência de fatores imunodepressores. Visto isso, alguns plantéis apresentam quadro clínico brando, ao passo que há granjas onde a doença ocorre de forma explosiva e agressiva, resultando em morte dos animais (McKEAN, 1990; GYLES, 1993).

Há poucas informações a respeito da patogenia da doença, entretanto ROWSELL (1956), citado por STEPHENSON & BERMAN (1978), sugere que as tonsilas sejam o sítio inicial da infecção natural do *Erysipelothrix* sp. no suíno, seguida pela invasão dos sistemas vascular e linfático. Também é sugerido que o *Erysipelothrix* sp. seja capaz de se aderir às células epiteliais e de penetrá-las, alcançando o endotélio vascular. Através da corrente circulatória, o patógeno migra para sítios específicos de colonização, onde causa lesões localizadas ou permanece circulando no animal, promovendo lesões sistêmicas (WOOD, 1999; GYLES, 1993).

TAKAHASHI *et al.* (1987) verificaram que amostras virulentas de *E. rhusiopathiae* aderem-se bem à célula hospedeira. Em contraste, as cepas avirulentas apresentam negligente aderência celular.

Em quadros subagudos e crônicos da doença, há a predileção do organismo por articulações, válvulas cardíacas e artérias. É sugerido que esta

preferência esteja associada com a circulação passiva desses tecidos, que são supridos pelo plasma sanguíneo, dificultando a eliminação do patógeno, bem como favorecendo a deposição persistente de fibrina, resultante da insuficiência de ativadores de plasminogênio no plasma. Tem-se então, o desenvolvimento de microtrombos compostos por fibrina e bactérias, que podem causar necrose isquêmica (GYLES, 1993).

Erysipelothrix sp. não produz toxinas, porém acredita-se que a enzima neuraminidase seja um fator de virulência do patógeno. Tem sido observada correlação entre a quantidade de neuraminidase produzida e o grau de virulência da amostra. Essa enzima, ao remover o ácido N-acetilneuroamínico (ácido siálico), existente na superfície celular, favorece a penetração do *Erysipelothrix* sp. nas células hospedeiras. Além do mais, o ácido siálico está envolvido no controle da vida útil de glicoproteínas, eritrócitos, leucócitos e trombócitos, assim, a sua deficiência intensifica o catabolismo celular, resultando em anemia, leucopenia e trombocitopenia (GYLES, 1993; SHIMOJI, 2000).

O organismo também produz a hialuronidase, um fator de dispersão que facilita a disseminação do patógeno nos tecidos. Entretanto, a importância dessa enzima na patogenicidade da infecção ainda é controversa. É sugerido que a virulência do *E. rhusiopathiae* também esteja associada com a sua resistência à fagocitose pelas células polimorfonucleares, conferida pela cápsula (SHIMOJI, 2000).

2.6.4. Sinais clínicos

A erisipela se caracteriza por produzir quadro clínico-patológico de curso **agudo**, caracterizado pela septicemia; **subagudo**, pelas lesões cutâneas; ou **crônico**, caracterizado pela artrite, endocardite e linfadenite (TAKAHASHI *et al.*, 1989; ROSS *et al.*, 1991).

Na forma aguda, observam-se estado febril (40-42°C), prostração, anorexia, conjuntivite, andar cambaleante, dor articular, relutância para se movimentar e morte em 2 a 3 dias se o animal não for medicado. A partir do segundo ou terceiro dia de infecção, podem ser observadas lesões cutâneas do tipo eritema ou urticária, com contornos salientes em forma de losango e coloração púrpuro-escura, localizadas em regiões específicas ou generalizadas pelo corpo do

animal. Essas lesões são patognomônicas e podem desaparecer em 4 a 7 dias, ou podem dar origem a áreas de necrose, que persistem por várias semanas devido a infecções secundárias. O animal também pode apresentar descoloração cutânea das extremidades e da região ventral do corpo, como resultado da septicemia (BERSANO *et al.*, 1982; WALKER, 1990; GYLES, 1993; SOBESTIANSKY *et al.*, 1999; WOOD, 1999).

As infecções sistêmicas podem desencadear problemas reprodutivos em virtude do estado febril, ocorrendo abortamentos em qualquer estágio de gestação e infertilidade temporária de machos (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999; WOOD, 1999). Em contrapartida, HOFFMANN & BILKEI (2002) reportaram problemas reprodutivos em uma unidade reprodutora de suínos na Hungria, e os associaram com uma possível capacidade do *E. rhusiopathiae* de penetrar no útero durante infecções sistêmicas. Após a adoção de um programa de vacinação das porcas, observaram-se a redução do intervalo desmame – estro, aumento da taxa de parto, aumento do número de leitões nascidos totais e nascidos vivos por leitegada e a redução da descarga vulvar pré e pós-parto (HOFFMANN & BILKEI, 2002).

Na forma subaguda, os sinais clínicos são menos graves que aqueles observados na doença aguda. Os animais comumente apresentam poucas lesões na pele, estado febril moderado e passageiro e apetite normal (WALKER, 1990; WOOD, 1999). Alguns casos subagudos são tão brandos que podem passar despercebidos, o que particularmente ocorre em plantéis com imunidade vacinal (McKEAN, 1990).

A forma crônica pode se desenvolver após semanas ou meses da recuperação de um quadro agudo e subagudo de erisipela, ou ser resultante de uma infecção inaparente. As lesões articulares ocorrem em um ou mais membros, e restringem os movimentos do animal, que passa a ter dificuldades em acessar o alimento, causando a redução da taxa de crescimento e pior qualidade da carcaça na tipificação. Os suínos com lesões cardíacas podem morrer subitamente, quando submetidos a exercícios físicos (WOOD & HARRINGTON, 1978; McKEAN, 1990; WOOD, 1999; COPES *et al.*, 2001).

Animais portadores de *Erysipelothrix* sp. podem desenvolver quadro clínico de erisipela, devido ao aparecimento de algum fator predisponente, por exemplo, estresse térmico, mudança brusca da alimentação, infecção parasitária, ingestão de micotoxinas ou a introdução de outra doença (WOOD, 1999). Na

Argentina, foi relatado quadro cutâneo de erisipela em suínos de recria e de engorda, justamente quando foram registradas temperaturas ambientais muito baixas (PEREYRA *et al.*, 1998).

2.6.5. Patologia

Os suínos que morrem como consequência do quadro agudo apresentam hemorragias na mucosa gástrica, no córtex renal e nos músculos esqueléticos e cardíacos. É frequente a inflamação aguda dos nodos linfóides e a congestão dos pulmões, fígado, baço, pele e bexiga. Microscopicamente, são observadas lesões vasculares com microtrombos e infiltração com mononucleares (WALKER, 1990; ROSS *et al.*, 1991).

Nas articulações, são observados a descoloração das membranas sinoviais, o aumento da quantidade de tecido conectivo e infiltração de células mononucleares. As alterações teciduais também podem se estender para os ligamentos e tendões próximos à articulação afetada (ROSS *et al.*, 1991). É possível que o tecido de granulação se estenda sobre as superfícies articulares e que ocorra erosões na cartilagem articular (WALKER, 1990).

A circulação nas lesões cutâneas pode ficar tão comprometida que as células da região central da ferida podem entrar em lise e necrosar (WOOD, 1999).

Na endocardite, são geralmente observadas lesões vegetativas na válvula mitral, caracterizadas pelo depósito de fibrina e pela proliferação de tecido conjuntivo (WALKER, 1990).

2.6.6. Diagnóstico

A infecção de suínos por *E. rhusiopathiae* deve ser diferenciada de outras infecções, entre as quais as causadas pelo vírus da Peste Suína Clássica, pela *Salmonella choleraesuis*, pelo *Actinobacillus suis* e pelo *Streptococcus suis*. As três primeiras, pelos sintomas septicêmicos, e a última, por estar envolvida em artrites e endocardites (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999; WOOD, 1999). Em suínos na fase de recria, o quadro cutâneo inicial da erisipela pode ser confundido com a forma localizada de Epidermite Exudativa (STRAW, 1992).

A apresentação aguda da erisipela suína não pode ser diferenciada prontamente de outras doenças septicêmicas baseando-se apenas nos sinais clínicos (WOOD, 1999). Nestes casos, sugere-se o diagnóstico laboratorial da doença.

Os testes sorológicos têm aplicação prática limitada no diagnóstico de erisipela suína clínica ou para a diferenciação entre suínos imunes e susceptíveis, tanto é que são utilizados restritamente em pesquisas. ELISA, titulação por microaglutinação e aglutinação da cultura são os testes sorológicos mais confiáveis, mas podem ser difíceis de serem interpretados (WOOD, 1999).

2.6.6.1. Técnicas de isolamento

Diferentes tecidos de suínos podem ser utilizados para a verificação da presença do *E. rhusiopathiae*, por exemplo, trato intestinal, linfonodos, tonsilas, vesícula biliar, coração, articulações, medula óssea, baço, fígado, rins, pulmões e sangue (WOOD, 1999; WANG *et al.*, 2002).

As técnicas mais usadas para a evidênciação do *Erysipelothrix* sp. em materiais patológicos são: bacterioscopia direta de impressões de vísceras em lâminas coradas pelo método de gram; cultura direta em placas do meio seletivo de Packer; inoculação direta de macerado em camundongos, com posterior recuperação do patógeno por cultura do sangue cardíaco em meio de Packer (PACKER, 1943); enriquecimento em meio líquido seletivo contendo antibióticos; e enriquecimento em caldo nutriente a 4°C por tempo variável de 5 a 35 dias, com posterior subcultura em meio sólido ou inoculação em camundongo (ROWSELL, 1958; WOOD, 1965; WOOD, 1970; STEPHENSON & BERMAN, 1978).

O meio líquido seletivo ESB (*Erysipelothrix* selective broth), constituído de caldo triptose adicionado de 5% de soro eqüino, kanamicina (0,400 mg/mL), neomicina (0,050 mg/mL) e vancomicina (0,025 mg/mL), foi proposto por WOOD (1965), e é recomendado por diversos pesquisadores para a identificação de animais portadores sadios, devido à facilidade de detecção do patógeno quando presente em número reduzido e por inibir o crescimento de bactérias contaminantes. Sendo assim, é uma técnica adequada para o isolamento a partir de

tonsilas, fezes e solo (WOOD & PACKER, 1972; STEPHENSON & BERMAN, 1978; COPES *et al.*, 2001).

PACKER (1943) recomenda o uso de ágar sangue a 5% (pH 6,8), adicionado de 0,1% de azida sódica e 0,001% de cristal violeta, para o isolamento seletivo de *E. rhusiopathiae* de materiais contaminados.

Em 1981, BARCELLOS comparou várias técnicas de isolamento e de identificação de *Erysipelothrix* sp. em vísceras de suínos: meio de Packer, inoculação em camundongo, bacterioscopia direta por impressão de órgãos, enriquecimento por refrigeração e meio ESB. O patógeno foi identificado em 16 (14,04%) dos 114 baços pesquisados, através da positividade em pelo menos um dos métodos testados. O meio de Packer apresentou positividade em apenas 4 (25%) dos 16 baços de onde o patógeno foi isolado. É possível que os órgãos enviados para o exame tivessem pequena concentração da bactéria, o que explicaria o reduzido desempenho da técnica. A baixa porcentagem (25%) de recuperação do patógeno na técnica de inoculação direta do macerado em camundongo também pode ser explicada por esta hipótese, bem como pela possibilidade da presença de amostras de baixa patogenicidade para os animais de laboratório. A bacterioscopia direta por impressão de órgãos (18,75%) não permitiu fácil diferenciação entre infecções causadas pelo *E. rhusiopathiae* e outros agentes bacterianos, devido à presença de grande número de bactérias contaminantes. O enriquecimento por refrigeração em meio BHI (Brain Heart Infusion Broth) com posterior subcultura em placa de meio de Packer, apresentou-se ineficiente em períodos de incubação de 10 dias (6,25%) e de 20 dias (6,25%). Entretanto, com período de incubação de 30 dias, a técnica apresentou positividade de 87,5%. Em termos de aplicação na rotina de diagnóstico, o uso de meio ESB foi considerado superior que as demais técnicas analisadas, tanto pela maior porcentagem de positividade (93,75%), como pelo menor tempo despendido (4 dias) em relação ao enriquecimento a frio em BHI (30 dias).

2.6.7. Prevenção

É praticamente impossível erradicar a erisipela suína, em função da capacidade de sobrevivência da bactéria no ambiente e da variedade de espécies

animais que podem ser infectadas, além da existência de suínos portadores sadios. Contudo, é possível controlar a sua disseminação (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

Animais afetados cronicamente devem ser eliminados do plantel, uma vez que são indefinidamente carreadores do patógeno. Também é importante a sanitização das instalações para reduzir a contaminação no ambiente. Sugere-se o uso de cresóis e fenóis, pois são pouco inativados na presença de matéria orgânica (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999; WOOD, 1999).

A vacinação não é totalmente efetiva na prevenção da doença, bem como não elimina o estado de portador, entretanto, a sua utilização associada com práticas profiláticas adequadas é a forma mais eficaz e econômica para o controle da enfermidade (BERSANO *et al.*, 1982; WOOD, 1999). É sugerido que a vacinação confira 6 meses ou mais de imunidade contra o patógeno (WOOD, 1992) e que proteja o plantel do quadro agudo, porém a sua ação é limitada contra as lesões articulares e cardíacas (McKEAN, 1990; ROSS *et al.*, 1991).

A imunização ativa pode ser realizada através do uso de vacinas atenuadas e de bacterinas (WALKER, 1990; GYLES, 1993).

As vacinas atenuadas são compostas por amostras de baixíssima virulência para os suínos (WOOD, 1999).

No Japão, tem sido testada uma vacina constituída pelo organismo vivo na prevenção da erisipela suína, entretanto, a sua eficácia é variável, em virtude da susceptibilidade do suíno vacinado. A transferência de anticorpos maternos para o leitão interfere na resposta imune vacinal, o que torna necessária a revacinação. Esta, por sua vez, é uma tarefa laboriosa e com resultado incerto, pois a duração da imunidade passiva é irregular. Um outro problema relatado em granjas SPF (Specific Pathogen Free) é a vacina viva poder desencadear respostas muito intensas, por exemplo, urticária e estresse, devido à elevada susceptibilidade dos animais (ZARKASIE *et al.*, 1996). Há também a possibilidade, apesar de remota, dos animais vacinados com a vacina viva se tornarem carreadores e disseminadores do organismo, o que poderia aumentar a virulência da amostra após passagens sucessivas (WOOD, 1999).

WOOD & HARRINGTON (1978), ao testar a patogenicidade de 121 amostras de *Erysipelothrix* sp. em camundongos inoculados com soro hiperimune anti-erisipela eqüino, verificaram falha da proteção contra amostras dos sorotipos

15 e 16, sugerindo a existência de especificidade de imunidade, possivelmente relacionada com o sorotipo. A partir desse tipo de observação, surgiu o interesse pela sorotipagem de amostras de *E. rhusiopathiae*.

A eficácia da bacterina depende principalmente da seleção de amostras imunogênicas, porque somente certas cepas de *E. rhusiopathiae* produzem bacterinas efetivas para a imunização de suínos (TRAUB, 1947; citado por WOOD *et al.*, 1978).

As vacinas comerciais são bacterinas elaboradas com amostras inativadas do sorotipo 2 (TIMONEY & GROSCHUP, 1993), pois quando cultivadas em caldos enriquecidos contendo soro, produzem fatores imunogênicos solúveis, descritos como glicoproteínas, que induzem proteção contra a maioria dos sorotipos de *E. rhusiopathiae* (WOOD, 1999). Além do sorotipo 2, REDHEAD *et al.* (1998) também sugerem a adição do sorotipo 1 na vacina, o que possivelmente pode proteger o animal da infecção contra todas as amostras patogênicas de *E. rhusiopathiae*.

Em 1998, AMASS & SCHOLZ descreveram um surto de erisipela em uma granja comercial de sítio completo, com 1.000 matrizes, nos EUA. Segundo os autores, o surto foi resultante do erro de um funcionário ao não vacinar todo o plantel de fêmeas reprodutoras, deixando-as susceptíveis ao quadro clínico de erisipela. Este relato enfatiza que além da aquisição de uma vacina adequada, também é importante o monitoramento e treinamento dos empregados responsáveis pela vacinação.

Em geral, é recomendado vacinar os suínos com 8 a 10 semanas de idade, e as marrãs e porcas na 6ª semana pré-parto e 2ª semana pós-parto, para a indução adequada de anticorpos, que são transferidos para os leitões via colostro (ROSS *et al.*, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

As tonsilas foram coletadas em estabelecimentos de carne e derivados, classificados de acordo com o art. 21 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA-1980). O processamento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - MG.

3.1. Seleção dos locais de coleta

Na seleção dos locais de coleta, levou-se em consideração o intuito de se obter uma amostragem diversificada segundo a origem dos animais e a distância entre o laboratório e o estabelecimento de carne e derivados, de forma que as tonsilas fossem processadas em, no máximo, 72 horas, para se evitar o crescimento da bactéria *Proteus* sp., o que impossibilitaria a identificação de outras colônias bacterianas no meio de cultivo.

As coletas foram realizadas em seis estabelecimentos de carne e derivados, sendo três matadouros-frigoríficos e três matadouros, localizados em quatro estados da federação: um em Goiás (GO), um no Mato Grosso do Sul (MS), três em Minas Gerais (MG) e um em São Paulo (SP). Os estabelecimentos citados abatem suínos criados no estado onde estão instalados, porém aquele localizado no MS, além de abater animais criados na região, também abate suínos oriundos do Paraná (PR).

Conforme o combinado para a realização das coletas, os estabelecimentos de carne e derivados que participaram dessa pesquisa não serão descritos e identificados.

3.2. Seleção dos animais

Foram selecionados cevados, de ambos os sexos, e porcas reprodutoras descartadas.

Antes do início de cada abate, foram listadas as propriedades que teriam seus animais abatidos no dia, detalhando-se a sua localidade, o número de suínos enviados e a tatuagem de identificação do lote para a sua rastreabilidade na linha de matança. Foram coletadas as tonsilas de suínos de todas as granjas disponíveis no momento da coleta.

A seleção dos cevados foi feita ao acaso em cada lote, enquanto que se coletou material de todas as matrizes de descarte, devido ao menor número de porcas abatidas diariamente.

Não foram aplicados questionários para a caracterização das granjas, devido à exigência dos estabelecimentos de carne e derivados em não se identificar os proprietários rurais.

3.3. Coleta das tonsilas

De cada granja, foram coletadas em média 8 tonsilas de matrizes ou 12 tonsilas de cevados.

Previamente à coleta, todas as carcaças foram inspecionadas por técnicos e/ou veterinários do Serviço Oficial de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Para a remoção das tonsilas, foi necessária a desarticulação da cabeça ou o desvio da carcaça para a área reservada ao Departamento de Inspeção Final, conforme a estrutura física e velocidade da linha de abate do estabelecimento.

As tonsilas foram coletadas com o uso de luvas descartáveis, tesouras e pinças cirúrgicas, acondicionadas em frascos plásticos esterilizados com tampa rosqueável, que foram identificados segundo o estabelecimento de coleta, a categoria produtiva do animal e o município a que a granja pertencia. O transporte foi realizado em caixa isotérmica com gelo reciclável, via terrestre ou aérea. No laboratório, foram mantidas sob refrigeração. O tempo decorrido entre a coleta e processamento das tonsilas não excedeu 60 horas.

3.4. Processamento das tonsilas

Foram adotadas duas técnicas de isolamento de *Erysipelothrix* sp.:

- ✧ Meio seletivo **crystal violeta**, proposto por HASSANEIN *et al.* (2000), citado por HASSANEIN *et al.* (2001), **modificado**;
- ✧ Meio de enriquecimento **triptose fosfato**, proposto por TAKAHASHI *et al.* (1999).

3.4.1. Técnica de isolamento cristal violeta (CV) modificada

Um grama de tecido tonsilar, retirado da região central das tonsilas, foi triturado em gral com areia e suspenso em 5 mL de salina tamponada (PBS), pH 7,6. Em seguida, 2 mL dessa suspensão foram inoculados em 10 mL de meio seletivo CV (pH 7,6), constituído por 37 mg/mL de BHI (Brain Heart Infusion), 0,1% de tween 80, 0,1% de azida sódica, 0,020 mg/mL de gentamicina, 3,0 mg/mL de tris (hidroximetilaminometano) e 0,001% de cristal violeta. Após 48 horas de incubação a 37°C, em microaerofilia, uma alíquota dessa suspensão foi semeada em ágar sangue de carneiro desfibrinado a 7% (AS), pH 7,6. A placa foi incubada a 37°C por 48 horas, em microaerofilia, e posteriormente, refrigerada a 4°C por no mínimo quatro horas, para permitir melhor visualização dos halos de alfa-hemólise (halo esverdeado) do patógeno.

3.4.2. Técnica de isolamento triptose fosfato (TP)

Um grama de tecido tonsilar, retirado da região central das tonsilas, foi cortado em fragmentos (1 × 0,5 × 0,5 cm) e inoculado em 10 mL de caldo triptose fosfato (pH 7,6), contendo 0,1% de tween 80, 0,025 mg/mL de gentamicina e 0,250 mg/mL de kanamicina. Após incubação a 37°C por 24h, em microaerofilia, uma alíquota desta suspensão foi semeada em ágar TP (pH 7,6), contendo 0,1% de tween 80, 0,025 mg/mL de gentamicina e 0,250 mg/mL de kanamicina.

As placas foram incubadas a 37°C por 24h, em microaerofilia, e em seguida, foram examinadas para a formação de colônias.

3.5. Identificação das amostras isoladas

3.5.1. Avaliação das características culturais

As características culturais foram observadas em microscópio estereoscópio. Avaliou-se a convexidade, as bordas e o aspecto límpido da colônia, semelhante à gota de água. Na técnica CV, também foi avaliada a presença de halo de alfa-hemólise em AS de carneiro desfibrinado a 7%.

3.5.2. Avaliação das características celulares

As características morfo-tintoriais das células oriundas das colônias suspeitas foram observadas pela coloração de gram, em microscópio óptico. Foram avaliados o pleomorfismo e o arranjo dos bastonetes. Em ambas as técnicas, foram selecionadas, no mínimo, duas colônias por placa para a avaliação das características celulares.

As amostras identificadas como *E. rhusiopathiae* foram classificadas de acordo com a morfologia celular observada após 24 horas de incubação a 37°C em AS (pH 7,6) de carneiro desfibrinado a 7% (Figura 01): forma *lisa* (predomínio de bastonetes curtos); forma *lisa à intermediária* (maioria de bastonetes curtos e poucos bastonetes médios); forma *intermediária* (maioria de bastonetes médios e poucos bastonetes curtos, ou predomínio de bastonetes médios); forma *intermediária à rugosa* (maioria de bastonetes médios e poucos bastonetes longos); e forma *rugosa* (maioria de bastonetes longos). Consideraram-se **bastonetes curtos** as formas celulares com morfologia cocobacilar; os **bastonetes longos** como as formas celulares filamentosas longas; e os **bastonetes médios** como filamentos curtos.

A classificação das amostras de *E. rhusiopathiae* segundo a morfologia celular foi realizada por uma única pessoa, previamente treinada para tal fim.

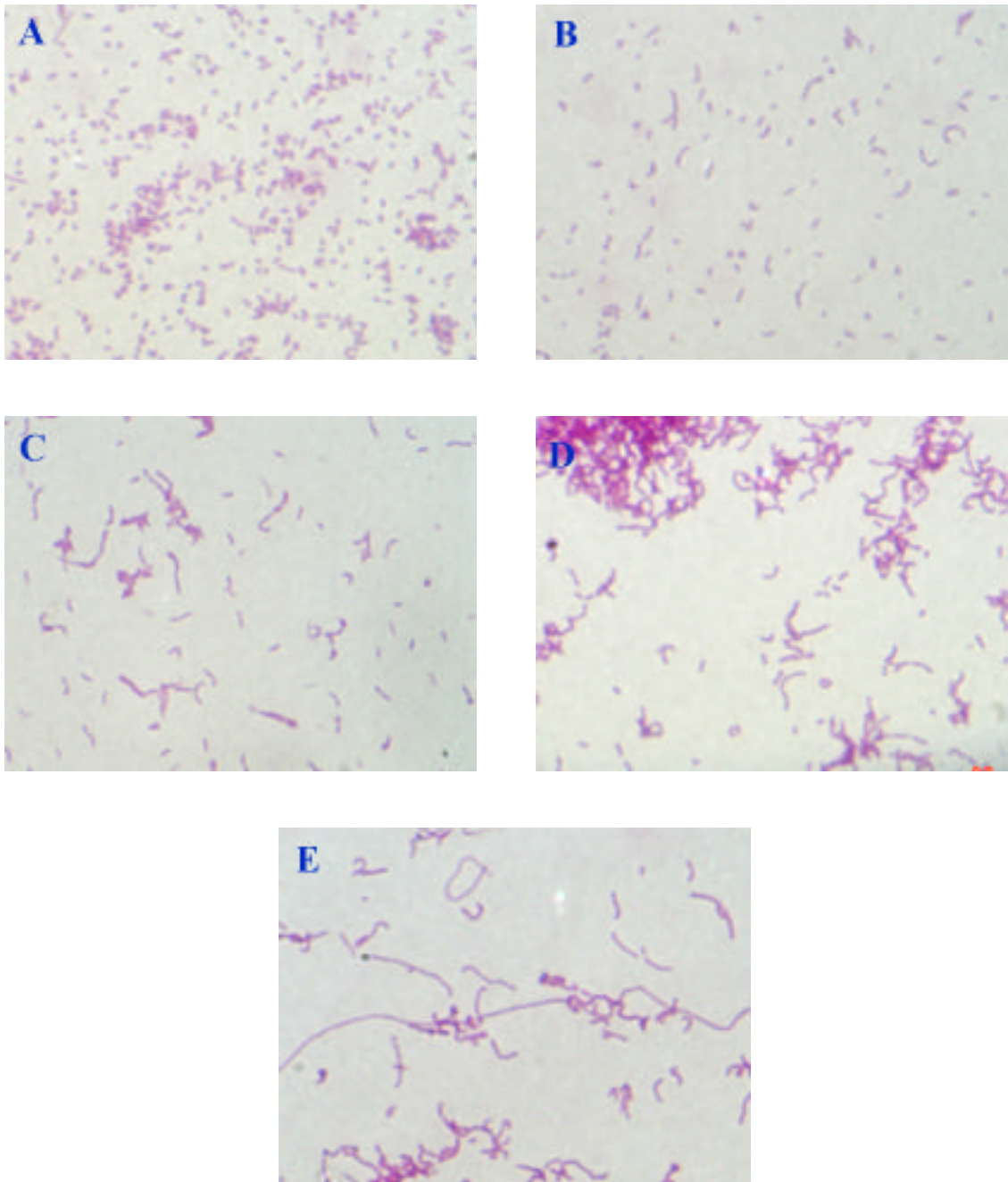


Figura 01 – Morfologias celulares de amostras de *E. rhusiopathiae* pela coloração de gram: (A) lisa; (B) lisa à intermediária; (C) intermediária; (D) intermediária à rugosa; (E) rugosa.

3.5.3. Avaliação das características bioquímicas

As colônias que apresentaram características culturais e celulares semelhantes as do *Erysipelothrix* sp. foram multiplicadas em BHI, com o objetivo de se obter cultura pura para a realização dos testes bioquímicos. Assim, a colônia foi transferida para 1 mL de BHI (pH 7,6) e incubada a 37°C por 24h. Em seguida, uma alíquota dessa suspensão foi semeada em AS de carneiro desfibrinado a 7% (pH 7,6) e incubada a 37°C por 24h, em condições microaerófilas.

O ágar TSI foi adotado como *teste presuntivo* (Figura 02). O crescimento em gelatina (Figura 03), os testes bioquímicos em glicose, frutose, arabinose e xilose (Figuras 04 e 05) e o teste de catalase foram adotados como *testes confirmativos*.

A sacarose foi utilizada para a diferenciação bioquímica entre amostras de *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* (Figuras 04 e 05).

As leituras dos testes bioquímicos foram feitas com 24 e 48 horas de incubação a 37°C, exceto o crescimento em gelatina, cujas leituras foram realizadas com 4 e 10 dias de incubação a 21°C.

As reações bioquímicas apresentadas pelas amostras de referência de *E. rhusiopathiae* sorotipo 9 (cepa Kaparek) e *E. tonsillarum* sorotipo 10 (cepa Lengyel-P), gentilmente cedidas pelo Dr. Mitsugu Shimizu (General Director of National Institute of Animal Health – Japão), foram consideradas padrão para a identificação bioquímica das amostras de *Erysipelothrix* sp. isoladas.

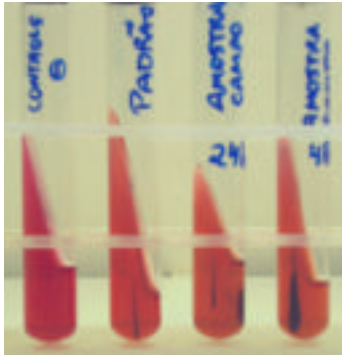


Figura 02 – Teste TSI, tendo-se da esquerda para a direita, o controle negativo, o controle positivo (padrão) e a amostra de campo de *Erysipelothrix* sp. com 24 e 48 horas de incubação a 37°C, verificando-se a produção de sulfeto de ferro, resultante da reação do ácido sulfídrico com o ferro presente no meio.



Figura 03 – Crescimento em gelatina em forma de escova, após 10 dias de incubação a 21°C, de uma amostra de *E. tonsillarum* isolada de cevado sadio oriundo de Aparecida do Rio Doce - GO.

Figura 04 - Reações bioquímicas apresentadas pela amostra de referência *E. rhusiopathiae* sorotipo 9 (cepa Kaparek), nos açúcares sacarose (-), glicose (+), frutose (+), arabinose (-) e xilose (-), da esquerda para a direita.



Figura 05 - Reações bioquímicas apresentadas pela amostra de referência *E. tonsillarum* sorotipo 10 (cepa Lengyel-P), nos açúcares sacarose (+), glicose (+), frutose (+), arabinose (-) e xilose (-), da esquerda para a direita.



3.6. Liofilização das amostras

Foram liofilizadas todas as amostras bacterianas identificadas como pertencentes ao gênero *Erysipelothrix*, para a realização de um futuro trabalho de sorotipagem.

O procedimento para a liofilização constou de: repicar a amostra em AS de carneiro desfibrinado a 7% (pH 7,6); após incubação a 37°C por 12h, em condições microaerófilas, a massa bacteriana foi transferida para 1 mL de BHI (pH 7,6), adicionado de 2 mL de estabilizador; posteriormente, essa suspensão foi distribuída em ampolas de vidro estéreis contendo a etiqueta de identificação da amostra, que por sua vez, foram acondicionadas no liofilizador e submetidas à temperatura média de - 40°C por 12h. Concluído o processo de liofilização, as ampolas foram seladas e armazenadas a 4°C.

Após a coleta da massa bacteriana, todas as placas de AS foram mantidas em estufa a 37°C por 48 horas, para a verificação de possível crescimento de microrganismos contaminantes. Em caso de contaminação, repetiu-se o cultivo e a liofilização da respectiva amostra.

3.7. Análise dos dados

As técnicas de diagnóstico CV e TP foram avaliadas através da taxa de isolamento de *Erysipelothrix* sp. e do custo de reagentes.

A distribuição dos animais identificados como portadores de *Erysipelothrix* sp., por pelo menos uma das técnicas de isolamento, foi avaliada através de tabelas de frequência, considerando-se as variáveis categoria produtiva (matriz e cevado), origem dos animais (estado da federação), técnica de isolamento (CV e TP), espécie de *Erysipelothrix* (*E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum*) e morfologia celular (lisa, lisa à intermediária, intermediária, intermediária à rugosa e rugosa).

As comparações entre as proporções de animais positivos segundo as variáveis acima foram feitas através do teste de Qui-quadrado (χ^2), utilizando-se os programas Epi Info versão 6.04b (WHO, 1997) e Bio Estat 2.0 (AYRES *et al.*, 2000). Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5% e um valor de $p \leq 0,05$ (95% de probabilidade) foi considerado significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Frequência de suínos portadores de *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas segundo a técnica de isolamento

Foram pesquisados 510 suínos aparentemente saudáveis, sendo que 99 (19,41%) foram diagnosticados como portadores de *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas por pelo menos uma das técnicas de isolamento. Conforme a Tabela 01, 70 portadores foram identificados somente pela técnica CV, 6 somente pela TP e 23 por ambas as técnicas.

A técnica CV diagnosticou 18,24% (93/510) de suínos portadores, enquanto que a TP diagnosticou 5,69% (29/510) dos animais pesquisados. A análise do χ^2 revelou diferença significativa entre as percentagens de suínos portadores de *Erysipelothrix* sp. diagnosticados em cada técnica ($p < 0,01$).

A respeito da sensibilidade e especificidade de cada teste de diagnóstico, nada se pode inferir, pois como não foi adotada uma técnica padrão-ouro, não necessariamente os casos diagnosticados negativos (411) por ambas as técnicas de isolamento eram animais não portadores. Contudo, a técnica CV identificou 93,94% (93/99) dos suínos diagnosticados portadores por pelo menos uma das técnicas, enquanto que a TP detectou somente 29,29% (29/99) dos casos positivos (Tabela 01).

Tabela 01 – Número de suínos positivos e negativos para o isolamento de *Erysipelothrix* sp. segundo as técnicas CV e TP.

TRIPTOSE FOSFATO	CRISTAL VIOLETA		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	23	06	29
NEGATIVO	70	411	481
TOTAL	93	417	510

Erysipelothrix sp. tem sido isolado de diferentes tecidos de animais aparentemente saudáveis, entretanto, a preponderância de isolamento ocorre nas

tonsilas (CASTRO *et al.*, 1963; TIMONEY, 1970; CASTRO *et al.*, 1972; BARCELLOS *et al.*, 1984; TAKAHASHI *et al.*, 1987; TAKAHASHI *et al.*, 1989; TAKAHASHI *et al.*, 1999; COPES *et al.*, 2001; HASSANEIN *et al.*, 2001). Neste estudo, também pudemos isolar *Erysipelothrix* sp. das tonsilas de suínos aparentemente saudáveis.

No Brasil, há um grande número de suínos portadores de *Erysipelothrix* sp. distribuídos por todo o território (BERSANO *et al.*, 1982). Em outros países, diversos autores também identificaram o estado de portador, ao isolarem o patógeno de tonsilas de suínos aparentemente saudáveis (TIMONEY, 1970; STEPHENSON *et al.*, 1978; TAKAHASHI *et al.*, 1987; TAKAHASHI *et al.*, 1989; TAKAHASHI *et al.*, 1999). Estima-se que 30% a 50% dos suínos sejam portadores de *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas e em outros tecidos linfóides (McKEAN, 1990; GYLES, 1993; WOOD, 1999; SHIMOJI, 2000).

Em 1963, CASTRO e colaboradores pesquisaram 175 tonsilas de suínos aparentemente saudáveis, abatidos no estado de São Paulo e procedentes do Rio Grande do Sul e Paraná. Foram isoladas duas (1,14%) amostras de *E. rhusiopathiae*, utilizando-se a técnica de inoculação direta de macerado em camundongos, com posterior recuperação do patógeno através da cultura do sangue cardíaco em meio AS e ágar simples.

Já em 1972, CASTRO *et al.* classificaram sorologicamente 110 amostras de *E. rhusiopathiae*. Destas, 73 (8,43%) foram isoladas de 866 tonsilas de suínos aparentemente saudáveis, 29 (22,31%) foram isoladas da superfície corporal de 130 peixes e as demais foram cedidas por outros pesquisadores.

No Brasil, o último trabalho de isolamento e de caracterização de amostras de *E. rhusiopathiae* de suínos, descrito na literatura, foi realizado por BARCELLOS *et al.* (1984), que sorotiparam 133 amostras de *Erysipelothrix* sp., sendo 103 de tonsilas de suínos saudáveis, 21 de baço de suínos com quadro septicêmico e 9 de fezes de suínos saudáveis.

A técnica de enriquecimento em meio contendo antibióticos tem sido utilizada para o isolamento de *Erysipelothrix* sp. de tonsilas de suínos aparentemente saudáveis. TAKAHASHI *et al.* (1987) isolaram 63 (10,5%) amostras de *E. rhusiopathiae* de tonsilas de suínos saudáveis, utilizando-se caldo infusão de carne, adicionado de kanamicina (0,500 mg/mL) e gentamicina (0,050 mg/mL). Em 1989, TAKAHASHI *et al.* mantiveram a mesma linha de pesquisa, entretanto

substituíram o caldo infusão de carne por caldo TP e reduziram a concentração de gentamicina para 0,025 mg/mL. A taxa de isolamento obtida foi de 35,7% (245/687). Já em 1999, o mesmo grupo de pesquisadores utilizou caldo TP, adicionado de 0,025 mg/mL de gentamicina e 0,250 mg/mL de kanamicina e diagnosticou 14,98% (46/307) de suínos carreadores do patógeno nas tonsilas.

Observa-se que o percentual obtido no presente trabalho, de 5,69% de suínos portadores de *Erysipelothrix* sp. através da técnica TP, é inferior àqueles obtidos por pesquisadores utilizando-se o mesmo protocolo ou métodos de isolamento semelhantes. De acordo com a literatura, amostras de *Erysipelothrix* sp. podem apresentar sensibilidade variável à kanamicina, sugerindo-se, assim, a realização de um teste de sensibilidade a esse antibiótico das amostras isoladas nesta pesquisa.

FÜZI (1963), citado por WOOD (1965), reportou que bactérias gram-negativas e gram-positivas são inibidas pela kanamicina na concentração de 0,400 mg/mL, exceto *Erysipelothrix* sp. WOOD (1965) verificou que os antibióticos kanamicina, neomicina, vancomicina e novobiocina não inibiram o crescimento de *E. rhusiopathiae*. Em contrapartida, BRATBERG (1981) avaliou a eficácia do meio ESB utilizando 35 amostras previamente identificadas como *E. rhusiopathiae*. Foi relatado que 6 (17,14%) amostras não cresceram ou apresentaram crescimento variável no meio, sendo que 4 destas apresentaram sensibilidade leve à intensa ao antibiótico kanamicina, utilizado na concentração de 400µg / mL. Sugeriu-se então, o uso da kanamicina em menor concentração, ou mesmo, a sua substituição por outro antibiótico.

Na literatura pesquisada, foi verificado somente um trabalho utilizando a técnica CV, proposto por HASSANEIN *et al.* (2000), citado por HASSANEIN *et al.* (2001), inclusive para a identificação do estado de portador de *Erysipelothrix* sp. na espécie bovina. Foram isoladas 79 (6,39%) amostras de *Erysipelothrix* sp. de bovinos aparentemente saudáveis, utilizando-se o meio seletivo CV, constituído por caldo BHI, 0,1% tween 80, 5% soro equino, 0,1% azida sódica, 0,050 mg/mL gentamicina e 0,001% cristal violeta.

No presente estudo, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e bastonetes gram negativos não foram adequadamente inibidos pelo meio CV, diferindo das observações de PACKER (1943). O autor verificou, nas concentrações de 0,1% de azida sódica e 0,001% de cristal violeta, completa inibição de *Micrococcus* sp.,

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus viridians*, em contrapartida, *E. rhusiopathiae* não foi inibido.

Com relação às características culturais em ágar TP, as colônias apresentaram-se convexas, translúcidas e dotadas de pontos difusos levemente avermelhados, que facilitaram a identificação das colônias de *Erysipelothrix* sp. entre os demais tipos celulares. Em ágar sangue, as colônias eram convexas, translúcidas (semelhantes a gotas de água) e com halo de alfa-hemólise bem evidente após a refrigeração da placa por pelo menos 4 horas.

Quanto ao processamento, a técnica CV confere diagnóstico mais demorado por despende 2 dias a mais de incubação que a técnica TP. Também é mais laboriosa, devido à necessidade de se triturar cada fragmento tonsilar, o que é particularmente mais difícil no caso de tonsilas de matrizes, em virtude de sua textura rígida.

Considerando-se o custo de reagentes, a técnica CV foi 16% mais barata que a TP, sendo os gastos computados em R\$ 0,43/suíno e R\$ 0,51/suíno, respectivamente.

4.2. Frequência de suínos portadores de *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas segundo a categoria produtiva

Das 510 tonsilas coletadas no presente estudo, 112 tonsilas eram de porcas reprodutoras de descarte e 398 eram de cevados, oriundos dos estados de Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG).

Analisando-se a frequência de suínos portadores de *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas segundo a categoria produtiva, não foi observada diferença estatística ($\chi^2 = 0,22$; $p = 0,64$) entre porcas reprodutoras e suínos terminados (Tabela 02).

Na literatura pesquisada, não é feita nenhuma referência ao estado de portador de *Erysipelothrix* sp. de acordo com a categoria produtiva.

Tabela 02 – Tonsilas coletadas e positivas para o isolamento de *Erysipelothrix* sp. segundo a categoria produtiva.

CATEGORIA PRODUTIVA	N° TONSILAS	
	COLETADAS	POSITIVAS ⁽¹⁾
MATRIZES	112	20 (17,86 %) ^a
CEVADOS	398	79 (19,85 %) ^a

NOTA: (1) Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa ($p = 0,64$) ao nível de significância de 5%.

Neste estudo, esperava-se que a percentagem (19,85%) de cevados portadores de *Erysipelothrix* sp. fosse maior, uma vez que o declínio da imunidade passiva contra esta bactéria ocorre a partir de 84 dias de idade (IOWA UNIVERSITY, 2004), assim, tornando os suínos mais susceptíveis à infecção justamente no período de sua transferência para a terminação. Além do mais, o risco das unidades de terminação estarem permanentemente infectadas com o *E. rhusiopathiae* é elevado, em virtude de sua capacidade de sobreviver nas fezes por 1-6 meses, tempo suficiente para configurar uma importante fonte de infecção de animais e humanos (TUOVINEN *et al.*, 1994; BROOKE & RILEY, 1999).

Também era esperado que o número de matrizes portadoras (17,86%) fosse maior que o de cevados (19,85%), pelo fato de ficarem mais tempo expostas ao *Erysipelothrix* sp. no ambiente da granja. No sistema de criação confinado, os suínos terminados são abatidos com 5 a 6 meses de idade e as fêmeas são introduzidas no plantel reprodutor em média com 150 dias, permanecendo na granja em média por 2 anos, conforme sua capacidade reprodutiva e outras causas de descarte (NICOLAIEWSKY *et al.*, 1998).

O estado de portador em ambas as categorias pode estar subestimado em consequência do uso de antibióticos como prática comum para a prevenção de enfermidades, inibindo o crescimento do *Erysipelothrix* sp. nos meios de cultura. Também é possível que as tonsilas coletadas tivessem baixa concentração da bactéria, que no caso das matrizes pode ser consequência da vacinação.

De qualquer forma, as percentagens observadas, de 17,86% para as matrizes e 19,85% para os cevados, são importantes do ponto de vista epidemiológico, principalmente com relação às matrizes, porque ao infectarem

suas leitegadas, contribuem para a manutenção do patógeno em todo ciclo de produção da granja.

A taxa de portador tonsilar de *Erysipelothrix* sp. segundo a origem dos animais variou de 6,25% a 23,08% nas matrizes, e de 13,73% a 33,85% nos suínos terminados (Tabela 03), indicando que os animais de ambas as categorias produtivas assumem o status de disseminadores do microrganismo na granja. Estes dados são um alerta para os produtores rurais, veterinários e indústria animal em relação às proporções que o *Erysipelothrix* sp. pode assumir no plantel da granja, conferindo prejuízos a cadeia produtiva da suinocultura. E também chamam a atenção dos estabelecimentos de carne e derivados para a possível contaminação de suas instalações com o patógeno.

Tabela 03 – Tonsilas positivas, tonsilas coletadas e percentagem de isolamento de *Erysipelothrix* sp. segundo a categoria produtiva, em cada estado.

CATEGORIA PRODUTIVA	ESTADOS				
	MG	SP	GO	MS	PR
MATRIZES	0/0 ⁽¹⁾	0/0 ⁽¹⁾	13/70 (18,57%)	1/16 (6,25%)	6/26 (23,08%)
CEVADOS	32/156 (20,51%)	11/75 (14,67%)	22/65 (33,85%)	14/102 (13,73%)	0/0 ⁽¹⁾

NOTA: (1) 0 / 0 significa isolamento nulo em virtude de ausência de coleta

Na Austrália, em um estudo de detecção e de recuperação de amostras de *Erysipelothrix* sp. em carnes ovina, suína e de frango, bem como na linha de matança de abatedouros do oeste do país, conclui-se que os ambientes de processamento animal dos estabelecimentos de carne e derivados são altamente contaminados com esse patógeno, dessa forma, os produtos animais destinados para o consumo humano estão sob risco de contaminação (WANG *et al.*, 2002). Na presente pesquisa, em todos os estabelecimentos onde se realizaram as coletas, foram abatidos suínos identificados como portadores tonsilares de *Erysipelothrix* sp. por pelo menos uma das técnicas de isolamento.

A vacina não elimina o estado de portador de *Erysipelothrix* sp., entretanto, associada a medidas sanitárias, é a forma mais eficaz e econômica de controle da enfermidade (BERSANO *et al.*, 1982; WOOD, 1999).

O atual esquema de vacinação contra a erisipela suína no Brasil consiste em vacinar somente as marrãs e porcas, no 7º e 10º dia pós-parto, utilizando-se a vacina tríplice, que confere imunidade contra parvovirose, leptospirose e erisipela. Esse esquema de vacinação difere daquele proposto por ROSS *et al.* (1991), de se vacinar ambas as categorias de produção.

Se as regras do mercado consumidor europeu, ainda em discussão, forem aprovadas, os países produtores de suínos terão que abolir a antibioticoterapia como medida profilática, para se manterem no mercado exportador de carne suína. O Brasil terá, então, que se adaptar a essa exigência, o que demandará a revisão do programa de vacinação atualmente adotado, retornando ao esquema em que os cevalos também são vacinados.

4.3. Frequência de suínos portadores de *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas segundo a origem dos animais

As tonsilas foram coletadas de animais oriundos dos estados de MS, GO, PR, SP e MG, abrangendo 46 propriedades rurais em 28 municípios, relacionados na Tabela 04 (no apêndice).

Os estados citados fazem parte de importantes regiões produtoras de suínos no país. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS, 2004), o rebanho suíno brasileiro tem a sua maior representação numérica, econômica e tecnológica na região Sul, seguida pelas regiões Sudeste, Centro - Oeste, Nordeste e Norte, sendo que as duas primeiras têm-se destacado pelos grandes investimentos que estão sendo implantados em MG, GO, MT e MS.

O isolamento foi positivo em todos os estados pesquisados, tendo sido em 7 municípios de MG, em 5 municípios de GO e de MS, em 3 municípios de SP e em 1 município do PR, indicando que a presença do *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas de suínos aparentemente sadios não é um fenômeno local (Tabela 05).

Em GO e MS, a atividade suinícola é recente, caracterizada por granjas dotadas de instalações novas, equipamentos modernos e assistência veterinária permanente. O isolamento de *Erysipelothrix* sp. nesses estados mostra que o emprego de tecnologia de ponta e os cuidados sanitários vigentes não eliminam o risco de infecção pelo patógeno.

Como a amostragem do presente estudo não é representativa dos plantéis de suínos dos estados onde foram realizadas as coletas, os dados obtidos do isolamento de *Erysipelothrix* sp. não caracterizam o perfil sanitário da atividade suinícola nas regiões pesquisadas. Entretanto, observa-se na Tabela 05, as maiores percentagem de suínos portadores em GO (25,93%), no PR (23,08%) e em MG (20,51%), seguidos de SP (14,67%) e MS (12,71%).

Tabela 05 – Total de municípios, granjas e tonsilas de suínos sadios pesquisados e positivos para o isolamento de *Erysipelothrix* sp. segundo o estado da federação.

ESTADO	N.ºMUNICÍPIOS		N.ºGRANJAS		N.ºSUÍNOS	
	PESQUISADOS	POSITIVOS	PESQUISADAS	POSITIVAS	PESQUISADOS	POSITIVOS
MG	11	07	14	10	156	32 (20,51%)
SP	04	03	05	04	75	11 (14,67%)
GO	06	05	12	09	135	35 (25,93%)
MS	06	05	11	05	118	15 (12,71%)
PR	01	01	03	03	26	6 (23,08%)
TOTAL	28	21	46	34	510	99

4.4. Frequência de suínos portadores segundo a espécie de *Erysipelothrix*

Distribuindo-se os animais portadores de acordo com a espécie das amostras isoladas, foi observada maior percentagem (75,76%) de suínos carreadores exclusivamente de *E. rhusiopathiae* ($p < 0,01$). Também foi verificado que os suínos podem ser portadores de *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* concomitantemente. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as percentagens de suínos portadores exclusivamente de *E. tonsillarum* (13,13%) e de ambas as espécies do gênero (11,11%), conforme a Tabela 06.

Tabela 06 – Matrizes e cevados portadores tonsilares segundo a espécie de *Erysipelothrix*.

AMOSTRAS ISOLADAS	CATEGORIA PRODUTIVA		TOTAL ⁽³⁾
	MATRIZES ⁽¹⁾	CEVADOS ⁽²⁾	
<i>E. rhusiopathiae</i>	12/20 (60,00%) ^a	63/79 (79,75%) ^a	75/99 (75,76%) ^a
<i>E. tonsillarum</i>	4/20 (20,00%) ^b	9/79 (11,39%) ^b	13/99 (13,13%) ^b
<i>E. rhusiopathiae</i> + <i>E. tonsillarum</i>	4/20 (20,00%) ^b	7/79 (8,86%) ^b	11/99 (11,11%) ^b

NOTA: (1) Letras iguais na mesma coluna significa que não há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos ao nível de significância de 5%, sendo $\chi^2 = 9,60$.

(2) Letras iguais na mesma coluna significa que não há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos ao nível de significância de 5%, sendo $\chi^2 = 114,99$.

(3) Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os valores ao nível de significância de 5%, sendo $\chi^2 = 120,36$.

E. tonsillarum foi a espécie menos frequente no estado de portador tonsilar ($p < 0,01$), tendo sido isolada de 24,24% (13+11/99) dos animais diagnosticados positivos, sugerindo que os suínos possam ser mais susceptíveis ao *E. rhusiopathiae* que ao *E. tonsillarum*. Também é possível que o *E. tonsillarum* seja menos invasivo ou, ainda, menos resistente às condições ambientais, resultando em menor capacidade de colonização. Na literatura pesquisada, não havia citação sobre o potencial invasivo e a resistência do *E. tonsillarum* no ambiente.

Em 86,87% (75+11/99) dos suínos diagnosticados portadores, foi isolado o *E. rhusiopathiae*, sugerindo que os portadores assintomáticos sejam importantes disseminadores de *Erysipelothrix* sp. com potencial patogênico para a espécie suína. Também é um alerta para as autoridades de que o *E. rhusiopathiae* está presente na atividade suinícola, apresentando potencial risco à saúde pública.

STENSTRÖM *et al.* (1992) verificaram o isolamento de *E. rhusiopathiae* em 50%, 60% e 30%, respectivamente, das amostras de carne suína, de bacalhau e de arenque pesquisadas, e inferiram o risco de infecção de pessoas ao consumirem a carne contaminada. WANG *et al.* (2002) também sugerem que há o risco de consumidores de carne ovina e suína infectarem-se com amostras patogênicas de *E. rhusiopathiae*.

Em 1974, WOOD conduziu uma investigação para determinar se amostras patogênicas de *E. rhusiopathiae* poderiam ser detectadas em fezes de suínos assintomáticos, em fazendas dos EUA onde não havia relatos de quadro clínico de erisipela. O patógeno foi isolado em 2,63% das amostras de fezes, oriundas de porcas e de terminados, e em 8 (27,59%) amostras de solo, sendo que todas as cepas isoladas mostraram-se patogênicas para suínos, reforçando a hipótese de que suínos portadores assintomáticos disseminam amostras patogênicas de *E. rhusiopathiae*.

As freqüências de *E. rhusiopathiae* e *E. tonsillarum* reportadas em cada categoria produtiva também podem ser observadas na Tabela 06. As matrizes e os cevados apresentaram o mesmo padrão de isolamento das espécies de *Erysipelothrix*, sendo mais freqüente o portador exclusivamente de *E. rhusiopathiae* ($p < 0,05$). Pelo teste de Fisher, nenhuma das categorias produtivas apresentou maior risco para o estado de portador de *E. rhusiopathiae* ($p = 0,25$; OR = 0,51, IC = 0,12 – 2,59).

Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre o número de matrizes e de cevados carreadores de ambas as espécies de *Erysipelothrix* ($p = 0,31$; $\chi^2 = 1,04$), as matrizes apresentaram maior percentagem de coinfeção. É possível que as porcas reprodutoras estejam mais expostas a infecções diversas, por permanecerem na granja mais tempo que os cevados.

4.5. Frequência de suínos portadores de *E. rhusiopathiae* nas tonsilas segundo a morfologia celular

Os meios de cultivo e as condições de incubação influenciam na morfologia celular do *Erysipelothrix* sp. A forma rugosa é favorecida pela incubação a 37°C em pH ácido, enquanto que a forma lisa predomina em condições alcalinas (pH 7,6 – 8,2), com incubação a 33°C. Assim, mudanças nas condições de crescimento permitem que formas originalmente lisas passem a apresentar morfologia intermediária ou rugosa, bem como formas lisas originando-se de formas rugosas. Em culturas velhas, a apresentação lisa também pode mudar para rugosa (BROOKE & RILEY, 1999). Em virtude dessas observações, neste estudo, foram controlados os fatores extrínsecos sobre a morfologia das amostras isoladas, padronizando-se o meio de cultivo (AS), o pH (7,6), a temperatura (37°C) e o tempo de incubação (24h).

BROOKE & RILEY (1999) reportaram que modificações nas características morfo-culturais do *Erysipelothrix* sp. desencadeiam mudanças na patogenicidade e nas propriedades antigênicas do patógeno. Observações conflitantes têm sido relatadas a este respeito, não havendo ainda um consenso entre os pesquisadores se há correlação entre a patogenicidade da cepa e a sua morfologia (WANG *et al.*, 2002). Contudo, verifica-se usualmente a morfologia lisa em casos agudos da doença, por exemplo, em septicemias, e a rugosa nos quadros crônicos, tais como, artrites e endocardites (QUINN *et al.*, 1994; BROOKE & RILEY, 1999).

Como *E. tonsillarum* é descrito ser apatogênico em suínos (BROOKE & RILEY, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1987; TAKAHASHI *et al.*, 2000), nesta pesquisa, somente as amostras de *E. rhusiopathiae* foram classificadas quanto a sua morfologia celular em cada categoria produtiva. Foram identificados 86 suínos portadores de *E. rhusiopathiae* nas tonsilas, sendo que 15 animais apresentaram duas ou três amostras de morfologias diferentes, totalizando 103 amostras de *E. rhusiopathiae* analisadas.

A análise do χ^2 revelou que a forma lisa (53,4%) foi a morfologia mais freqüente, seguida da lisa à intermediária (27,18%). As morfologias intermediária e intermediária à rugosa tiveram as menores percentagens (9,71%), e a forma rugosa não foi identificada em nenhuma amostra (Tabela 07). Esses dados

discordam das observações de COTTRAL (1978), citado por BROOKE & RILEY (1999), de que a forma intermediária é a conformação mais comumente reportada de *Erysipelothrix* sp.

Tabela 07 – Morfologia celular das amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas de matrizes e cevados.

CATEGORIA PRODUTIVA	MORFOLOGIA CELULAR ⁽¹⁾				
	L	L-I	I	I-R	R
MATRIZES ⁽²⁾	09/20 (45%) ^a	7/20 (35%) ^a	2/20 (10%) ^a	2/20 (10%) ^a	0
CEVADOS ⁽³⁾	46/83 (55,42%) ^a	21/83 (25,30%) ^b	8/83 (9,64%) ^c	8/83 (9,64%) ^c	0
TOTAL ⁽⁴⁾	55/103 (53,40%) ^a	28/103 (27,18%) ^b	10/103 (9,71%) ^c	10/103 (9,71%) ^c	0

NOTA: (1) Lisa (L), lisa à intermediária (L-I), intermediária (I), intermediária à rugosa (I-R) e rugosa (R).

(2) Apesar do valor de $p = 0,018$, a análise mais detalhada do χ^2 não revelou diferença estatística entre as percentagens, provavelmente devido à amostragem pequena de matrizes portadoras; $\chi^2 = 10,13$ e $\alpha = 0,05$.

(3) Letras iguais na mesma linha significa que não há diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores analisados ao nível de significância de 5%, sendo $\chi^2 = 61,86$.

(4) Letras iguais na mesma linha significa que não há diferença estatística ($p < 0,01$) entre os valores analisados ao nível de significância de 5%, sendo $\chi^2 = 70,25$.

Em um estudo conduzido por TAKAHASHI *et al.* (1987), foram demonstradas cepas virulentas e avirulentas de *E. rhusiopathiae* nas tonsilas de suínos em frigoríficos. Em outro estudo, verificaram-se amostras patogênicas nas fezes de suínos aparentemente sadios (WOOD, 1974). Estas observações dão suporte ao fato de que a introdução de animais portadores é a mais importante fonte de infecção e manutenção do patógeno na granja e é, usualmente, a causa de focos isolados de erisipela em plantéis até então livres da doença. Segundo WALKER (1990), também é a principal forma de introdução de novos sorotipos no plantel.

No presente estudo, analisando-se a categoria de terminados, a morfologia de maior frequência foi a lisa (55,42%), seguida da lisa à intermediária (25,30%). Se houver realmente correlação entre a patogenicidade e a morfologia da cepa, 80,72% dos cevados portadores de *E. rhusiopathiae* identificados neste estudo eram carreadores de amostras potencialmente mais patogênicas. Este dado é significativo do ponto de vista zoonótico e porque os suínos portadores assintomáticos disseminam o patógeno no ambiente, constituindo, assim, reservatórios da enfermidade na granja.

Nas matrizes, verificou-se que não houve diferença estatística entre as percentagens das morfologias celulares reportadas, provavelmente em virtude da amostragem pequena de fêmeas portadoras do patógeno. Contudo, 4 a cada 5 (80%) matrizes identificadas portadoras de *E. rhusiopathiae* carreavam amostras de morfologia lisa ou lisa à intermediária, o que somado ao fato das porcas contaminarem suas leitegadas, multiplica a sua importância na manutenção do patógeno no plantel.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- 1) As tonsilas são adequadas para o isolamento de *Erysipelothrix* sp. de suínos aparentemente saudáveis.
- 2) A técnica CV, apesar de ser mais laboriosa e conferir diagnóstico mais demorado, obteve melhor taxa de isolamento de *Erysipelothrix* sp. que a técnica TP.
- 3) A bactéria *Erysipelothrix* sp. está presente em granjas de suínos nos estados de MS, GO, PR, SP e MG.
- 4) A presença do patógeno nas tonsilas de suínos aparentemente saudáveis não é um fenômeno geográfico local, sugerindo a sua ocorrência em todas as regiões produtoras de suínos no país.
- 5) Tanto os cerdas como as matrizes podem assumir o status de portadores de *Erysipelothrix* sp. nas tonsilas, podendo ser importantes fontes de infecção e reservatórios do patógeno na granja.
- 6) Os suínos podem ser mais susceptíveis a infecções por *E. rhusiopathiae* que por *E. tonsillarum*.
- 7) Os suínos podem ser portadores de *E. rhusiopathiae* e de *E. tonsillarum* concomitantemente, ou portadores de uma única espécie de *Erysipelothrix*.
- 8) As apresentações lisa e lisa à intermediária foram as morfologias mais frequentes das amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas, sugerindo que os portadores assintomáticos possam ser carreadores de amostras potencialmente patogênicas.

No presente estudo, verificou-se a necessidade de padronização de uma técnica de isolamento de *Erysipelothrix* sp., para que seja adotada na rotina de laboratórios de diagnóstico microbiológico e em trabalhos de pesquisa.

É interessante que seja feita a sorotipagem das amostras de *Erysipelothrix* sp. isoladas nesta pesquisa, para a identificação dos sorotipos que acometem plantéis suínos brasileiros.

Os dados obtidos também são um alerta aos produtores rurais, veterinários, indústria animal e às autoridades da saúde pública para a presença do *E.*

rhusiopathiae na cadeia produtiva da suinocultura, podendo causar prejuízos econômicos à atividade e configurar potencial risco à saúde humana.

A taxa de suínos portadores de 19,41% permite dizer que a cada cinco suínos aparentemente sadios pesquisados, um era portador assintomático de *Erysipelothrix* sp., o que do ponto de vista epidemiológico é uma importante fonte de disseminação do patógeno no ambiente. Isto, somado à demanda do mercado internacional por alimentos produzidos com o uso mínimo de antibióticos, mostra a necessidade da realização de estudos epidemiológicos de base populacional para a caracterização do agravo no plantel suíno brasileiro, por exemplo, a frequência de animais portadores de *Erysipelothrix* sp., o grau de patogenicidade das amostras prevalentes, a sua susceptibilidade antimicrobiana e os sorotipos presentes no país. Com esses dados, é possível a elaboração de uma vacina e de um programa de medidas profiláticas mais adequados para a manutenção da sanidade suína.

6. BIBLIOGRAFIA

ABCS (Associação Brasileira de Criadores de Suínos). **Rebanho Suíno**. Disponível em: <<http://www.abcs.com.br>> Acesso em: 17 ago. 2004.

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**, v. 2, p. 57-59, 1957.

AMASS, S. F. Erysipelas: new disease or old problem revisited? **Food Animal – Compendium**, p. 60-63, 1999.

AMASS S. F.; SCHOLZ, D. A. Acute nonfatal erysipelas in sows in a commercial farrow-to-finish operation. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 212, n. 5, p. 708-709, 1998.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. BioEstat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém / Brasília: Sociedade Civil Mamirauá / CNPq, 2000. 272p.

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.

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

BRASIL. LEIS, DECRETOS, ETC. **Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Aprovado pelo decreto 30.691 de 29/03/52, alterado pelo decreto 1.255 de 25/06/1962. Brasília, Ministério da Agricultura, 1980.

BRATBERG, A. M. Observations on the utilization of a selective medium for the isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, n. 1, p. 55-59, 1981.

BROOKE, C. J.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. **Journal of Medicine Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 789-799, 1999.

BRUNER, J. A.; GRIFFITH, R. W. *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 5 isolated from a white – tailed deer in Iowa. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 3, p. 235-236, 1984.

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; FILHO, O. C.; TROISE, C. Isolamento de *Erysipelothrix rhusiopathiae* de peixes marítimos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 9, n. 3, p. 169-171, 1967.

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

CHOROMONEY, K. N.; HAMPSON, D. J.; EAMENS, G. J.; TURNER, M. J. Analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* by multilocus enzyme electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 371-376, 1994.

COPEES, J.; NIEVAS, V.; VIGO, G.; SÁNCHEZ, M.; BAGNIS, G.; MARTÍN, V.; SANGUINETTI, H.; PERFUMO, C. J. Aislamiento e identificación serológica de *Erysipelothrix rhusiopathiae* de cerdos con lesiones sistémicas compatibles con las del mal rojo en la Republica Argentina. **Revista Biomédica**, v. 12, n. 4, p. 244-248, 2001.

CROSS, G. M. J.; CLAXTON, P. D. Serological classification of australian strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs, sheep, turkeys and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, n. 2, p. 77-81, 1979.

DREYFUSS, D. J.; STEPHENS, P. R. *Erysipelothrix rhusiopathiae* – induced septic arthritis in a calf. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 197, n. 10, p. 1361-1362, 1990.

EAMENS, G. J.; TURNER, M. J.; CATT, R. E. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Australian pigs, small ruminants, poultry, and captive wild birds and animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 8, p. 249-252, 1988.

GRIFFITHS, G. L.; BULLER, N. *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in semi-intensively farmed emus. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 3, p. 121-122, 1991.

GYLES, C.L. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In: GYLES, C.L; THOEN, C. O. (Eds). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, Ames: Iowa State University Press, 2nd edition, 1993, p. 80-85.

HASSANEIN, R.; SAWADA, T.; KATAOKA, Y.; ITOH, K.; SUZUKI, Y. Serovars of *Erysipelothrix* species isolated from the tonsils of healthy cattle in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 97-100, 2001.

HASSANEIN, R.; SAWADA, T.; KATAOKA, Y.; GADALLAH, A.; SUZUKI, Y.; TAKAGI, M.; YAMAMOTO, K. Pathogenicity for mice and swine of *Erysipelothrix* isolates from the tonsils of healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2-3, p. 231-238, 2003.

HOFFMANN, C.W.; BILKEI, G. Case study: chronic Erysipelas of the sow – a subclinical manifestation of reproductive problems. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 2, p. 119-120, 2002.

HUNTER, S. H. Some growth requirements of *Erysipelothrix* sp and *Listerella*. **Journal of Bacteriology**, v. 43, p.629-640, 1942.

IOWA STATE UNIVERSITY / COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE;
Swine Diseases. Disponível: <http://www.vetmed.iastate.edu/departments/swine>.
Acesso em 17 ago. 2004.

KUCSERA, G. Y. Serological typing of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains and the epizootiological significance of the typing. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 27, n. 1-2, p. 19-28, 1979.

McKEAN, D. Swine erysipelas. **Swine Health**, Iowa State University, n.13, 1990.
Disponível em: <<http://www.extension.iastate.edu>> Acesso em: 09 ago. 2004.

MOULTON, J. E.; RHODE, E. R.; WHEAT, J. D. Erysipelatous arthritis in calves. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, p. 335-340, 1953.

NICOLAIEWSKY, S.; WENTZ, I.; COSTA, O. A. D.; SOBESTIANSKY, J. Sistemas de Produção de Suínos. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SESTI, L. A. C. (Eds). **Suinocultura Intensiva**. Sistema de Produção de Informação - Brasília, 1998, p. 13-26.

NORRUNG, V. Two new serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Nord. Veterinary Medicine**, v. 31, n. 11, p. 462-465, 1979.

NORRUNG, V.; MUNCH, B.; LARSEN, H. E. Occurrence, isolation and serotyping of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in cattle and pig slurry. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 28, n. 1, p. 9-14, 1987.

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

PEREYRA, N.; CAMPÁ, M.; CANE, F.; COMBA, E.; VIGO, G.; PERFUMO, C. Mal rojo del cerdo – primera descripción en la República Argentina de un caso con lesiones cutáneas típicas. **Veterinaria Argentina**, v. XV, n. 147, p. 498-503, 1998.

POTVLIERGE, C.; HANSEN, W. *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 11, n. 4, p. 30-31, 1989.

PROCTER, W. I. Subacute bacterial endocarditis due to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **The American Journal of Medicine**, v. 38, n.5, p. 820-824, 1965.

QUINN, P. J., CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In: _____. **Clinical Veterinary Microbiology**, Wolfe, 1994, p. 175-177.

REDHEAD, K.; PUGH, C. A.; FENSEN, N. E.; HOUGHTON, S. B. Cross protection against *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 10 induced by a serotype 1 and 2 vaccine. **Veterinary Record**, v. 142, n. 22, p. 612, 1998.

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

ROBSON, J. M.; McDOUGALL, R.; VALK, S. V. D.; WAITE, S. D.; SULLIVAN, J. J. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an uncommon but ever present zoonosis. **Pathology**, v. 30, n. 4, p. 391-394, 1998.

ROSS, R.; HILL, M.; WOOD, R. L. Swine arthritis. **Herd Health**, Purdue University, Indiana, Dez/1991. Disponível em: <<http://www.genome.iastate.edu>> Acesso em: 10 ago. 2004.

SÁNCHEZ, M.; LANGERLELDT, B.; GONZÁLEZ, A.; MEULLE-STEF, V.; BORIE, C. Serotipos de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en cerdos con artritis en Chile. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v. 6, n. 2, p. 162-165, 1991.

SHIMOJI, Y.; Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 965-972, 2000.

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.

SMITH, W. J.; MORGAN, M.; Lameness and arthritis in the growing and finishing pig – Some farm and abattoir observations. **The Pig Journal – Refereed Section**, p. 8-27, 1995.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. Erisipela Suína. In: _____. **Clínica e Patologia Suína**, 1999, p. 149-151.

STENSTRÖM, I. M.; NORRUNG, V.; TERNSTRÖM, MOLIN, G. Ocurrência de diferentes serotipos de *Erysipelothrix rhusiopathiae* em carne de porco e peixe. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 33, n. 2, p. 169-173, 1992.

STEPHENSON, E. H.; BERMAN, D. T. Isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from tonsils of apparently normal swine by two methods. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 1, p. 187-188, 1978.

STRAW, B. E.; Skin. In: LEMAN, A.; STRAW, B. E.; MENGELING, W.; D'ALLIERE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds). **Diseases of Swine**. Iowa State University Press: Ames Iowa, 7th edition, 1992, p. 196-216.

TAKAHASHI, T.; SAWADA, T.; SETO, K.; MURAMATSU, M.; MARUYAMA, T.; KANZAKI, M. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains of serovars 1a, 3, 5, 6, 8, 11, 21 and type N isolated from slaughter pigs affected with chronic erysipelas. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 47, n. 1, p. 1-8, 1985.

TAKAHASHI, T.; HIRAYAMA, N.; SAWADA, T.; TAMURA, Y.; MURAMATSU, M. Correlation between adherence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains of serovar 1a to tissue culture cells originated from porcine kidney and their pathogenicity in mice and swine. **Veterinary Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 57-64, 1987.

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, n. 3, p. 536-539, 1987.

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.

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, n. 3, p. 469-473, 1992.

TAKAHASHI, T.; TAKAGI, M.; YAMAOKA, R.; OHISHI, K.; NORIMATSU, M.; TAMURA, Y.; NAKAMURA, M. Comparison of the pathogenicity for chickens of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum*. **Avian Pathology**, v. 23, p. 237-245, 1994.

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 Medicine Science**, v. 58, n. 6, p. 587-589, 1996.

TAKAHASHI, T.; SUNAMA, P.; SATRA, J.; CHOLSINDHU, N.; KONGTHON, S.; JITNUPONG, W.; YAMAMOTO, K.; KIJIMA, M.; FURUUCHI, S. Serotyping and pathogenicity of *Erysipelothrix* strains isolated from tonsils of slaughter pigs in Thailand. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 61, n. 9, p. 1007-1011, 1999.

TAKAHASHI, T.; FUJISAWA, T.; YAMAMOTO, K.; KIJIMA, M.; TAKAHASHI, T. Taxonomic evidence that serovar 7 of *Erysipelothrix* strains isolated from dogs with endocarditis are *Erysipelothrix tonsillarum*. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, n. 4, p.311-313, 2000.

TAKAHASHI, T.; TAKAGI, M.; YAMAMOTO, K.; NAKAMURA, M. A serological survey on erisipelas in chickens by growth agglutination test. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, n. 10, p. 797-799, 2000.

TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.; ZARKASIE, K.; NAKAMURA, M.; YOSIMURA, H. Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel eletrophoresis of cell proteins. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 1, p. 111-114, 1993.

TIMONEY, J. Seasonal variations in the tonsillar carrier rate of *E. rhusiopathiae* in Irish market pigs. **Irish Veterinary Journal**, v. 24, p. 81-85, 1970.

TIMONEY, J. F.; GROSCHUP, M. M. Properties of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 3-4, p. 381-387, 1993.

TUOVINEN, V. K.; LEVONEN, K. H.; GRÖHN, Y. T.; STRAW, B. E. The prevalence of some economically important swine diseases in farrowing units in southwestern Finland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 19, p. 85-100, 1994.

VICKERS, C. L.; BIERER, B. W. Triple sugar iron agar as an aid in the diagnosis of erysipelas. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 133, p. 543-544, 1958.

WALKER, R. L. *Erysipelothrix*. In: BIBERSTEIN, E. L. & ZEE, Y. C. (Eds). **Tratado de Microbiología Veterinaria**. Editorial Acribia S. A., 1º ed., 1990, p. 331-335.

WANG, Q.; FIDALGO, S.; CHANG, B. J.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. The detection and recovery of *Erysipelothrix sp* in meat and abattoir samples in Western Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 5, p. 844-850, 2002.

WHITE, T. G.; SHUMAN, R. D. Fermentation reactions of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 82, p. 595-599, 1961.

WOOD, R. L. A selective liquid medium utilizing antibiotics for isolation of *Erysipelothrix insidiosa*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, n. 115, p. 1303-1308, 1965.

WOOD, R. L. *Erysipelothrix*. In: BLAIR, J. E.; LENNETTE, E. H.; TRUANT, J. P. (Eds). **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1970, p. 101-105.

WOOD, R. L. Isolation of pathogenic *Erysipelothrix rhusiopathiae* from feces of apparently healthy swine. **American Journal of Veterinary Research**; v. 35, n. 1, p.41-43, 1974.

WOOD, R. L. Swine erysipelas – a review of prevalence and research. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 184, n. 8, p. 944-949, 1984.

WOOD, R. L. Erysipelas. In: LEMAN, A.; STRAW, B.; MENGELING, W. *et al.* (Eds) **Diseases of Swine**. Ames: Iowa State University Press, 7th edition, 1992, p. 475-486.

WOOD, R. L. Erysipelas. In: STRAW, BE, D'ALLAIRE S, MENGELING L, TAYLOR DJ (Eds). **Diseases of Swine**. Ames: Iowa State University Press, 8th edition, 1999, p. 419-430.

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, n. 11, p. 1833-1840, 1978.

WOOD, R. L.; HAUBRICH, D. R.; HARRINGTON, R. Isolation of previously unreported serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 12, p. 1958-1961, 1978.

WOOD, R. L.; PACKER, R. A. Isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from soil and manure of swine-raising premises. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, n. 8, p. 1611-1621, 1972.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World processing, database and statistics program for public health (EpiInfo). Versão 6.04b. Geneva:WHO, 1997.

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, n. 3, p. 301-303, 1999.

ZARKASIE, K.; SAWADA, T.; YOSHIDA, T.; TAKAHASHI, I.; TAKAHASHI, T. Growth ability and immunological properties of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 2. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 58, n. 1, p. 87-90, 1996.

7. ANEXO

7.1. Relação dos reagentes utilizados

REAGENTES	MARCA
Tryptose Phosphate Broth	Acumedia
Ágar – ágar granulado	Merck
Tween 80 P.S. (Polissorbato 80)	Vetec Química
Sulfato de gentamicina	Schering-Plough
Kanamicina A monossulfato	Sigma
Caldo infusão cérebro e coração	Oxoid
Azida sódica	Nuclear
Tris (Hidroximetilaminometano) P.A.	Nuclear
Ágar triplice açúcar e ferro	Oxoid
Gelatina	Difco
Ágar sangue base	Vetec
Bacto blood agar base	Difco
Arabinose-L	Vetec
Xilose	Merck
Sacarose	Merck
Glicose	Merck
Frutose	Reagen
Hidróxido de sódio (P.A.)	Merck
Ácido clorídrico	Merck
Cloreto de sódio	Merck
Cristal violeta (P.A.)	Nuclear
Fucsina básica (P.A.)	Nuclear
Fucsina ácida (P.A.)	Synth
Acetona (P.A. – A.C.S.)	Synth
Éter-etílico (P.A.)	Chemco
Iodo metálico	Vetec
Óleo de imersão para microscopia	Laborclin

7.2. Elaboração de meios de cultura

7.2.1. Ágar e caldo triptose fosfato

REAGENTES:

Triptose fosfato (29,5 mg/mL); 0,1% tween 80; gentamicina (0,025 mg/mL); kanamicina (0,250 mg/mL); ágar-ágar (15,0 mg/mL).

PROCEDIMENTO:

Em água destilada, adicionar triptose fosfato e tween 80. Misturar bem para dissolver todo o soluto, e posteriormente corrigir o pH ($7,6 \pm 0,2$) com solução de NaOH 1M. Fracionar a solução em dois erlenmeyers. Adicionar ágar-ágar em um dos recipientes. Autoclavar a 121°C / 15 min. Quando a temperatura estiver próxima de 40°C , adicionar os antibióticos, e em seguida distribuir os meios em placas de Petri e em tubos de rosca médio estéreis. Armazenar a 4°C .

7.2.2. TSI

Triple Sugar Agar (65 mg/mL)

Adicionar o TSI na água destilada e aquecer para dissolvê-lo. Corrigir o pH ($7,6 \pm 0,2$). Distribuir em tubos de rosca pequeno (2 mL / tubo). Autoclavar a 120°C / 15 min. Deixar os tubos inclinados para a solidificação do meio. Armazenar a 4°C .

7.2.3. Gelatina

Gelatina 12% (120 mg/mL)

Adicionar a gelatina na água destilada e aquecer para dissolvê-la. Corrigir o pH ($7,6 \pm 0,2$). Distribuir em tubo de rosca pequeno (2 mL / tubo). Autoclavar a 120°C / 15 min. Armazenar a 4°C .

7.2.4. BHI

BHI (37,0 mg/mL)

Adicionar o BHI na água destilada e aquecer para dissolvê-lo. Corrigir o pH da solução ($7,6 \pm 0,2$). Distribuir em tubos de rosca pequenos (1 mL / tubo). Autoclavar a 120°C / 15 min. Armazenar a 4°C .

7.2.5. Açúcares

Açúcar a 1% (10,0 mg/ml)

Adicionar uma parte do açúcar a 1% em 19 partes da solução água peptonada adicionada de indicador de Andrade (10 ml água peptonada / 0,1ml de indicador). Distribuir em tubo de rosca pequeno contendo tubo de Durham. Deixar na estufa a 37°C / 48 horas, para teste de esterilidade. Armazenar a 4°C.

Obs.: A solução de açúcar a 1% deve ser tinalizada (100°C / 30 min) e não autoclavada. Fazer três tinalizações. Esperar a solução resfriar entre as tinalizações.

7.2.5.1. Indicador de Andrade

4,0g Fucsina ácida

160 mL NaOH a 4,0%

840 mL Água destilada

Adicionar o NaOH na fucsina ácida. Agitar e acrescentar a água destilada. A solução final apresenta coloração levemente amarelada. Autoclavar a 120°C / 15 min. Armazenar a 4°C.

7.2.5.2. Água peptonada

3,0g NaCl

9,0g peptona

600 ml água destilada

Adicionar o NaCl e a peptona na água destilada, agitar até a dissolução total dos solutos. Autoclavar a 120°C / 15 min. Armazenar a 4°C.

7.2.6. Coloração de gram

7.2.6.1. Fucsina

0,1 mL Ziehl Neelsen / mL água destilada ou
10 mg fucsina / mL

Triturar a fucsina com o uso de gral e pistilo. Misturar um pouco de água destilada. Adicionar a solução em erlenmeyer e adicionar o restante da água destilada. Deixar em agitação por 6 horas. Filtrar em papel filtro. Armazenar em piseta, a temperatura ambiente.

7.2.6.2. Cristal violeta

Cristal violeta a 1% (10 mg/mL)

Triturar o CV com o uso de gral e pistilo. Misturar um pouco de água destilada. Adicionar a solução em erlenmeyer e adicionar o restante da água destilada. Deixar em agitação por 6 horas. Filtrar em papel filtro. Armazenar em piseta, a temperatura ambiente.

7.2.6.3. Lugol

1g iodo metálico
2g iodeto
300 mL água destilada

Triturar o iodo metálico e o iodeto com o uso de gral e pistilo. Misturar um pouco de água destilada. Adicionar a solução em erlenmeyer e adicionar o restante da água destilada. Filtrar em papel filtro. Armazenar em piseta, a temperatura ambiente.

8. APÊNDICE

8.1. Meio seletivo cristal violeta modificado

REAGENTES:

BHI (37,0 mg/mL); 0,1% tween 80 (1,0 µL/mL); 0,1% azida sódica (1,0 mg/mL); 0,001% cristal violeta (0,01 µL cristal violeta a 1,0%/mL); hidroximetilaminometano (3,0 mg/mL); gentamicina (0,02 mg/mL).

PROCEDIMENTO:

Dissolver o BHI na água destilada e adicionar o tween 80. Ajustar o pH ($7,6 \pm 0,2$) e autoclavar a 121°C / 15 min. Quando a temperatura estiver próxima de 40°C , adicionar azida sódica, cristal violeta, gentamicina e hidroximetilaminometano. Distribuir 10 mL em tubos de rosca médio estéreis. Armazenar a 4°C .

8.2. Custo de reagentes segundo a técnica

TÉCNICA	REAGENTE	PREÇO/QUANT.	QUANT. UTILIZADA (100 SUÍNOS)	PREÇO (100 SUÍNOS)	PREÇO (SUÍNO)
TP	Caldo TP	R\$ 147,6 / 500g	29,5 g	R\$ 8,71	
	Ágar-ágar	R\$462,00 / 1 Kg	18 g	R\$ 8,32	
	Gentamicina	R\$ 5,0 / 80 mg	55 mg	R\$ 3,44	
	Kanamicina	R\$ 274,0 / 5g	550 mg	R\$ 30,14	
	Tween 80	R\$ 36,9 / 1L	2,2 ml	R\$ 0,08	
TOTAL				R\$ 50,69	R\$ 0,51
CV	BHI	R\$ 252,75 / 500g	37g	R\$ 18,70	
	Hidroximetilaminometano	R\$ 104,0 / 500g	3g	R\$ 0,62	
	Tween 80	R\$ 36,9 / 1L	1 ml	R\$ 0,04	
	Azida sódica	R\$ 45,0 / 100g	1 g	R\$ 0,45	
	Gentamicina	R\$ 5,0 / 80 mg	20 mg	R\$ 1,25	
	Cristal violeta	R\$ 8,70 / 25g	0,01g	R\$ 0,01	
TOTAL	Ágar sangue base	R\$ 210,65 / 500g	51,74g	R\$ 21,80	R\$ 42,87
					R\$ 0,43

8.3. Tabela 04 – Tonsilas coletadas e positivas para o isolamento de *Erysipelothrix* sp segundo o município e o estado da federação.

ESTADO	MUNICÍPIO	N.ºPROPRIEDADES	N.ºTONSILAS COLETADAS	N.º TONSILAS POSITIVAS (%)
MG	Ponte Nova	03	42	12
	Urucânia	02	29	05
	Oratórios	01	15	03
	Rio Casca	01	15	03
	Piedade de Ponte Nova	01	15	01
	Jequeri	01	15	07
	Senhora de Oliveira	01	10	01
	Astolfo Dutra	01	02	0
	Rio Novo	01	10	0
	Rio Pomba	01	02	0
	Teixeiras	01	01	0
SUBTOTAL		14	156	32 (20,51%)
SP	Fartura	02	30	09
	Areiópolis	01	15	0
	Arealva	01	15	01
	Bauru	01	15	01
SUBTOTAL		05	75	11 (14,67%)
GO	Rio Verde	06	62	11
	Santa Helena de Goiás	02	21	05
	Bom Jesus	01	09	01
	Santo Antônio da Barra	01	11	0
	Montividiu	01	12	01
	Aparecida do Rio Doce	02	20	17
SUBTOTAL		13	135	35 (25,93%)
MS	Dourados	02	20	0
	Glória de Dourados	03	30	02
	Jateí	01	10	01
	Itaporã	02	20	01
	Rio Brilhante	01	22	10
	Ivinhema	02	16	01
SUBTOTAL		11	118	15 (12,71%)
PR	Toledo	03	26	06
SUBTOTAL		03	26	06 (23,08%)
TOTAL		46	510	99 (19,41%)