

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA- FAMEV UFU
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

DIOGO NAVES DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE *ERYSIPELOTHRIX* SP. STRAIN 2 EM
MODELO DE EMBRIÃO DE GALINHA**

UBERLÂNDIA-MG

2022

DIOGO NAVES DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE *ERYSIPELOTHRIX* SP. STRAIN 2 EM
MODELO DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parcial requisito à obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Belcholina Beatriz Fonseca
Co-orientadora: M^a. Thais Fernanda Martins dos Reis

UBERLÂNDIA-MG

2022

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE *ERYSIPELOTHRIX* SP. STRAIN 2 EM
MODELO DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Médico Veterinário, pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 30 de março de 2022.

Prof^a. Dr^a Belchiolina Beatriz Fonseca
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr^a Eliane Pereira Mendonça
Universidade Federal de Uberlândia

Msc. Simone Sommerfeld
Universidade Federal de Uberlândia

UBERLÂNDIA-MG

2022

RESUMO

As bactérias do gênero *Erysipelothrix* sp, são bastonetes gram-positivos responsáveis por causar uma doença infectocontagiosa, que podem acometer animais selvagens, domésticos e humanos. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações que a *Erysipelothrix* sp *strain 2* pode causar em modelo experimental de embrião de galinha. Para a avaliação da patogenicidade do microrganismo, ovos embrionados de galinha foram inoculados com duas cepas já caracterizadas e sequenciadas, que foram isoladas durante um surto. As inoculações ocorreram em diferentes concentrações sendo elas, 1 e 3 log UFC/embrião no 10º dia de desenvolvimento embrionário via alantóide. Aos 17 dias de incubação foi realizada a pesagem dos embriões e avaliação das características macroscópicas. Quando os embriões foram inoculados com 1 log UFC não houve diferença no peso em relação ao controle negativo. As taxas de mortalidade embrionária se mostraram aumentadas, o aumento foi mais significativo quando inoculados com 3 log de UFC/embrião. Embriões inoculados com 3 log de UFC da cepa 7 apresentaram lesões em membros pélvicos. Não houve diferenças das cepas 6 e 7 em termos de patogenicidade. As cepas 6 e 7 podem ser usadas em testes com animais nascidos a fim de se entender melhor a patogenicidade da doença.

Palavras-chave: Erisipela, perus, cepas, patogenicidade.

ABSTRACT

The genus *Erysipelothrix* sp are gram-positive rods responsible for an infectious disease, which can affect humans and wild, domestic animals. This work aimed to evaluate the changes that the *Erysipelothrix* sp strain 2 (ES2) may induce in chicken embryo's experimental model. In the evaluation of the pathogenicity of the microorganism, embryonated chicken eggs were inoculated with two strains (number 6 and 7) – characterized and sequenced – which were isolated during an outbreak between March 2014 and February 2015. On the 10th day of embryonic development, the concentrations of 1 and 3 log CFU/embryo were applied in the allantoic pathway. At 17 days of incubation, the embryos were weighed and their macroscopic characteristics were evaluated. The results of this experimental model showed that the concentration of 1 log CFU of strains 6 and 7 did not change the difference in embryo weight in relation to the negative control. Embryonic mortality rates were shown to be increased, the most significant being the concentration with 3 log CFU. Embryos inoculated with 3 log CFU of strain 7 showed lesions in the pelvic limbs, which did not occur in embryos with strain 6 at the same concentration. Furthermore, there were no differences in terms of pathogenicity between the strains. Therefore, strains 6 and 7 can be used in tests with born animals in order to better understand the pathogenicity of the disease.

Keywords: Erysipelas, turkeys, strains, pathogenicity.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Ovoscopia	18
Figura 2 - Mortalidade (%) diária de embriões inoculados com 1log UFC/ embrião..	21
Figura 3 - Peso médio ajustado dos embriões inoculados com 1 log de UFC/embrião	22
Figura 4 - Mortalidade (%) diária de embriões inoculados com 3log UFC/ embrião..	23
Figura 5 - Lesões em membros pélvicos (seta) de embriões inoculados com 3 log de UFC com a cepa de Erysipelothrix sp. strain 2 (cepa 7)	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Agente etiológico	10
2.2. Hospedeiros	11
2.3. Epidemiologia	12
2.4. Patogenia e patogenicidade	12
2.5. Diagnóstico	13
2.6. Tratamento	14
2.7. Prevenção	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Modelo experimental	17
4.2. Local do experimento	17
4.3. Incubação e Inoculação	17
4.4. Coleta dos materiais	18
4.5. Análise estatística	18
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	25
REFÊRENCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

A erisipela é uma doença infectocontagiosa, cosmopolita que pode causar lesões cutâneas, articulares, cardíacas e eventos septicêmicos. A doença é causada por bactérias do gênero *Erysipelothrix* sp e pode acometer animais selvagens, domésticos e humanos (KANG et al., 2017). Na última década foi observado um aumento na incidência da patologia em países como Japão, Estados Unidos e China (BENDER et al., 2011).

Em perus a Erisipela causa infecção aguda e fulminante, septicemia e diminuição do rendimento. Em surtos nota-se que algumas aves podem apresentar instabilidade na marcha. Perda de peso, animais anêmicos, alguns casos de endocardite e morte também são observados. Em perus machos também pode ocorrer a perda de fertilidade. Carcaças de animais acometidos são desclassificadas e condenadas (BRICKER; SAIF, 2013).

Estudos de hibridização de DNA do gênero *Erysipelothrix*, permitiram a classificação do mesmo em diferentes espécies como a *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Erysipelothrix tonsillarum*, (TAKESHI et al., 1999), *Erysipelothrix strain 1*, *Erysipelothrix* sp. *strain 2* (BENDER et al., 2010), *Erysipelothrix Inopinata* (VERBARG et al., 2004), *Erysipelothrix larvae* (BANG et al., 2016). Com a utilização de técnicas de hibridização do DNA foi possível identificar uma grande diversidade intraespecífica. Sendo assim, o avanço da utilização de novas técnicas de análise do sequenciamento genômico possibilitou melhor classificação das espécies.

A *Erysipelothrix* sp. possui uma ampla distribuição geográfica, é considerada então uma doença cosmopolita. Essa característica pode estar relacionada com sua capacidade de resistência ambiental, e com sua capacidade de infectar diferentes tipos de hospedeiros de vários ecossistemas diferentes, inclusive o ser humano (OLIVEIRA, 2009).

A patogenicidade de *E. tonsillarum* e *E. rhusiopathiae* são diferentes. A patogenicidade de *E. rhusiopathiae* foi confirmada em aves, enquanto *E. tonsillarum* não possui patogenicidade nestes animais (MAKINO et al, 1994). *E. rhusiopathiae*, é considerada a principal causadora da doença na produção de suínos e aves, sendo responsável por perdas econômicas na produção dos mesmos. Infecções causadas por *E. rhusiopathiae* são mais comuns em perus do que em frangos de corte, as

perdas na produção de perus estão associadas a infecções agudas, gastos com tratamento, queda na produtividade, diminuição no rendimento, e condenação de carcaça. Em 2015 foi detectado no Triângulo Mineiro um surto em perus, a infecção foi caracterizada por septicemias e alta mortalidade (HOEPERS et al., 2019). Dentre os animais infectados foram encontrados animais positivos para *Erysipelothrix* sp. *strain 2*.

Pouco se sabe sobre a *Erysipelothrix* sp. *strain 2* e sua patogenicidade e resposta imune em galinhas e perus. Estudos acerca desse assunto são importantes para melhor conhecer tal patógeno e assim obter dados que possam auxiliar em estudos acerca do controle desse patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agente etiológico

Erysipelothrix sp. é um grupo de bactérias *Gram-positivas* (OPRIESSNIG et al., 2020), que tem seu formato semelhante a bastonetes (BROOKE; RILEY, 1999), são imóveis e não formam esporos. O comprimento do bastonete varia de 0,8 a 2,5 µm, e o diâmetro de 0,2 a 0,4 µm (REBOLI, 1989). A bactéria pertence ao filo Firmicutes, que recentemente passou por uma reorganização das classes, devido análises das sequências de subunidades do RNA. A classe dos Mollicutes, a qual a *Erysipelothrix* sp pertencia foi removida do filo *Fimicutes*, fez-se então necessária a criação de uma classe separada para a família *Erysipelotrichaceae* (LUDWIG; SCHLEIFER: WHITMAN, 2009). Sendo assim, a classe *Erysipelotrichia* passou a ser dividida em uma única ordem que contempla 10 gêneros (VERBARG et al., 2014).

A classificação taxonômica foi baseada em recentes estudos do sequenciamento genômico das espécies do gênero *Erysipelothrix* (KWOK et al., 2014). Este gênero foi classificado como membro da família *Erysipelotrichaceae* que atualmente possui em sua composição diferentes espécies, sendo elas: *E.rhusiopathiae*, sorovares 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 e N, *Erysipelothrix tonsillarum*, sorovares 3, 7, 10, 14, 20, 22 e 23 (TAKESHI et al., 1999), *Erysipelothrix strain 1*, que anteriormente era classificada como sorotipo 13 da espécie *E.rhusiopathiae*; *Erysipelothrix sp. strain 2* (BENDER et al., 2011), *Erysipelothrix Inopinata* (VERBARG et al., 2004 e *Erysipelothrix larvae* (BANG et al., 2016).

A primeira bactéria do gênero a ser reconhecida foi a *Erysipelothrix rhusiopathiae* no ano de 1876, a partir da inoculação em camundongos. Ela foi também a primeira bactéria do gênero a ser descrita com a capacidade de infectar diferentes espécies. *E.rhusiopathiae* é um microrganismo bacilar, com leve curvatura ou reto, com extremidades delgadas arredondadas, pode ser encontrado em diferentes arranjos, ou em pequenas cadeias que se assemelham a letra “V” (COUTINHO, 2010), ou podem se apresentar aleatoriamente agrupados. Em alguns casos se encontram em conformação filamentosa, mas essas características são observadas em uma menor frequência (REBOLI; FARRAR, 1992).

A faixa de temperatura para o crescimento da *E. rhusiopathiae* varia de 15 a 44°C, sendo a temperatura ideal entre 30 e 37°C. O pH para o crescimento varia de 6,7 a 9,2 e a faixa de pH ideal é 7,2 a 7,6. Apesar de ser um microrganismo anaeróbio

facultativo, pode apresentar crescimento aumentado quando o mesmo é submetido a uma atmosfera microaerófila. As exigências nutricionais ainda não foram muito bem definidas, mas o crescimento da *E. rhusiopathiae* pode ser potencializado quando em contato com sangue, 5 a 10% de soro, triptofano e glicose (COUTINHO, 2010).

2.2 Hospedeiros

A *Erysipelothrix* sp pode infectar diferentes tipos de aves, peixes, ácaros (CHIRICO et al., 2003), crustáceos e mamíferos (OVERSTREET, 1987). Em aves já foi relatada em galinhas poedeiras em gaiolas (MUTALIB; KING; MCDONOUGH, 1993), codornas (MUTALIB; KEIRS; AUSTIN, 1995), pingüins (BOERNER et al. 2004), faisões de pescoço anelado (HENNIG et al., 2002). Foi relatada também em animais de vida aquática como golfinhos (DÍAZ-DELGADO et al., 2015). A espécie *E. rhusiopathiae* é amplamente distribuída pelo mundo, e é uma bactéria comensal ou patogênica (OVERSTREET, 1987). A *Erysipelothrix. rhusiopathiae* foi isolada em amostras de carnes de suíno, bacalhau e arenque, sendo o sorovar tipo 2 o predominante nas amostras analisadas (STENSTRÖM et al., 1992).

A espécie *E. tonsillarum* é frequentemente isolada das tonsilas de suínos, frangos e bovinos, que se encontravam saudáveis (TAKAHASHI et al., 1987). Mesmo sendo isoladas em animais aparentemente saudáveis, já foi relatada como agente etiológico da endocardite em cães (ERIKSEN et al., 1987), o que indicaria que algumas cepas de *Erysipelothrix* sp possam ser patogênicas nestes animais (TAKAHASHI et al., 2000).

Em 2015 no Brasil, foi relatado um surto de *Erysipelothrix* sp. *strain 2* em perus machos de aproximadamente 70 dias de idade, causando septicemias e alta mortalidade nos animais (HOEPERS et al., 2019). Poucos estudos foram feitos sobre a espécie. No passado a *Erysipelothrix* sp. *strain 2* era classificada como sorotipo 18 da espécie *E. rhusiopathiae* (TAKAHASHI et al., 1994). Estudos feitos por Takahashi et al. (1994) mostraram que o sorotipo possui alta virulência para camundongos e em suínos é capaz e causar urticárias.

O surgimento de uma doença em peixes ornamentais relatado recentemente, foi associada ao gênero *Erysipelothrix*. Estudos do sequenciamento do genoma e das diferenças observadas na virulência da bactéria mostraram que se tratava de uma nova espécie altamente virulenta, essa espécie foi denominada de *Erysipelothrix. piscisicarius* que se trata da *Erysipelothrix* sp. *strain 2* (Grazziotin et al, 2021).

2.3 Epidemiologia

Entre os mamíferos acometidos pela *E. rhusiopathiae*, são observados problemas principalmente em suínos e aves.

Em suínos a erisipela pode ser a causadora de uma doença com elevada importância na produção mundial, essa importância está relacionada com as perdas nos índices reprodutivos e nos gastos com o tratamento de animais acometidos (OPRIESSNIG et al., 2004). Todos os suínos podem ser acometidos, independentemente da idade. Leitões mais jovens se demonstram mais resistentes devido à imunidade adquirida pela ingestão de colostro (IMADA et. al., 2003).

Em aves a erisipela é observada com uma maior frequência em perus machos, porém não há estudos que evidenciem essa predileção pelo sexo masculino (BRICKER; SAIF, 2013). Galinhas White leghorn infectadas pela erisipela foram observadas e apresentaram uma mortalidade de 13 a 33%, (BISGAARD; OLSEN 1975). Perus quando acometidos por erisipela podem apresentar queda em seus índices reprodutivos, o que ocorre devido à diminuição da fertilidade dos machos acometidos, eles também apresentam queda de rendimento e septicemia. Através de observações feitas no campo, notou-se que as lesões de pele são as principais portas de entrada para a erisipela. A infecção por *E. rhusiopathiae* pode ainda levar a condenação de carcaça, devido as lesões causadas (BRICKER; SAIF, 2013).

Em peixes foi relatada uma mortalidade de baixa a moderada associada a um *Erysipelothrix* sp (POMARANSKI et al., 2018), a bactéria é ainda capaz de sobreviver por um longo período na superfície mucoide dos mesmos (CASTRO et al., 1972).

A *Erysipelothrix rhusiopathiae* possui também potencial zoonótico, a doença foi descrita em humanos pela primeira vez em 1870 e a causa da doença pode estar relacionada ao contato com as indústrias de carnes e de peixes e outros produtos de origem animal contaminados (NAKAZAWA, 1998).

2.4 Patogenia e patogenicidade

Os mecanismos patogênicos das infecções por *E. rhusiopathiae* não são bem definidos (BROOKE; RILEY, 1999). Sabe-se que a *Erysipelothrix* sp possui a capacidade de causar infecções em seus hospedeiros utilizando diferentes vias de entrada. Em suínos, aves e até outras espécies animais, a infecção tem como uma das vias de entrada a ingestão de água ou alimentos contaminados, causando então

infecções naturais (SHIMOJI, 2000). Acredita-se que a penetração da bactéria no organismo inicie-se através do tecido linfóide ou das tonsilas, a aquisição da doença também pode ser através de ferimentos na pele dos animais (OLIVEIRA, 2009).

Algumas características como: idade do animal na ocasião da infecção, nível de anticorpos, quantidade de agentes infectantes, virulência da bactéria e existência de agentes imunodepressores, são fatores que explicam o porquê de diferentes lotes apresentarem diferença na intensidade dos sinais clínicos ocasionados pela *Erysipelothrix* sp (GYLES, 1993).

Vários fatores de virulência têm sido estudados e estão relacionados com a patogenia, mas ainda não tiveram suas importâncias confirmadas (BROOKE; RILEY, 1999). Dentre esses fatores podemos citar a cápsula, proteínas de superfície e as enzimas extracelulares. A cápsula é o fator mais importante de virulência da *E. rhusiopathiae*, isso se dá devido à presença de um polissacarídeo na superfície da célula (SHIMOJI, 2000). Estudos observaram que bactérias que sofrem com a perda da cápsula se demonstram não virulentas (SHIMOJI et al., 1994).

Dentre as enzimas extracelulares que podem estar envolvidas com a patogenia destacam-se a neuroaminidase e hialuronidase. A neuroaminidase atua facilitando a ligação da bactéria aos tecidos, e logo após a ligação ocorre a invasão da célula do hospedeiro. A invasão endotelial causa distúrbios vasculares que são observados nas fases iniciais de processos de septicemia. Já a hialuronidase atua de forma a facilitar a dispersão e disseminação de patógenos (SHIMOJI, 2000).

As proteínas de superfície são um dos fatores fundamentais para a aderência da bactéria à célula. Cepas de *E. rhusiopathiae* que aderem melhor às células se demonstraram mais virulentas que cepas que não possuem a mesma capacidade de aderência à célula hospedeira (TAKAHASHI et al., 1987).

2.5 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico são realizados quando há animais apresentando quadro clínico, ou quando se tem a suspeita da doença. Para que seja possível chegar ao diagnóstico final é necessário associar a sintomatologia clínica aos testes laboratoriais. Em laboratório é realizado o cultivo das bactérias, as quais serão obtidas de sangue, órgãos, fezes ou pele de animais (OLIVEIRA, 2000).

A técnica da PCR, teste de reação em cadeia polimerase é uma técnica que auxilia na detecção das bactérias do gênero *Erysipelothrix*, é importante para complementar outros métodos de detecção (PAL; BENDER; OPRIESSNIG, 2010).

Algumas outras técnicas são utilizadas no diagnóstico da infecção por *Erysipelothrix*. O teste sorológico ELISA e o teste de fixação de complemento são amplamente utilizados, mas deve-se tomar cuidado na interpretação dos resultados, uma vez que podem existir falsos positivos devido à presença de anticorpos vacinais, maternos, e de infecções anteriores (IMADA et al., 2003). Testes de imunodifusão também são utilizados, geralmente para sorotipagem. Para esse teste temos a obtenção do antígeno a partir de colônias isoladas em ágar sangue (BARCELLOS; OLIVEIRA; BOROWSK, 1984).

2.6 Tratamento

O tratamento de eleição para perus diagnosticados com infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae* é realizado com antibioticoterapia. O antibiótico de escolha é a penicilina sódica que deve ser administrado individualmente de acordo com o peso do animal. Quando a *E.rhusiopathiae* acomete perus de corte, o manuseio individual se torna prejudicial para animal devido ao seu temperamento, é indicado então administração da antibioticoterapia em água de bebida que será fornecida a todo o plantel. O antibiótico de escolha é a penicilina pois ela possui ação rápida, porém existem indicações de outros antibióticos que possuem longa duração (BRICKER; SAIF, 2013).

2.7 Prevenção

O controle e prevenção da erisipela em regiões endêmicas é feito por vacinação. O protocolo utilizado para perus consiste na aplicação de dose única da vacina que deverá ser administrada pela via subcutânea (SC), sendo o local indicado para a aplicação é a superfície dorsal do pescoço, logo atrás do atlas. A via intramuscular (IM) foi testada, mas nos primeiros testes já se verificou a formação de abscessos que poderiam gerar a desclassificação de carcaça no momento do abate. Perus classificados como reprodutores devem ser vacinados com duas doses, sendo o intervalo entre essas doses de 4 semanas, a primeira dose deve ser administrada antes do início da produção. A primeira dose deve ser feita com aproximadamente 16-

20 semanas de idade, já a segunda deve ser realizada no início da postura (BRICKER; SAIF, 2013).

Segundo Bricker e Saif (2013), a utilização de equipamentos limpos, desinfetados e a produção distante de locais e instalações anteriormente contaminados são fatores importantes para a prevenção doença. O uso de soluções de hidróxido de sódio 1-2%, fenóis, desinfetantes também se mostraram eficazes e importantes no controle da *E. rhusiopathiae*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a patogenicidade de *Erysipelothrix* sp strain 2 em modelo experimental de embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus*) em diferentes doses de inoculação.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar alterações patológicas que a *Erysipelothrix* sp strain 2, cepa 6 e 7 é capaz de provocar em embriões de galinha (*Gallus gallus domesticus*), quando inoculadas com 1 e 3 logs de UFC/embrião.

Avaliar se as cepas 6 e 7 de *Erysipelothrix* sp strain 2 em baixas doses levam a mortalidade em embriões inoculados com 10 dias de incubação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelo experimental

Para a realização do estudo foram utilizados 58 ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*). Os ovos utilizados eram provenientes do LIAVE (Laboratório de incubação de aves) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Eles foram mantidos em incubadora artificial (Premium Ecológica) submetida à temperatura aproximada de 37,6°C, a umidade era controlada a aproximadamente 58%. Os ovos incubados foram submetidos ao processo de viragem periódica, realizada a cada 2 horas automaticamente. Para melhor avaliação era realizada diariamente a visualização do desenvolvimento embrionário. O estudo foi realizado com a aprovação Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2. Local do experimento

O trabalho de avaliação *in vivo* foi realizado no Laboratório de Incubação de aves, bloco 2D sala 57 da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

4.3. Incubação e inoculação

Os ovos embrionados utilizados no estudo foram pesados e inoculados com as cepas 6 e 7 da bactéria *Erysipelothrix* sp. strain 2 recentemente sequenciada (Grazziotin et al, 2021). As cepas 6 e 7 da *Erysipelothrix* sp. strain 2 foram obtidas de um surto em granjas que apresentaram septicemia e alta mortalidade em perus (HOEPERS et al., 2019). Foram utilizados no experimento apenas ovos classificados como viáveis por ovoscopia. Para análise por ovoscopia, foi utilizado um forte foco de luz que incidia sobre o ovo permitindo a avaliação das estruturas internas e a presença ou não de embrião e seus movimentos. Neste tipo de avaliação é possível observar um padrão de vasos sanguíneos da membrana corioalantóide (MCA) que podem ser facilmente observados (figura 1). Já os embriões se apresentam de forma escura no interior do ovo foram descartados.

Após a análise da viabilidade, as inoculações foram realizadas via alantoide de acordo com a descrição de Jacobsen et al. (2012), no 10° dia de desenvolvimento embrionário. Para a realização dos estudos foram utilizados 29 embriões para cada inoculação, sendo 9 desses embriões inoculados com a cepa 6 de *Erysipelothrix* sp.

strain 2, 9 com a cepa 7, 5 foram utilizados como controle negativo (CN) (inoculados com solução salina) e 6 como controles positivos (CP) inoculados com *Salmonella pullorum* na mesma concentração dos inóculos da *Erysipelothrix* sp. *strain 2*. Na primeira inoculação foi utilizado 1 log UFC/embrião das cepas 6 e 7 de *Erysipelothrix* sp. *strain 2*, já na segunda inoculação, foram utilizados 3log UFC/embrião.



Figura 1- Ovoscopia

4.4. Coleta dos materiais

Para a coleta das amostras, aos 17 dias de incubação, os embriões vivos foram eutanasiados e pesados e o embriodiagnóstico foi realizado para avaliação de possíveis alterações fisiológicas e lesões provocadas pelas bactérias. Para avaliação da pesagem foi realizado um cálculo de ajuste já que cada embrião tem um peso dependendo do peso inicial do ovo. Dessa forma o peso foi ajustado para um peso inicial do ovo de 50 gramas de acordo com Ribeiro et al. (2020).

4.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Graph PadPrism 9.2. Foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) nos dados, e os que apresentaram distribuição normal, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) pós teste de

Tukey considerando um intervalo de confiança de 95%. Os resultados de mortalidade e lesões foram descritivos.

5. RESULTADOS

Na primeira inoculação, com 1 log de UFC/embrião, não se verificou mortalidade dos embriões inoculados com as cepas 6 e 7 de *Erysipelothrix* sp. strain 2 nos cinco primeiros dias de incubação.

A cepa 7 de *Erysipelothrix* sp. strain 2 causou uma morte no 6º dia de incubação, a cepa 6 causou mortalidade apenas no 7º dia de incubação. Tanto a cepa 6 quanto a 7 apresentaram uma letalidade de 11,11% ao final dos 7 dias de experimento (figura 2). O controle positivo causou mortalidade a partir do 3º dia de inoculação e ao final do experimento causou 66,67 % (figura 2). No embrião inoculado com a cepa 7, o fígado estava aumentado, hemorrágico, friável e com bordas necrosadas. O restante dos embriões não apresentaram alterações dignas de nota. O embrião morto inoculado com 1UFC da cepa 6 da *Erysipelothrix* sp. strain 2 estava diminuído de tamanho, com membrana perivitelínica congesta e com sinais de hiperemia, fígado e rins se apresentavam friáveis. Nos embriões vivos eutanasiados do CP notou-se membrana corioalantóide, hemorrágica, inflamada e com presença de cáseo. Fígados e rins também se encontravam aumentados de tamanho. Nos embriões vivos eutanasiados do grupo inoculado com 1 logUFC/embrião a cepa 6 da *Erysipelothrix* sp. strain 2 foi observado gema de coloração esverdeada e fígado de coloração amarelo esverdeada heterogênea. O restante dos embriões eutanasiados não apresentaram alterações dignas de nota. Nos embriões vivos eutanasiados inoculados com 1 logUFC/embrião da cepa 7 não houve alterações dignas de nota.

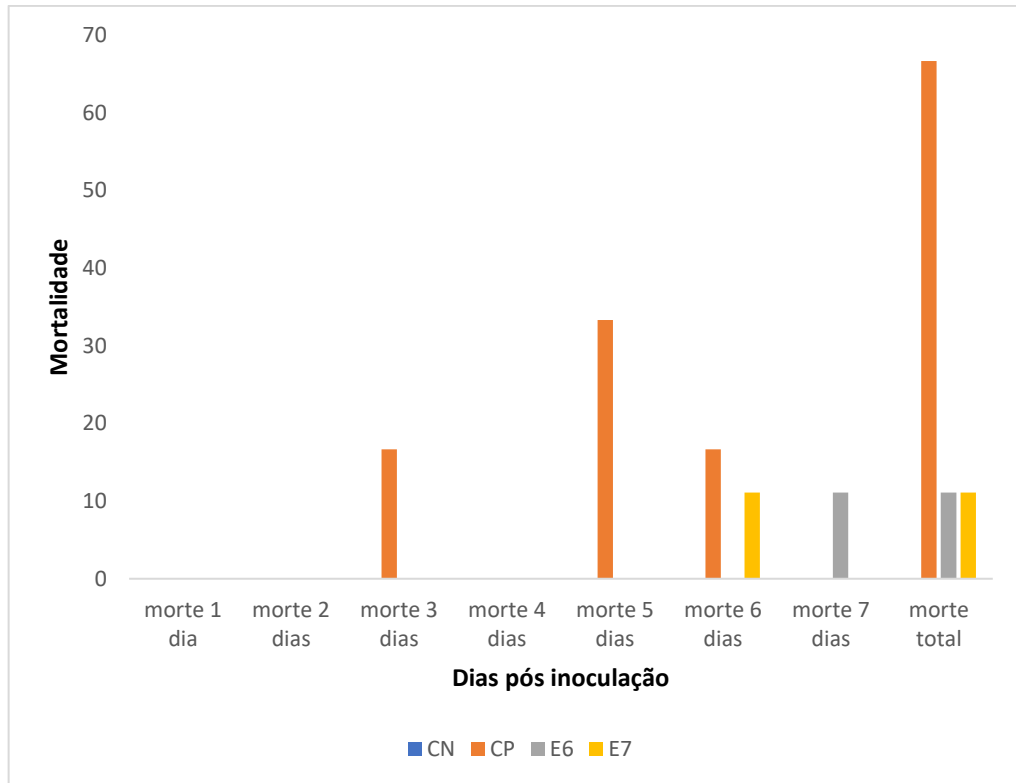


Figura 2 - Mortalidade (%) diária de embriões inoculados com 1log UFC/ embrião

Os ovos embrionados inoculados com 1 log de UFC foram pesados antes da inoculação e os embriões após a abertura dos ovos. Embriões inoculados com a cepa 6 e 7 da *Erysipelothrix* sp. strain 2 não apresentaram alterações significativas em suas massas quando comparados ao controle negativo e foram mais pesados que o CP, o que pode ser observado na figura 3.

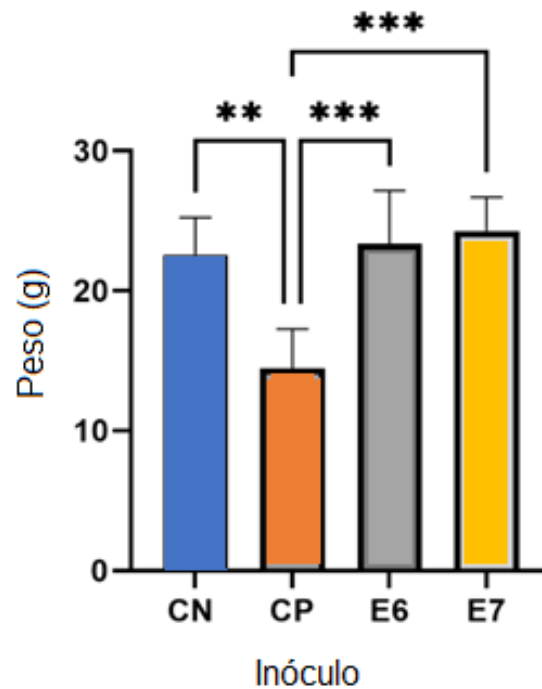


Figura 3 - Peso médio ajustado dos embriões inoculados com 1 log de UFC/embrião

Na segunda inoculação de 3 log de UFC/embrião, demonstrada na figura 4, verificou-se uma letalidade de 100% do controle positivo 24 horas após a inoculação. A cepa 7 de *Erysipelothrix* sp. strain 2, também foi a primeira a causar mortalidade ao embrião. A mortalidade iniciou no 4º dia de inoculação e ao final do experimento a cepa 7 causou 77,78% de letalidade ao embrião (figura 4). A cepa 6, causou morte no 5º dia após a inoculação e ao final do experimento a cepa 6 causou uma letalidade total de 88,89% (figura 4).

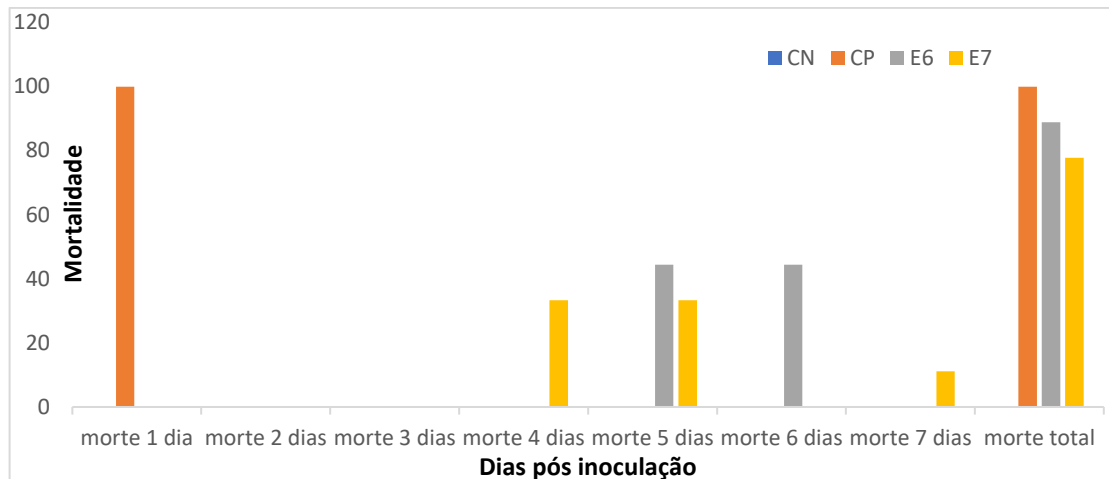


Figura 4 - Mortalidade (%) diária de embriões inoculados com 3log UFC/ embrião

Ao realizar o embriodiagnóstico de embriões inoculados com 3 log de UFC, não foram observadas alterações dignas de nota nos ovos inoculados com a cepa 6. A inoculação com a cepa 7 resultou em embriões mortos no 4º e 5º dia, os quais também não apresentaram alterações dignas de nota. Já nos embriões mortos no 7º dia de inoculação, houve uma característica inflamatória em membros pélvicos, os membros se encontravam hiperêmicos e edemaciados. (figura 5).

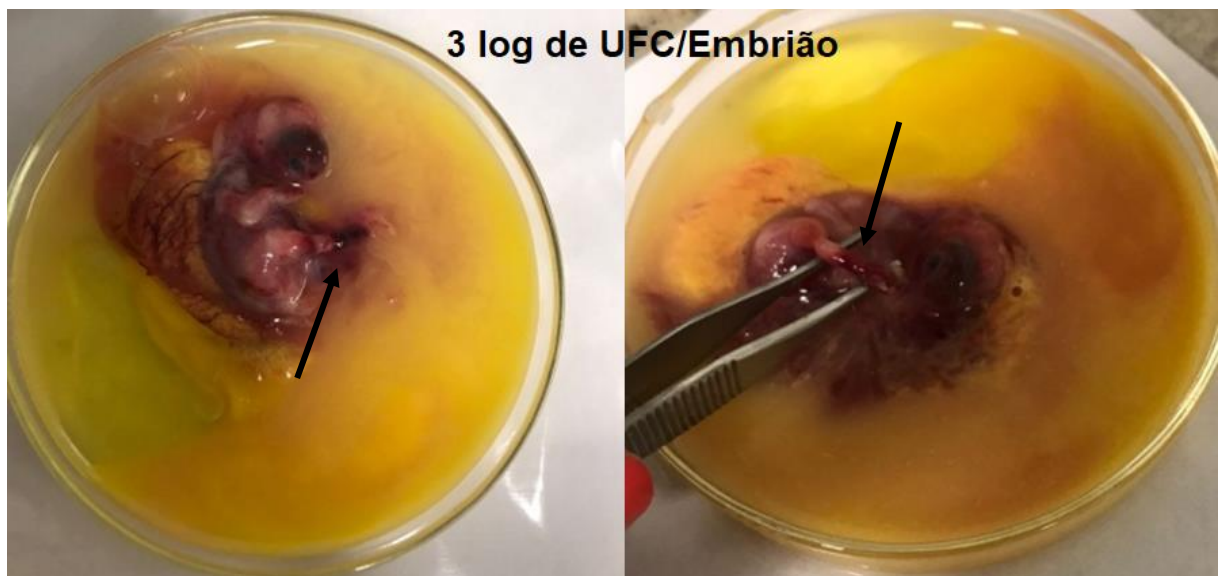


Figura 5 - Lesões em membros pélvicos (seta) de embriões inoculados com 3 log de UFC com a cepa de *Erysipelothrix* sp. strain 2 (cepa 7)

6. DISCUSSÃO

Estudos com a *Erysipelothrix sp. strain 2* são recentes. A bactéria ainda não foi muito estudada, sendo assim, a comparação se deu com trabalhos que também utilizavam o modelo de ovos embrionados para a avaliação de outras bactérias e sua patogenicidade, quando inoculadas com diferentes concentrações.

Em estudo realizado por Trotereau e Schoule (2019) com *Escherichia Coli*, também foi utilizado o modelo de inoculação em ovos embrionados de galinha. A inoculação foi realizada no 10º dia de desenvolvimento embrionário, e tinha como finalidade verificar a letalidade e a mortalidade provocada pela bactéria quando associada a terapia. No estudo realizado com *Escherichia Coli*, houve diferentes taxas letalidade e mortalidade, quando inoculadas com diferentes cepas e diferentes concentrações do inóculo, mostrando que o embrião de galinha pode ser útil para selecionar cepas patogênicas. No presente trabalho, a mortalidade causada pelas cepas 6 e 7 da *Erysipelothrix sp. strain 2* tiveram taxas de mortalidade semelhantes mostrando que a patogenicidade das cepas são similares.

A morte dos embriões inoculados com 1log UFC foi baixa e embora tenha ocorrido não houve alteração no peso. Nos embriões inoculados com a dose de 3log UFC houve uma alta mortalidade. Interessantemente trabalhos realizados por Graziotin (2021) mostram que ambas as cepas eram patogênicas, mas que a cepa 6 é mais patogênica que a cepa 7 em cultivo de célula e pela análise do genoma. No presente trabalho, em embriões, não foi possível comparar o grau de patogenicidade das cepas, mas percebe-se que ambas provocaram lesões e morte em embriões em doses baixas. O embrião de galinha é um excelente modelo *in vivo* (FONSECA et al. 2021) podendo ser usado em testes pré-clínicos para seleção e caracterização de cepas patogênicas.

As cepas 6 e 7 podem ser usadas em testes com animais nascidos a fim de se entender melhor a patogenicidade da doença.

7. CONCLUSÃO

A inoculação de *Erysipelothrix* sp. *Strain2* cepa 6 e 7 em ovos embrionados, se mostrou prejudicial ao embrião causando mortalidade dose dependente, a cepa 7 causou lesões em membros pélvicos em embriões que apresentaram mortalidade 7 pós inoculação. As cepas 6 e 7 podem ser usadas em testes com animais nascidos a fim de se entender melhor a patogenicidade da doença.

REFERÊNCIAS

- BANG, B. H.; RHEE, M. S.; CHANG, D. H.; PARK, D. S.; KIM, B. C. Erratum to: *Erysipelothrix larvae* sp. nov., isolated from the larval gut of the rhinoceros beetle, *Trypoxylus dichotomus* (Coleoptera). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.109, n.1, p.167-168, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0623-z>
- BARCELLOS, D.E.S.; OLIVEIRA, S. J.; BOROWSKI, S. M. Classificacao sorologica de amostras de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, isoladas de suinos, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. microbiol.**, p. 45-7, 1984.
- BENDER, J.S.; IRWIN, C.K.; SHEN, H.G.; SCHWARTZ, K. J.; OPRIESSNIG, T. *Erysipelothrix* spp. genotypes, serotypes, and surface protective antigen types associated with abattoir condemnations. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 1, p. 139-142, 2011. <https://doi.org/10.1177/104063871102300126>
- BENDER, J. S.; SHEN, H. G.; IRWIN, C.K.; SCHWARTZ, K. J.; OPRIESSNIG, T. Characterization of *Erysipelothrix* Species Isolates from Clinically Affected Pigs, Environmental Samples and Vaccine Strains from Six Recent Swine Erysipelas Outbreaks in the United States. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.10, p.1605-1611, 2010. <https://doi.org/10.1128/CVI.00206-10>
- BISGAARD, M.; OLSEN, P. Erysipelas in egg-laying chickens: Clinical, pathological and bacteriological investigations. **Avian Pathology**, v. 4, n. 1, p. 59-71, 1975. <https://doi.org/10.1080/03079457509353851>
- BLANCO, A.E., BARZ, M.; CAVERO, D.; ICKEN, W.; SHARIFI, A.R.; VOSS, m; PREISINGER, R. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates by chicken embryo lethality assay and ERIC-PCR. **Avian Pathology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 2018. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1359404>
- BOERNER, L.; NEVIS, K.R.; HINCKLEY, L.S.; WEBER, E.S.; FRASCA JR, S.; *Erysipelothrix* septicemia in a little blue penguin (*Eudyptula minor*). **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 16, n. 2, p. 145-149, 2004. <https://doi.org/10.1177/104063870401600209>
- BRICKER, J. M.; SAIF, M. Y. Erysipelas, in: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, L. D.; NAIR, V. (eds.), **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State University Press, p.812-826, 2013.
- BROOKE, J. C.; RILEY, T. V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. **J. Med. Microbiol.**, v.48, n.20, p.789-799, 1999. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-9-789>
- CASTRO, A. F. P.; TRABULSI, L.R.; CAMPEDELLI, F.O.; TROISE, C. Characteristics of strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated in Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 3, p. 11-24, 1972.

CHIRICO, J.; ERIKSSON, H.; FOSSUM, O.; JANSSON, D.. The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. **Medical And Veterinary Entomology**, v.17, n.2, p.232-234, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00428.x>

COUTINHO, T.A. **Caracterização de amostras de *Erysipelothrix* spp. isoladas de suínos nos últimos 30 anos**. 2010. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. <https://doi.org/10.11606/T.10.2010.tde-24032011-152836>

DÍAZ-DELGADO, J.; ARBELO, M.; SIERRA, E.; VELA, A.; DOMÍNGUEZ, M.; PAZ, Y.; FERNÁNDEZ, A. Fatal *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in two Atlantic dolphins (*Stenella frontalis* and *Tursiops truncatus*). **Diseases Of Aquatic Organisms**, v. 116, n. 1, p.75-81, 17 set. 2015. <https://doi.org/10.3354/dao02900>

ERIKSEN, K.; WINTERFIELD, R.W.; THACKER, H.L.; RICHARDSON, J.A. Endocarditis in two dogs caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Small Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 117-123, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1987.tb05976.x>

FONSECA, B.B.; DA SILVA, M.V.; DE MORAIS RIBEIRO, L.N. The chicken embryo as an in vivo experimental model for drug testing: Advantages and limitations. **Lab animal**, v. 50, n. 6, p. 138-139, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41684-021-00774-3>

GRAZZIOTIN, A .L .; VIDAL, N.M.; HOEPERS, P.G.; REIS, T.F.; MESA, D.; CARON, L.F.; FONSECA, B.B. Comparative genomics of a novel clade shed light on the evolution of the genus *Erysipelothrix* and characterise an emerging species. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88892-3>

GYLES, C. L.; THOEN, C.O. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd ed., CL Gyles and C. O. Thoen(eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa**, p. 80-85, 1993.

HENNIG, G. E.; GOEBEL, H.D.; FABIS, J.J.; KHAN, M.I. Diagnosis by Polymerase Chain Reaction of Erysipelas Septicemia in a Flock of Ring-Necked Pheasants. **Avian Diseases**, v. 46, n. 2, p.509-514, abr. 2002. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0509:DBPCRO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0509:DBPCRO]2.0.CO;2)

HOEPERS, P. G.; REIS, T. F. M.; MENDONÇA, E.P.; ROSSI, D. A.; KOERICH, P.K.; FRANÇA, T.V.J.; ZUFFO, J.P.; V. JUNIOR, E.C.; FONSECA, B.B. First outbreak reported caused by *Erysipelothrix* species strain 2 in turkeys from poultry-producing farms in Brazil. **Annals Of Microbiology**, v.69, n.11, p.1211-1215, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01505-3>

IMADA, Y.; MORI, Y.; DAIZOH, M.; KUDOH, M.; SAKANO, T. Enzyme-linked immunosorbent assay employing a recombinant antigen for detection of protective antibody against swine erysipelas. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5015-5021, 2003. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5015-5021.2003>

- JACOBSEN, I.D.; GROSSE, K.; HUBE, B. Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. **Methods in Molecular Biology**, v. 845, p.487-496, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_34
- KANG, C.; ZHANG, Q.; ZHU, W.; CAI, C.; SUN, X.; JIN, M. Transcription analysis of the responses of porcine heart to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Plos One**, v. 12, n. 10, p.1-13, out. 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_34
- KWOK, A. H.; LI, Y.; JIANG, J.; JIANG, P.; LEUNG, F.C.; Complete genome assembly and characterization of an outbreak strain of the causative agent of swine erysipelas – *Erysipelothrix rhusiopathiae* SY1027. **Bmc Microbiology**, v. 14, n. 1, p.176-200, jul 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-176>
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. Revised road map to the phylum Firmicutes. In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Springer, New York, NY, p. 1-13, 2009. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_1
- MAKINO, S. I.; OKADA, Y.; MARUYAMA, T.; ISHIKAWA, K.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, M.; MORITA, H. (1994). Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 32(6), p 1526-1531, 1994. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.6.1526-1531.1994>
- MUTALIB, A.; KEIRS, R.; AUSTIN, F. Erysipelas in Quail and Suspected Erysipeloid in Processing Plant Employees. **Avian Diseases**, v. 39, n. 1, p.191-193, jan. 1995. <https://doi.org/10.2307/1592002>
- MUTALIB, A. A.; KING, J. M.; MCDONOUGH, P. L. Erysipelas in Caged Laying Chickens and Suspected Erysipeloid in Animal Caretakers. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 2, p.198-201, abr. 1993. <https://doi.org/10.1177/104063879300500210>
- NAKAZAWA, H.; HAYASHIDANI, H.; HIGASHI, J.; KANEKO, K. I.; TAKAHASHI, T.; OGAWA, M.; Occurrence of *Erysipelothrix* spp. in chicken meat parts from a processing plant. **Journal Food Protection**, v. 61, n. 9, p.1207-1209, jul. 1998. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.9.1207>
- OLIVEIRA S.J. Microbiologia Veterinária. Guia Bacteriológico Prático. 2.ed. Canoas: Editora da ULBRA, 237p. 2000.
- OLIVEIRA, S.J. Erisipela suína: sempre importante à suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. s97-s104, 2009.
- OPRIESSNIG, T.; HOFFMAN, L.J.; HARRIS, D.L.; GAUL, S.B.; HALBUR, P.G. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 16, n. 2, p. 101-107, 2004. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00174>

OPRIESSNIG, T.; FORDE, T.; SHIMOJI, Y. Erysipelothrix Spp.: past, present, and future directions in vaccine research. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 174, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00174>

OVERSTREET, R.M. Solving parasite-related problems in cultured crustacea. **International journal for parasitology**, v. 17, n. 2, p. 309-318, 1987. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(87\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(87)90105-6)

PAL, N.; BENDER, J.S.; OPRIESSNIG, T. Rapid detection and differentiation of *Erysipelothrix* spp. by a novel multiplex real-time PCR assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p.1083-1093, mar. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04560.x>

POMARANSKI, E.K.; REICHLEY, S R.; YANONG, R.; SHELLEY, J.; POWDER, D.B.; WOLF, J.C.; SOTO, E. Characterization of spaC-type *Erysipelothrix* sp. isolates causing systemic disease in ornamental fish. **Journal of fish diseases**, v. 41, n. 1, p. 49-60, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfd.12673>

REBOLI, A. C.; FARRAR, W.E. The genus *Erysipelothrix*. **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications**, p. 1629-1642, 1992.

REBOLI, A.C.; EDMUND, F. W. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an occupational pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v.2, n.1, p.354-359, 1989. <https://doi.org/10.1128/iai.62.7.2806-2810.1994>

ROCHA, V., Ovos galados- uma alternative viável para o pequeno avicultor [entrevista disponibilizada em 12 de setembro de 2014, a Internet]. Disponível em: <http://www.criargalinha.com.br/genetica/ovos-galados/>. Acesso em 12 de março de 2022

SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y.; SEKIZAKI, T.; MORI, Y.; KUBO, M. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. **Infection and immunity**, v. 62, n. 7, p. 2806-2810, 1994. <https://doi.org/10.1128/iai.62.7.2806-2810.1994>

SHIMOJI, Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 965-972, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00397-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00397-X)

STENSTRÖM, I.M.; NØRRUNG, V.; TERNSTRÖM, A.; MOLIN, G. Occurrence of different serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in retail pork and fish. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 33, n. 2, p. 169-173, 1992. <https://doi.org/10.1186/BF03547323>

TAKAHASHI T.; TAKAGI M.; YAMAOKA R.; OHISHI K.; NORIMATSU M.; TAMURA Y.; NAKAMURA M. Comparison of the pathogenicity for chickens of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *E. tonsillarum*. **Avian Pathology**. 23: 237-245, 1994. <https://doi.org/10.1080/03079459408418992>

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

<https://doi.org/10.1128/jcm.25.3.536-539.1987>

TAKAHASHI, T. FUJISAWA, T.; YAMAMOTO, K.; KIJIMA, M.; TAKAHASHI, I. Taxonomic evidence that serovar 7 of *Erysipelothrix* strains isolated from dogs with endocarditis are *Erysipelothrix tonsillarum*. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 47, n. 4, p. 311-313, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00344.x>

TAKESHI, K.; MAKINO, S.; IKEDA, T.; TAKADA, N.; NAKASHIRO, A.; NAKANISHI, K.; OGUMA, K.; KATOH, Y.; SUNAGAWA, H.; OHYAMA, T. Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. **J Clin Microbiol.**, v.37, n.12, p.4093-4098, 1999.

<https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.4093-4098.1999>

TROTTEREAU, A.; SCHOULER, C. e. Use of a chicken embryo lethality assay to assess the efficacy of phage therapy. In: **Bacteriophages**. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 199-205. 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8940-9_17

VERBARG, S.; RHEIMS, H.; EMUS, S.; FRÜHLING, A.; KROPPESTEDT, R. M.; STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth, and description of *Erysipelotrichaceae* fam. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 1, p. 221-225, 2004.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02898-0>

VERBARG, S. S.; GÖKER, M.; SCHEUNER, C.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E. The families *Erysipelotrichaceae* emend., *Coprobacillaceae* fam. nov., and *Turicibacteraceae* fam. nov. **The Prokaryotes. Fourth edition**. Berlin: Springer, 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9_205