



Isolamento do *Mycoplasma hyosynoviae* de articulações de suínos com artrite no abatedouro*

Isolation of *Mycoplasma hyosynoviae* from porcine joints with arthritis at the abattoir

Geraldo Camilo Alberton^{1,2}, Itamar Antônio Piffer³, Marni Lúcia Fracasso Ramenzoni⁴,
Enio Pedone Bandarra¹, José Luís Athaide Costa⁵ & Renato Silva de Sousa²

RESUMO

O *Mycoplasma hyosynoviae* é um dos agentes causadores de artrite em suínos em fase de recria e terminação. Esta infecção provoca atraso no crescimento, gastos com tratamento e condenações de carcaças. O presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de isolamento e identificação do *M. hyosynoviae* e investigar a presença deste agente na articulação de suínos artríticos no matadouro. Procedeu-se o exame microbiológico das articulações de 50 carcaças de suínos recentemente abatidos e julgados artríticos pelo Serviço de Inspeção Federal. Utilizaram-se técnicas de isolamento adequadas para o crescimento dos principais agentes artritogênicos dos suínos com especial atenção ao isolamento do *M. hyosynoviae*. Dos 50, 40 (80%) eram assépticas, de sete (14%) foi isolado o *Erysipelothrix rhusiopathiae* e de três (6%), o *M. hyosynoviae*, sendo este último isolado pela primeira vez no Brasil. O *M. hyosynoviae* apresentou crescimento rápido nos meios de cultivos líquidos e sólidos. O crescimento deste agente foi evidenciado pela alcalinização do meio, com conseqüente alteração da cor original salmão para cor vinho. Dos três isolamentos de campo, em dois foi observado o crescimento nos tubos 24 horas após e em um, cinco dias após a semeadura. Conclui-se que o *M. hyosynoviae* cresce abundantemente e com rapidez nos meios líquidos e sólidos enriquecidos com arginina e mucina.

Descritores: suínos, artrite, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

ABSTRACT

The *Mycoplasma hyosynoviae* is one of the arthritis agents in growing-finishing pigs. This infection causes growth delay, treatment expenses and condemned carcasses. The present study aimed to establish a standard technique for isolation and identification of *M. hyosynoviae* and to investigate the presence of this agent in porcine arthritic joints at the abattoir. Arthritic joints obtained from 50 freshly slaughtered pig carcasses, condemned for arthritis by the Federal Inspection Service, were microbiologically analyzed. Isolation techniques were developed for the main arthritic agents growth, with special attention to *M. hyosynoviae* isolation. From the 50 animals, 40 (80%) were deemed aseptic; *Erysipelothrix rhusiopathiae* was isolated from seven animals (14%) and three pigs (6%) showed *M. hyosynoviae*, which was the first isolation in Brazil. The *M. hyosynoviae* presented fast growth in both liquid and solid culture media. The growth of *M. hyosynoviae* was evidenced by the media alkalization, which turned the media from the original salmon to red wine color. From the three field isolates two presented tube growth at 24 hours and one at five days. In conclusion, *M. hyosynoviae* growth was abundant and fast in liquid and solid media enriched with arginine and mucine.

Key words: swine, arthritis, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma hyosynoviae* é um dos agentes causadores de artrite em suínos na recria e terminação sendo que esta afecção pode persistir até o momento do abate [12,13], gerando condenações e aproveitamento condicional das carcaças. As tonsilas dos animais infectados são o principal reservatório do *M. hyosynoviae* [6] podendo os suínos ser portadores deste agente em suas tonsilas sem manifestarem artrite e sem desenvolverem anticorpos [8].

M. hyosynoviae normalmente é isolado com baixa frequência dos casos de artrite durante o abate [3,10] e, em muitos casos, ele não tem sido isolado de nenhuma das articulações estudadas [15]. Entretanto, alguns autores obtiveram isolamentos positivos deste agente em 20% dos 50 casos de artrite identificados no abate [7]. O isolamento do *M. hyosynoviae* a partir do líquido sinovial é mais eficiente nos estágios iniciais da doença [11], sendo que o agente desaparece das articulações afetadas após um período de três semanas [14].

No Brasil não existe nenhum relato do isolamento do *M. hyosynoviae* e tampouco relatos de tentativas de isolamento deste agente. O presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de isolamento e identificação do *M. hyosynoviae* e investigar a presença deste agente na articulação de suínos artríticos no matadouro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local e animais

As amostras foram colhidas no Serviço de Inspeção Federal no.1 - Matadouro – Frigorífico localizado no município de Concórdia – SC, Brasil. Foram amostrados 50 suínos com peso de 60 a 120 quilogramas, sem distinção de raça, idade ou sexo; abatidos por meio de eletrocussão e posterior sangria.

Os animais foram escolhidos de forma direcionada, entre aqueles desviados para o Departamento de Inspeção Final (DIF) e que apresentavam artrite com característica infecciosa, ou seja, linfonodo regional reativo e moderada a acentuada hipertrofia da membrana sinovial. A pele e os músculos dos membros afetados foram retirados e o local de introdução da agulha foi desinfetado com o contato com espátula previamente aquecida em bico

de Bunsen. Com auxílio de uma seringa adaptada a uma agulha calibre 40X16, o líquido sinovial foi aspirado. Posteriormente, a articulação e regiões adjacentes foram embebidas em álcool 70% e flambadas no bico de Bunsen. Em seguida, a articulação foi incisada com uma faca e, com pinça e tesoura, realizou-se a colheita da membrana sinovial, que foi colocada em placa de Petri estéril.

Os exames microbiológicos foram realizados no Laboratório Central da Sadia S.A. e no Laboratório de Sanidade do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves - Embrapa, ambos localizados em Concórdia - SC.

Meio de cultivo para *Mycoplasma hyosynoviae*

Utilizou-se o meio de cultivo Friis para *Mycoplasma hyosynoviae* descrito por Friis em 1974 [5] e adaptado pelos autores. O meio líquido tinha a seguinte composição e método de preparo: água ultrapura, 237,5 ml; Bacto PPLO broth sem cristal violeta, cinco gramas. Esta mistura foi autoclavada a uma atmosfera por cinco minutos. Após esfriar adicionou-se: extrato de levedura, 12,5mL; solução de vermelho de fenol (0,5%), 0,9 mL; penicilina G, 75.000 UI; acetato de tálio (5,6%), 0,6mL; soro de peru inativado, 64,4 mL; solução de arginina e mucina, 8,06 mL. Depois de misturado, o pH da solução foi ajustado para 7,3 e procedeu-se a filtração em membrana esterilizante e em seguida o teste de esterilidade. A solução de arginina e mucina tinha a seguinte composição: arginina, 4,0 g; mucina bacteriológica, 0,4 g; água ultrapura, 50 mL.

O meio sólido de Friis tinha a seguinte composição e método de preparo: Oxoid agar, 3,2 g; Deae dextran, 0,04 g; água ultrapura, 200 mL. A mistura foi aquecida para dissolver o Agar e autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Ao atingir 60° C adicionou-se à mistura parte igual de meio de Friis duas vezes concentrado a 37° C. Em seguida, distribui-se o meio nas placas.

Controle de qualidade do meio de cultivo para *Mycoplasma hyosynoviae*

Para comprovar a eficiência do meio de Friis para promover o crescimento do *M. hyosynoviae*, este foi testado com a amostra padrão do *M. hyosynoviae* (ATCC – 27720). A amostra liofilizada foi ressuspensa em tubo de ensaio de 10 X 100 mm, contendo 1,8 mL de meio Friis para *M. hyosynoviae* e vedado com

rolha de borracha, que foi incubado a 37 °C. Decorridas 72 horas o tubo original foi repicado para outros tubos e para placas com meio Friis Agar para visualização das colônias.

Produção de anti-soro contra *Mycoplasma hyosynoviae*

Após a adaptação da amostra padrão do *M. hyosynoviae* ao meio de cultivo por meio de sucessivas passagens em tubos, iniciou-se os trabalhos de produção de antígeno para inoculação em coelhos para produção de soro hiperimune. Para a produção do inóculo, os tubos com meio de cultivo com crescimento foram repicados para frascos com 50 mL de meio e destes, após o crescimento, para garrafas com 350 mL de meio. Confirmado o crescimento do *M. hyosynoviae* nas garrafas, o meio foi centrifugado a 14.000 rotações por minutos durante 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em solução de Hanks e centrifugado novamente na mesma velocidade e tempo. Repetiu-se essa operação duas vezes e o precipitado obtido foi ressuspense em solução de Hanks com formalina (0,15%).

Foram utilizados dez coelhos adultos que receberam nove aplicações do inóculo que consistia de 0,75 ml de antígeno mais 0,75 ml de adjuvante completo de Freund. Os coelhos receberam 1,5 mL do inóculo via intramuscular no 1°, 3°, 6°, 9°, 12°, 33° e 35° dia. No 42° dia foi realizada a sangria de prova, ou seja, retirou-se 2 ml de sangue de cada coelho para determinar se a quantidade de anticorpos tinha alcançado um nível adequado para ser utilizado no teste de inibição de crescimento. Os coelhos cujos soros apresentaram um halo de inibição inferior a 1,5 mm, receberam no 48° dia, uma aplicação de reforço de 1 mL do inóculo via intravenosa. No 56° dia realizou-se a sangria total dos coelhos. O soro de cada coelho foi testado e estocado separadamente. A especificidade dos soros foi determinada pela não inibição do crescimento das amostras padrões do *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*.

Teste de inibição de crescimento

Este teste foi realizado em duas situações. Na primeira, o mesmo foi utilizado para testar a eficiência do soro hiperimune dos coelhos em inibir o crescimento da amostra padrão do *M. hyosynoviae* em placas de cultivo e, na segunda, para testar as amostras com

características de *M. hyosynoviae* obtidas dos isolamentos das articulações com artrite no matadouro.

Os soros dos coelhos foram testados em duas oportunidades, na sangria de prova e na sangria total, de acordo com a seguinte metodologia: as placas com meio Friis para *M. hyosynoviae* foram colocadas em câmara de fluxo laminar com a tampa um pouco aberta por 30 minutos para a secagem completa da superfície do meio. Em uma placa de Petri estéril foram dispostos discos de filtro estéril com seis milímetros de diâmetro umedecidos com 25 microlitros do soro a ser testado. De um tubo com cultura viável da amostra padrão do *M. hyosynoviae* em diluição de 10^{-3} , foi retirado 0,1 mL de meio e espalhado com alça de Drigalski sobre o meio de cultivo. As placas foram deixadas em temperatura ambiente até que o inóculo fosse completamente absorvido pelo meio. Quando a superfície do meio encontrava-se seca, foram dispostos sobre o mesmo, os discos embebidos com o soro dos coelhos a serem testados.

As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose por até sete dias. A leitura foi realizada medindo-se a zona de inibição ao redor do disco. Considerava-se positiva a inibição do crescimento, quando o halo de inibição possuía um raio maior que 1,5 centímetro. Esta mesma técnica foi utilizada para testar as amostras de *M. hyosynoviae* obtidas dos isolamentos de campo, substituindo a semeadura da amostra padrão, pela semeadura da amostra a ser testada.

Cultivo das amostras de campo

O líquido e a membrana sinovial foram utilizados para o exame bacteriológico, sendo processados separadamente e semeados em tubos e placas distintos. Os fragmentos de membrana sinovial foram triturados em gral com areia e solução salina estéril. As suspensões resultantes e o líquido sinovial foram cultivados de acordo com a seguinte técnica: 0,2 mL do triturado e 0,2 mL do líquido sinovial foram inoculados em 1,8 mL de caldo Friis para *M. hyosynoviae*, disposto em tubos de ensaio de 10 X 100 mm vedados com rolhas de borrachas. Os tubos foram incubados por até sete dias, fazendo-se a repicagem dos tubos que apresentavam indícios de crescimento para placas de meio Friis Agar para *M. hyosynoviae*. Confirmado o crescimento das colônias em placa, foi realizado o teste de inibição de crescimento de acordo com a técnica descrita anteriormente.

Cultivo de outras bactérias

Realizou-se também o exame bacteriológico visando o isolamento de outras bactérias causadoras de artrite. Os fragmentos de membrana sinovial foram triturados em gral com areia e solução salina estéril. O líquido sinovial e a suspensão do triturado de membrana sinovial foram cultivados de acordo com os seguintes métodos bacteriológicos:

- Cultura direta em meio Agar sangue: O triturado descrito e o líquido sinovial foram estriados em placas de Agar sangue com estrias de *Staphylococcus aureus* NAD positivo. As placas foram incubadas à 37 °C, em microaerofilia, por até seis dias.

- Enriquecimento em meio Erysipelothrix Selective Broth (ESB): 0,5 ml do triturado descrito e 0,5 mL do líquido sinovial foram inoculados em 5 mL do meio ESB. Os tubos foram incubados à 37 °C por até 48 horas fazendo a repicagem dos tubos com turvação para placas de Agar sangue, que foram incubadas por até seis dias à 37 °C em microaerofilia.

As placas e tubos foram inspecionados diariamente. Nos casos de crescimento de colônias no Agar sangue, foi realizado um esfregaço para coloração de Gram. A identificação dos microrganismos foi realizada segundo as características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas.

RESULTADOS

Dos 50 casos de artrite o *Mycoplasma hyosynoviae* foi isolado das articulações de três suínos e o *Erysipelothrix rhusiopathiae* de sete animais. Dos outros 40 casos não foi isolado nenhum agente infeccioso. As artrites provocadas pela *E. rhusiopathiae* diferenciaram-se daquelas provocadas pelo *M. hyosynoviae* principalmente pelo grau de hipertrofia da membrana sinovial que no primeiro é acentuado e no segundo é moderado. Além disso, nos casos de *E. rhusiopathiae* o linfonodo regional apresentava-se mais aumentado de volume e freqüentemente com cistos. Em ambos os casos observaram-se erosões na cartilagem articular, contudo, este tipo de lesão foi mais freqüente nos casos de *E. rhusiopathiae*.

Os três isolamentos do *M. hyosynoviae* foram obtidos somente da membrana sinovial. O *M. hyosynoviae* apresentou crescimento rápido nos meios

de cultivos líquidos e sólidos. Dos três isolamentos de campo, em dois foi observado o crescimento nos tubos 24 horas após a sementeira e em um, cinco dias após a sementeira. O crescimento deste agente foi evidenciado pela alcalinização do meio, com conseqüente alteração da cor original salmão para cor vinho. Além da mudança de cor, o meio apresentou turvação homogênea e a formação de uma película semelhante a gordura sobre a superfície do tubo.

No meio sólido, observou-se a formação de colônias após dois dias de incubação. Estas apresentavam formato de ovo frito, e medi-

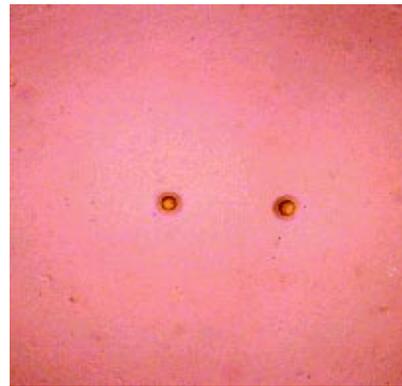


Figura 1. Colônias de *Mycoplasma hyosynoviae* após cinco dias de incubação. M.O. 40X.

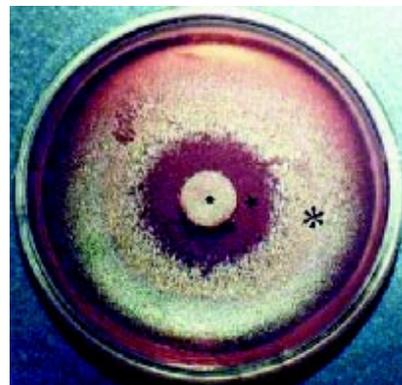


Figura 2. Teste de inibição de crescimento do *Mycoplasma hyosynoviae* em placa após sete dias de incubação. Notar o disco embebido com o soro anti-*M. hyosynoviae* (*), a região em torno do disco onde o crescimento foi inibido (★) e a região com crescimento recoberta com uma película de aspecto perleto (*).

am de 0,5 a 1,0mm (Figura 1). A partir do terceiro dia de incubação as colônias iniciavam a formação de uma estrutura semelhante a cristais em torno das mesmas. Com o passar do tempo, estas estruturas cobriam toda a superfície do meio formando uma película de aspecto perleto. Nas amostras de campo o crescimento inicial do *M. hyosynoviae* foi rápido, contudo nas sub-culturas ele tornou-se lento e somente a partir da quarta ou quinta passagem ele passou a acontecer com 24 a 48 horas. Os três isolamentos de *M. hyosynoviae* foram submetidos ao teste de inibição de crescimento em placa, tendo sido obtida a inibição do crescimento em todos os casos (Figura 2).

DISCUSSÃO

Os dois agentes isolados são reconhecidos como os principais causadores de artrite em suínos em idade de abate [1,2,7,10]. As artrites infecciosas sem isolamento podem ter sido causadas por diferentes agentes infecciosos dentre aqueles reconhecidos como causadores de artrite nos suínos. Contudo, as características macroscópicas dessas articulações permitem estabelecer estimativas sobre os agentes causadores dessas artrites. Assim, entre os 40 suínos com artrite infecciosa sem isolamento, 72% deles apresentaram lesões articulares semelhantes àquelas observadas nos casos de artrite causadas pelo *E. rhusiopathiae*, ou seja, acentuada hipertrofia da membrana sinovial, geralmente com as vilosidades dilatadas, freqüentemente acompanhada de erosão de cartilagem e formação de *pannus*, linfonodos com aumento considerável de volume e algumas vezes com presença de cistos.

As lesões observadas nas estruturas articulares e nos linfonodos estão de acordo com o descrito na literatura, excetuando a observação de erosão de cartilagem articular em um caso de artrite por *M. hyosynoviae* [3,10]. As lesões observadas nas articulações afetadas pelo *E. rhusiopathiae* concordam com o descrito em trabalhos de indução experimental

da artrite crônica [4,9] e com observações de abatedouro [10].

Todas as características culturais apresentadas pelo *M. hyosynoviae* estão de acordo com o descrito na literatura [5,6]. A baixa freqüência de isolamento deste agente provavelmente deve-se a fato de que o *M. hyosynoviae* desaparece das articulações afetadas após um período de três semanas [14]. Comprovando estas afirmações, Friis *et al.* [7] realizaram um estudo comparando a eficiência do isolamento com a pesquisa de anticorpos por métodos imunoenzimáticos. Na técnica do isolamento 20% das amostras resultaram positivas para o *M. hyosynoviae*, enquanto que pela pesquisa de anticorpos este percentual foi de 35%, sugerindo os autores que nos casos crônicos a presença de anticorpos nas articulações seja mais freqüente que a do agente.

CONCLUSÕES

O *Mycoplasma hyosynoviae* cresce abundantemente e com rapidez nos meios líquidos e sólidos enriquecidos com arginina e mucina;

Os principais agentes causadores de artrite infecciosa em suínos com idade de abate são, em ordem de incidência, o *Erysipelothrix rhusiopathiae* e o *Mycoplasma hyosynoviae*.

REFERÊNCIAS

- 1 **Alberton G.C., Pereira M.A., Yamamoto M.T., Bandarra E.P. & Salvo L.S. 2000.** Osteocondrose – Principal causa de artrite em suínos de abatedouro no Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. 3: 55-60.
- 2 **Alberton G.C., Bandarra E.P., Piffer I., Mores M.A.Z., Pereira M.A.C. & Yamamoto M.T. 2003.** Exame anatomopatológico, microbiológico, citológico e físico-químico das articulações de suínos atríticos no matadouro. *Archives of Veterinary Science*. 8: 81-91.
- 3 **Buttenschon J., Svensmark B. & Kyrval J. 1995.** Non purulent arthritis in Danish slaughter pigs: A study of field cases. *Journal of Veterinary Medicine*. 42: 633-641.
- 4 **Eamens G.J. & Nicholls P.J. 1989.** Comparison of inoculation regimes for the experimental production of swine erysipelas arthritis. I Clinical, pathological and bacteriological findings. *Australian Veterinary Journal*. 66: 212-216.
- 5 **Friis N.F. 1974.** Mycoplasmas in pigs, with special regard to the respiratory tract. 162 p. Copenhagen, Denmark. Thesis - DSR Forlag.
- 6 **Friis N.F., Ahrens P. & Larsen H. 1991.** *Mycoplasma hyosynoviae* isolation from the upper respiratory tract and tonsils of pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 32: 425-429.
- 7 **Friis N.F., Hansen K.K., Schirmer A. L. & Aabo S. 1992.** *Mycoplasma hyosynoviae* in joints with arthritis in abattoir baconers. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 33: 205-210.
- 8 **Hagedorn O.T., Nielsen N.C., Friis N.F. & Nielsen J. 1999.** Progression of *Mycoplasma hyosynoviae* infection in three pig herds. Development of tonsillar carrier state, arthritis and antibodies in serum and synovial fluid in pigs from birth to slaughter. *Journal of Veterinary Medicine*. 46: 555-564.

- 9 **Hughes D.L. 1955.** Arthritis in pigs. The experimental disease induced by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *British Veterinary Journal*. 111: 183-194.
- 10 **Johnston K.M., Doige C.E. & Osborne A.D. 1987.** An evaluation of nonsuppurative joint disease in slaughter pigs. *Canadian Veterinary Journal*. 28: 174-180.
- 11 **Nielsen E.O., Nielsen N.C. & Friis N.F. 2001.** *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in grower-finisher pigs. *Journal of Veterinary Medicine*. 48: 475-486.
- 12 **Ross R.F. 1999.** Mycoplasmal diseases. In: Straw B. E., D'Allaire S., Mengeling W.L. & Taylor D.J. (Eds). *Diseases of swine*. 8th edn. Ames: Iowa State University Press, pp.495-510.
- 13 **Ross R.F. & Duncan J.R. 1970.** *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis of swine. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 157: 1515-1518.
- 14 **Ross R.F., Switzer W.P. & Duncan J.R. 1971.** Experimental production of *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in swine. *American Journal of Veterinary Research*. 32: 1743-1749.
- 15 **Turner G.V.S. 1982.** A microbiological study of polyarthritis in slaughter pigs. *Journal of South African Veterinary Association*. 53: 99-101