

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO NA
SOBREVIVÊNCIA DE *Staphylococcus hyicus*”**

KARINE LUDWIG TAKEUTI

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO NA
SOBREVIVÊNCIA DE *Staphylococcus hyicus*”

Autor: Karine Ludwig Takeuti

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Sanidade Suína

Orientador: Prof. David Emilio S. N. de Barcellos

PORTO ALEGRE

2014

Karine Ludwig Takeuti

“EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO NA
SOBREVIVÊNCIA DE *Staphylococcus hyicus*”

Aprovado em 27 de fevereiro de 2014.

APROVADO POR:

Dr. David Emilio S. N. de Barcellos
Orientador e Presidente da Comissão

Dra. Jalusa Deon Kich
Membro da Comissão

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Membro da Comissão

Dr. Sérgio José de Oliveira
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nelcy e Roberto, por terem me apoiado e incentivado em minhas escolhas profissionais. Especialmente minha mãe, pela confiança e carinho.

Ao meu namorado Rafael, um exemplo de pessoa e de profissional, obrigada por sua generosidade, companheirismo em todos os momentos, pelo apoio e interesse constante no meu desenvolvimento profissional.

Aos queridos Débora, Gabriel, Gabi e Tiago, pelo apoio e carinho.

Aos colegas e amigos da pós-graduação e graduação do Setor de Suínos. Aprendi com cada um e meu crescimento profissional não seria o mesmo se não tivesse convivido com todos. Agradeço em especial àqueles que tornaram meus dias mais felizes e são muito queridos por mim: Maria Clara, Sato, Thais, Natalha, João, Cristina, Carol M., Luiza, Carine, Júlia e Carol R. Os momentos que passamos juntos serão sempre lembrados com muito carinho.

Agradeço ao Henrique pela ajuda durante a execução do meu experimento, além da disponibilidade e compromisso em me auxiliar sempre que necessário. À Janaína também, muito obrigada.

Ao meu orientador Prof. Dr. David Barcellos, pelos ensinamentos, tanto profissionais quanto pessoais, pela amizade, confiança no meu trabalho e incentivo para continuar na área acadêmica.

Aos professores Dr. Fernando Bortolozzo e Dr. Ivo Wentz, pelos conselhos e experiência compartilhada.

À Prof. Dra. Mari Bernardi, pela disponibilidade e auxílio nas análises estatísticas e por compartilhar seus conhecimentos.

Aos membros do PPGCV da UFRGS.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e científico.

RESUMO

Efeito de diferentes condições de conservação na sobrevivência de *Staphylococcus hyicus*

Autor: Karine Ludwig Takeuti

Orientador: Prof. David Emilio S. N. de Barcellos

Quatro tipos de meios de transporte comerciais (Amies, Amies com carvão, Cary Blair e Stuart) e suabes sem meio foram avaliados quanto à capacidade de conservar *S. hyicus* por 10 dias de armazenamento sob duas temperaturas (ambiente [20-25°C] e refrigerada [4-8°C]). Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem o efeito da temperatura e de meios de transporte na sobrevivência desta bactéria. Foi usado o *Roll-Plate Method* para o teste, utilizando uma amostra padrão de *S. hyicus* (ATCC 11249), de acordo com as normas do NCCLS (2003). Durante o período de 10 dias, as amostras foram armazenadas nas duas temperaturas e a seguir os suabes foram plaqueados em Ágar Tween 80 com contagem das colônias a cada 24 horas. As amostras conservadas em todos os meios de transporte apresentaram desempenho significativamente superior ($P \leq 0,05$) quando mantidas em refrigeração. A conservação no Amies refrigerado foi superior a todos os outros tipos de meios e suabes ($P \leq 0,05$). Na temperatura ambiente, o meio Amies e os suabes mantidos sem meio de transporte foram similares ($P > 0,05$), sendo os melhores nesta temperatura. Adicionalmente, o meio Amies refrigerado demonstrou alta performance até nove dias de armazenamento e os suabes sem meio até três dias. Coletivamente, a alta performance em meio Amies refrigerado indicou ser este o mais adequado para o transporte de amostras de *S. hyicus*. No entanto, devido à resistência à dessecação da bactéria e em função da praticidade e baixo custo, poderiam também ser indicados suabes sem meio de transporte, mantidos na temperatura ambiente. Esta forma de envio seria viável quando a previsão de tempo para o transporte ao laboratório for menor que 48 horas, pois nesta forma de conservação houve sobrevivência adequada até 72 horas.

Palavras-chave: Suínos, *Staphylococcus hyicus*, suabes, meios de transporte.

ABSTRACT

Effect of different storage conditions for the survival of Staphylococcus hyicus

Author: Karine Ludwig Takeuti

Advisor: Prof. David Emilio S. N. de Barcellos

*Four commercial transport media (Amies, Amies with charcoal, Cary Blair and Stuart) and swabs without transport medium were assessed regarding their capacity to preserve *S. hyicus* for periods of up to 10 days at two different temperatures (room temperature [20-25°C] and refrigerated [4-8°C]). We did not find in the literature information on the effect of temperature and transport media for the survival of this bacteria. The Roll-Plate Method was used with a reference strain of *S. hyicus* (ATCC 11249), following recommendation of NCCLS (2003). The samples were stored for 10 days in two temperatures and after that, swabs were plated in Tween 80 Agar, counting bacterial colonies at each 24 hours. Samples held in all transport media showed significantly better performance ($P \leq 0.05$) in refrigeration. Storage in refrigeration in Amies medium performed better than all other transport media and swabs ($P \leq 0.05$). In room temperature, Amies medium and swabs without transport medium worked similarly ($P > 0.05$), and presented the best results in this temperature. Additionally, refrigerated Amies medium showed high performance for up to nine storage days and swabs without transport medium for up to three days. Collectively, the high performance in refrigerated Amies medium indicated that this is the most suitable medium for shipping of *S. hyicus*. However, considering *S. hyicus* resistance to desiccation, easiness of transportation and low cost, swabs without transport medium could also be indicated, when stored at room temperature. This form of shipment could be viable when the time predicted to transport to the laboratory would be smaller than 48 hours, since this form of preservation showed survival for up to 72 hours.*

Key words: *Swine, Staphylococcus hyicus, swabs, transport media.*

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas na revisão bibliográfica		Página
Tabela 1	Composição do meio de transporte comercial Stuart	20
Tabela 2	Composição do meio de transporte comercial Cary Blair	21
Tabela 3	Composição do meio de transporte comercial Amies	22
Tabela 4	Composição do meio de transporte comercial Amies com carvão	23

LISTA DE FIGURAS

Figuras inseridas na revisão bibliográfica		Página
Figura 1	Fluxograma do Método Quantitativo (<i>Swab Elution Method</i>)	26
Figura 2	Fluxograma do Método Qualitativo (<i>Roll-Plate Method</i>)	28
Figuras inseridas no artigo científico		Página
Figura 1	Taxas de sobrevivência de <i>S. hyicus</i> obtidas em cinco tipos de suabes e meios de transporte a cada dia de armazenamento, após manutenção em temperatura ambiente ou em refrigeração	35
Figura 2	Sobrevivência de <i>S. hyicus</i> em diversos meios de transporte, ao longo de dez dias de armazenamento, em temperatura ambiente ou em refrigeração. Os limites inferiores e superiores das caixas indicam os primeiros e terceiros quartis, respectivamente. Os limites inferiores e superiores das linhas verticais indicam os valores mínimos e máximos, respectivamente. O limite superior, das barras em cinza, representa o valor da mediana. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tipos de suabes, em cada temperatura, pelo teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as temperaturas de armazenamento, dentro de cada tipo de suabe	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 <i>Staphylococcus hyicus</i> e Epidermite Exsudativa.....	10
2.1.1 Etiologia	10
2.1.2 Patogenia	11
2.1.3 Epidemiologia	12
2.1.4 Sinais Clínicos.....	13
2.1.5 Diagnóstico.....	14
2.2 Conservação de amostras para o exame bacteriológico	15
2.2.1 Utilização de resfriamento para conservação de amostras para isolamento bacteriano	15
2.2.2 Utilização de meios de transporte para conservação de amostras para isolamento bacteriano.....	17
2.2.2.1 Meio de transporte Stuart	20
2.2.2.2 Meio de transporte Cary Blair.....	21
2.2.2.3 Meio de transporte Amies	21
2.2.2.4 Meio de transporte Amies com carvão.....	22
2.3 Controle de qualidade de suabes e meios de transporte comerciais	23
2.3.1 Método Quantitativo (<i>Swab Elution Method</i>)	25
2.3.2 Método Qualitativo (<i>Roll-Plate Method</i>)	26
3 ARTIGO	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A Epidermite exsudativa (EE) é uma doença da pele causada pelo coco Gram-positivo *Staphylococcus (S.) hyicus*, que acomete com mais frequência leitões de maternidade ou recém-desmamados (HARGIS & GINN, 2007; FRANA, 2012). Para que a doença se desenvolva, é fundamental a produção de toxinas esfoliativas, responsáveis por induzir as lesões da pele (ANDRESEN et al., 1993; TANABE et al., 1996; FRANA, 2012); e que são produzidas por cepas virulentas de *S. hyicus* (TANABE et al., 1996; ANDRESEN et al., 1997). No entanto, amostras virulentas podem estar presentes em suínos sadios (PARK & KANG, 1986; WEGENER et al., 1993), sendo necessários fatores predisponentes para a ocorrência de EE (TANABE et al., 1996; AARESTRUP & WEGENER, 1997). A doença é descrita mundialmente e sua frequência tem aumentado devido à ocorrência de doenças imunossupressoras e diversos manejos como: maior densidade animal, desmame precoce, mistura de lotes de animais (ANDRESEN, 1998; FRANA, 2012).

Considerando-se a idade dos animais afetados, distribuição das lesões e sinais clínicos, pode-se realizar o diagnóstico presuntivo de EE (DOSTER, 1995; NEUMANN et al., 2009). No entanto, a confirmação deve ser realizada através de testes laboratoriais. Um dos métodos mais utilizados é a coleta de amostras com suabes cutâneos para isolamento bacteriológico. Trata-se de uma amostragem rápida, economicamente viável, não invasiva e que pode ser aplicada em animais vivos, sem a necessidade de eutanásia (DUHAMEL et al., 1992). O isolamento bacteriano depende diretamente da viabilidade das bactérias presentes nas amostras, sendo que um fator crítico para o sucesso do exame é o transporte dos suabes, principalmente com relação à temperatura na qual são transportados e o tempo de duração do transporte (PERRY, 2001; NCCLS, 2003; PERRY & MATTHEWS, 2003). Normalmente, é recomendado o uso de meios de transporte para o acondicionamento de suabes quando o tempo entre a coleta e o processamento da amostra for longo, a fim de aumentar a taxa de viabilidade bacteriana (BARRY et al., 1972). Além disso, o armazenamento de amostras em temperaturas baixas tem sido usado para aumentar a sobrevivência bacteriana devido à redução da competição com outros microrganismos presentes no material e diminuição do metabolismo (STUART, 1959). Diversos tipos de

suabes e meios de transporte estão disponíveis, sendo necessário identificar se seus componentes podem influenciar negativamente a sobrevivência dos patógenos presentes nas amostras.

O objetivo deste trabalho foi avaliar quatro tipos de meios de transporte comerciais e a conservação em suabes sem meio quanto à capacidade de manter *S. hyicus* durante 10 dias de armazenamento sob duas temperaturas (ambiente [20-25°C] e refrigerada [4-8°C]). Não foram encontradas na literatura avaliações sobre a sobrevivência de *S. hyicus* em suabes e meios de transporte comerciais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus hyicus* e Epidermite Exsudativa

2.1.1 Etiologia

S. hyicus foi inicialmente descrito por Sompolinsky (1953) como *Micrococcus hyicus* e posteriormente classificado como pertencente ao gênero *Staphylococcus* sp. por Baird-Parker em 1965. A bactéria é um coco Gram-positivo, com aproximadamente 1µm de diâmetro, agrupado em forma de “cacho de uva” quando cultivado em meio sólido. Porém, em meio líquido, formam cadeias menores, semelhantes aos estreptococos. É uma bactéria aeróbia ou anaeróbia facultativa, imóvel, não forma esporos e é positiva para as provas de catalase, fosfatase, lipase, hialuronidase e DNase. É negativa para oxidase. Possui atividade variável no teste de coagulase em tubo, sendo que cerca de 25-50% dos isolados são positivos (L'ECUYER, 1967; DEVRIESE, 1977; OLIVEIRA, 2012). Além disso, *S. hyicus* possui a capacidade de fermentar lactose, glicose, manose e sacarose (L'ECUYER & JERICO, 1966; L'ECUYER, 1967; DEVRIESE, 1977).

S. hyicus multiplica-se em meios de cultivo comuns, como Ágar sangue, formando, após incubação por 24 horas a 37 °C, colônias circulares de coloração esbranquiçada com 3-4 mm de diâmetro, não hemolíticas em Ágar sangue ovino, bovino ou suíno (L'ECUYER, 1967; FRANA, 2012). Outras bactérias, como *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp., que frequentemente invadem a pele de suínos com EE, podem crescer em Ágar sangue (DEVRIESE, 1977), sendo necessária a diferenciação destas bactérias com *S. hyicus*.

Colônias de *S. hyicus* podem ser diferenciadas em meio contendo polissorbato 80 (Tween 80), que evidencia a atividade lipolítica da bactéria devido à formação de cristais, permitindo o crescimento de colônias esbranquiçadas, pequenas e circundadas por um halo opaco. O crescimento em meio Tween 80 ocorre entre 20-24 horas a 37°C (DEVRIESE, 1977; OLIVEIRA, 2012). *S. hyicus* pode também ser isolado no meio seletivo Ágar sal manitol, que inibe o crescimento de diversas bactérias e diferencia espécies de estafilococos, através da sua capacidade em fermentar o manitol (OLIVEIRA, 2012; TORTORA et al., 2012).

2.1.2 Patogenia

S. hyicus faz parte da microbiota da pele dos suínos (DEVRIESE, 1977; DEVRIESE et al., 1985; TANABE et al., 1996) e também pode ser isolado da mucosa nasal, conjuntiva, focinho, orelhas e vagina de animais saudáveis (HAJSIG et al., 1985; WEGENER & SKOV-JENSEN, 1992).

A capacidade do *S. hyicus* de provocar lesões esfoliativas está relacionada à clivagem da desmogleína 1 (dsg1), responsável pela adesão entre as células da epiderme. Com a clivagem, ocorre a separação dos queratinócitos da epiderme, resultando na esfoliação da pele (FUDABA et al., 2005). Inicialmente, *S. hyicus* multiplica-se na superfície da pele e entre os corneócitos da epiderme, onde há o desenvolvimento de microcolônias bacterianas (L'ECUYER & JERICHO, 1966). Em uma segunda etapa, ocorre inflamação, hiperplasia do extrato córneo, proliferação de neutrófilos e espessamento da epiderme, que posteriormente sofre erosão. O extrato germinativo se desorganiza e o microrganismo penetra no interior da derme (FRANA, 2012).

As amostras de *S. hyicus* são divididas em virulentas (produzem toxinas esfoliativas) ou avirulentas (não as produzem) (HUNTER et al., 1970; WEGENER et al., 1993). A inoculação de culturas puras de cepas virulentas de *S. hyicus* via subcutânea em suínos SPF (*Specific Pathogen Free*) é capaz de causar EE, enquanto cepas avirulentas não causam lesões (ANDRESEN et al., 1993; WEGENER et al., 1993), demonstrando que a toxina é responsável por induzir as lesões na pele de suínos (TANABE et al., 1996; ANDRESEN et al., 1997). Ambos os tipos de cepas podem estar presentes na pele de

suínos sadios ou doentes (PARK & KANG, 1986; WEGENER et al., 1993). No entanto, na pele de animais com EE, são encontradas com maior frequência cepas produtoras da toxina esfoliativa (72 a 74%) do que as não produtoras da toxina (26 a 28%) (ANDRESEN, 1998; ANDRESEN, 1999).

As toxinas esfoliativas isoladas no Japão (SATO et al.; 1991; TANABE et al., 1993; SATO et al., 2000) foram denominadas SHET e classificadas em dois sorotipos (SHETA e SHETB). Na Dinamarca, quatro sorotipos da toxina foram identificados: ExhA, ExhB, ExhC e ExhD (WEGENER et al., 1993; ANDRESEN, 1998; AHRENS & ANDRESEN, 2004), sendo a última possivelmente menos patogênica que as demais (WEGENER et al., 1993; ANDRESEN & AHRENS, 2004). Os isolados de *S. hyicus* podem expressar diversos tipos de toxinas esfoliativas em um mesmo animal com EE (ANDRESEN, 1999; ANDRESEN & AHRENS, 2004).

Andresen (1999) calculou uma probabilidade superior a 99% em se isolar uma cepa produtora de pelo menos um tipo de toxina esfoliativa em amostras de suínos com EE. No entanto, somente a presença de cepas patogênicas não é suficiente para produzir a doença. Leitões inoculados com cepas patogênicas podem não desenvolver sinais clínicos ou apresentar sinais brandos (SHIMIZU et al., 1989; TANABE et al., 1996), indicando haver outros fatores predisponentes envolvidos na patogenia da EE, como: presença de porta de entrada, através de lesões cutâneas; fatores ambientais; presença concomitante de outras doenças; sistema imunológico deficiente (SATO et al., 1991; ANDRESEN et al., 1993; WEGENER et al., 1993; ANDRESEN et al., 1997; HARGIS & GINN, 2007; BARCELLOS et al., 2012; FRANA, 2012).

2.1.3 Epidemiologia

O primeiro relato clínico de EE ocorreu há mais de 170 anos (SPINOLA, 1842). A doença é descrita na maior parte dos países onde a suinocultura está presente e sua frequência tem aumentado devido a diversos manejos como: maior densidade animal, desmame precoce, mistura de lotes de animais e ocorrência de doenças imunossupressoras (ANDRESEN, 1998; FRANA, 2012).

A EE pode acometer suínos em todas as idades, no entanto a doença se desenvolve com maior frequência em animais jovens (DEVRIESE, 1977; TANABE et al., 1996). As idades mais acometidas são leitões lactentes com aproximadamente 4-6 dias de idade e desmamados, com 5-6 semanas de idade (FRANA, 2012). Jones (1956) sugeriu que a EE ocorre em suínos mais jovens devido à susceptibilidade maior à toxina esfoliativa nestas fases.

A doença possui geralmente ocorrência esporádica, com morbidade e mortalidade variáveis, dependendo de condições ambientais, presença de infecções secundárias e da adoção ou não de tratamento precoce (BARCELLOS et al., 2012). Além destas condições, a imunidade apresenta um papel importante para o estabelecimento da doença (L'ECUYER & ALEXANDER, 1969). Surtos na maternidade geralmente ocorrem em até uma semana após o parto (PIGLETTER, 1991) depois da introdução de portadores em granjas onde os animais não tenham imunidade. São mais frequentes na presença de doenças imunossupressoras ou em leitões que nascem de fêmeas não imunes, podendo acometer 100% das leitegadas e causar mortalidade de até 70% (FRANA, 2012). Os surtos, geralmente, tendem a ser auto-limitantes com duração de 2-3 meses, podendo persistir ou haver recidiva caso fêmeas não imunes sejam introduzidas em plantéis com animais infectados. Surtos também podem ocorrer logo após o desmame dos leitões devido à mistura de lotes e consequente contato de animais não imunes com leitegadas infectadas (PIGLETTER, 1991; FRANA, 2012).

Entre as bactérias não esporuladas os estafilococos estão entre as mais resistentes no ambiente, mantendo-se viáveis em ambientes secos por 3-6 meses (WILSON & MILES, 1975). *S. hyicus* pode ser ainda encontrado em equinos, caninos, caprinos, bovinos e aves, e estas espécies podem servir de fontes de infecção para os suínos (FRANA, 2012).

2.1.4 Sinais Clínicos

Existem duas formas de apresentação da EE: a generalizada, que é a mais comum, afetando leitões lactentes; e a localizada, que geralmente acomete suínos logo após o desmame, podendo com pouca frequência ocorrer em porcas e leitoas (BARCELLOS et al., 2012; FRANA, 2012).

A forma generalizada da EE caracteriza-se inicialmente por apatia, diarreia e escurecimento na coloração da pele. Com a evolução da doença, desenvolvem-se vesículas na face, área lateral ao tronco, abdômen e parte interna dos membros posteriores. As vesículas podem se romper, resultando em exsudação, hiperemia e formação de crostas. A presença de exsudato favorece o crescimento bacteriano e a aderência de pó e sujidades na pele, dando aos animais um aspecto oleoso e de coloração escurecida, além de odor rançoso (DOSTER, 1995; WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999; BARCELLOS et al., 2012). A manifestação da forma generalizada da EE apresenta variação individual, já que não ocorre da mesma forma, intensidade e extensão em todos os leitões (SMITH et al., 1990). Na maternidade, a cada leitegada acometida, são observados de um a dois leitões com sinais clínicos de EE e a fêmea raramente adoece (WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999).

A forma localizada da EE ocorre geralmente em leitões na fase de creche e se caracteriza pela presença de lesões cutâneas circunscritas com crostas geralmente na região dorsal e lateral do pescoço e região caudal da orelha (WEGENER & SKOV-JENSEN, 1999; HARGIS & GINN, 2007; BARCELLOS et al., 2012).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de EE pode ser feito com facilidade quando considerados aspectos como: idade dos animais acometidos; distribuição e progressão das lesões, e sinais clínicos (DOSTER, 1995; NEUMANN et al., 2009). A ausência de febre e prurido, a presença de crostas, do aspecto gorduroso da pele e do odor rançoso são muito sugestivos de EE (MOTTA et al., 2011). Para a confirmação do diagnóstico devem ser realizados exames laboratoriais, principalmente através de testes bacteriológicos e histopatologia.

S. hyicus pode ser isolado de lesões de pele, linfonodos superficiais, fígado, baço e rins (FRANA, 2012). Para melhorar a chance de sucesso no diagnóstico, deve-se evitar a coleta de material de animais tratados com antimicrobianos ou quando as lesões forem leves (FRANA, 2012). A forma de coleta de amostras para análise laboratorial geralmente consiste de suabes de pele. É uma amostragem simples e eficiente, mas deve ser considerado que amostras assim coletadas podem estar contaminadas por outros agentes presentes na pele dos suínos (DOSTER, 1995). Por isto, para melhorar a chance do

isolamento de *S. hyicus* em amostras muito contaminadas, recomenda-se utilizar meios diferenciais, como o Tween 80. Para a classificação definitiva das bactérias isoladas, devem ser realizados testes bioquímicos. O isolamento de *S. hyicus* não permite a diferenciação entre cepas virulentas ou avirulentas, portanto, na presença de sinais clínicos e lesões típicos de EE, todos os tipos de *S. hyicus* isolados devem ser considerados potencialmente virulentos (MOTTA et al., 2011). A determinação da virulência do *S. hyicus* deve ser realizada pela detecção das toxinas esfoliativas, presentes em isolados patogênicos. Andresen (1998) e Andresen (1999) utilizaram o Elisa e o *Imunoblot* para a detecção de toxinas esfoliativas. Uma metodologia mais recente foi desenvolvida por Andresen & Ahrens (2004), que detectou simultaneamente quatro toxinas esfoliativas através do PCR *Multiplex*.

O diagnóstico diferencial da EE deve incluir doenças cutâneas como: pitíriase rósea, deficiência de zinco ou de biotina, lesões causadas por brigas entre leitões, varíola suína e sarna e a forma de dermatite e nefropatia causada pelo PCV2 (FRANA, 2012).

2.2 Conservação de amostras para o exame bacteriológico

O isolamento bacteriano depende diretamente da viabilidade das bactérias nas amostras, que pode ser comprometida com más condições de transporte (PERRY, 2001; NCCLS, 2003; PERRY & MATTHEWS, 2003). Por esse motivo, a conservação de amostras é fundamental na recuperação bacteriana e no sucesso do diagnóstico laboratorial (MILLER et al., 2003).

Entre as formas de melhorar a viabilidade das amostras de materiais coletados para exame bacteriológico entre a coleta e a chegada ao laboratório, tem sido usadas diferentes formas de conservação, como resfriamento e utilização de meios de transporte, que serão revisadas a seguir.

2.2.1 Utilização de resfriamento para conservação de amostras para isolamento bacteriano

A temperatura de armazenamento e o tempo de duração entre a coleta e o processamento do material são fatores que podem interferir na recuperação de bactérias

patogênicas (PERRY, 2001; NCCLS, 2003; PERRY & MATTHEWS, 2003). Nem sempre é possível o envio de amostras ao laboratório rapidamente, o que pode determinar longos períodos de tempo (superiores a 48 horas) entre a coleta e o início do processamento e pode inviabilizar a utilização das amostras clínicas (STUART, 1959; DUHAMEL et al., 1992; PERRY, 2001). No Brasil, devido à grande extensão territorial e diferenças climáticas regionais, esses fatores tendem a ser muito importantes, demandando cuidados rigorosos para o transporte de materiais biológicos (SILBERT et al., 2004). É relevante, também, considerar a programação de envio do material para exame, evitando, por exemplo, as remessas nas sextas-feiras. Ao enviar neste dia, as chances do material ficar sem processamento e sem cuidados de conservação no fim de semana são muito grandes (SOBESTIANSKY et al., 2005). Em qualquer situação, o envio deve ser comunicado por telefone ou e-mail e informada a necessidade ou não de retirada do material em aeroporto, correios ou rodoviária.

O armazenamento de amostras em temperaturas baixas tem sido utilizado para prolongar a sobrevivência de bactérias devido à diminuição do metabolismo bacteriano e redução da competição com outros microrganismos que possam estar presentes no material (STUART, 1959; SOBESTIANSKY et al., 2005), já que poucos patógenos são capazes de crescer em baixas temperaturas (TORTORA et al., 2012). A maioria dos estudos comparam a performance dos meios de transporte quando as amostras são armazenadas em temperatura ambiente (20-25°C) e refrigeradas (4-8°C), que no geral demonstram melhor desempenho. Por isso, a remessa em temperatura ambiente não é recomendada (ROSS, 1977; ARBIQUE et al., 2000; PERRY, 2001; ARBIQUE et al., 2003; THOMSON & MILLER, 2003). Ross & Lough (1978) observaram que amostras que contém coliformes, como *Escherichia coli*, mantidas à temperatura ambiente, apresentaram crescimento excessivo (cerca de cinco vezes maior do que em amostras refrigeradas), inviabilizando a contagem bacteriana. Perry & Matthews (2003) e Silbert et al. (2004) observaram que amostras conservadas em baixas temperaturas controlaram o crescimento bacteriano excessivo, sendo possível obter melhores taxas de sobrevivência de bactérias fastidiosas quando as amostras foram acondicionadas em suaves refrigerados. No entanto, Miller et al. (2003) observaram que o armazenamento de amostras em refrigeração tem efeito

antibacteriano para alguns tipos de bactérias fastidiosas, como *Neisseria (N.) gonorrhoeae*, *N. meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, que não toleram baixas temperaturas.

2.2.2 Utilização de meios de transporte para conservação de amostras para isolamento bacteriano

A utilização de suabes para amostragens clínicas é um método rápido, eficaz e economicamente viável para o diagnóstico de infecções causadas por diversos microrganismos, tanto em humanos quanto em animais. Permite também a amostragem em animais vivos, não havendo necessidade de eutanásia, o que representa uma grande praticidade para o envio de amostras (DUHAMEL et al., 1992). Os primeiros suabes foram elaborados por Councilman (1893), a fim de desenvolver um método que permitisse a coleta de amostras de pacientes com suspeita de difteria. Atualmente, os suabes comerciais são compostos basicamente de (ASTM, 2002):

(1) meio de transporte, que pode estar ausente, ser líquido ou semi-sólido e tem a finalidade de preservar a integridade dos microrganismos durante o armazenamento da amostra entre a coleta e o processamento laboratorial. Geralmente o meio de transporte contém substâncias incapazes de promover a multiplicação de microrganismos, mas que garantem sua sobrevivência;

(2) dispositivo de coleta, que consiste em uma haste de plástico contendo em uma das extremidades um material composto por uma fibra absorvente, como algodão, poliéster sintético, *rayon* (viscose) e poliuretano;

(3) tubo onde o suabe ficará armazenado, que tem a finalidade de conservar o meio de transporte e proteger a amostra durante o transporte.

Meios de transporte foram adicionados aos suabes inicialmente por Moffett et al. (1948) com o objetivo de facilitar a coleta de amostras, reduzir custos e, principalmente, garantir o sucesso na conservação de microrganismos. O princípio do seu uso estava em desacelerar os processos de crescimento e morte bacteriana e impedir o crescimento excessivo de microrganismos comensais eventualmente presentes nas amostras (BARRY et al., 1972; BARBER et al., 1998; ISIBOR & AMADI, 2010). Os suabes com meio de transporte são amplamente utilizados e apresentam vantagens em relação aos suabes sem

meio (DUHAMEL et al., 1992). A razão para tal seria a garantia de uma maior taxa de sobrevivência bacteriana, aumentando a chance de sucesso no isolamento de patógenos desejáveis, já que diversas bactérias são incapazes de sobreviver por longos períodos em suabes (BARRY et al., 1972).

Perry (1997) encontrou melhores taxas de sobrevivência bacteriana em suabes com meio de transporte, atingindo taxas de recuperação de 12 a 92% para bactérias anaeróbias e 13 a 76% para aeróbias após 24 horas de armazenamento. Por outro lado, quando as amostras foram armazenadas em suabes sem meio de transporte apresentaram taxas de <1% a 2% para bactérias aeróbias e 0% a 36% para anaeróbias. Barry et al. (1972) observaram que tanto bactérias aeróbias quanto anaeróbias apresentaram quedas significativas de sobrevivência após poucas horas de armazenamento em suabes sem meio de transporte. No entanto, quando as mesmas bactérias foram armazenadas em suabes com meio de transporte, a recuperação bacteriana foi maior. Suabes sem meio de transporte são recomendados apenas para amostras a serem processadas logo após a coleta. Para amostras armazenadas por períodos longos, deve-se utilizar um meio de transporte para manter a viabilidade bacteriana (MANDLER & SFONDRINI, 1977).

Embora os meios de transporte forneçam condições para aumentar a viabilidade bacteriana por período maiores, as amostras devem ser processadas o mais rápido possível, evitando armazenamentos por períodos excessivamente longos (BARRY et al., 1972; ISIBOR & AMADI, 2010).

Os meios de transporte devem ser facilmente manipuláveis pelos laboratórios, apresentar preços acessíveis e ter aplicabilidade ampla (STUART, 1959). Devem também evitar o crescimento de microrganismos apatogênicos e, no entanto, devem manter a viabilidade dos agentes causadores da doença a ser diagnosticada (DUHAMEL et al., 1992). Além disso, para que um meio de transporte seja eficiente na recuperação de agentes patogênicos, necessita conter baixa concentração de nutrientes e pH próximo à neutralidade, pois a maioria das bactérias cresce melhor nessa faixa (CARY & BLAIR, 1964; TORTORA et al., 2012). A queda do pH é uma importante causa de mortalidade bacteriana durante o transporte (TORTORA et al., 2012). Por esse motivo, os meios de transporte devem possuir baixo potencial fermentativo e devem incluir tampões em suas formulações, como o glicerofosfato de sódio (STUART, 1959) ou fosfato inorgânico

(CARY & BLAIR, 1964), para impedir a acidificação do meio e a consequente morte bacteriana (DUHAMEL et al., 1992).

As amostras clínicas devem ser coletadas em meios de transporte capazes de manter a viabilidade dos microrganismos presentes nas amostras (NCCLS, 2003). Dessa forma, a escolha do meio de transporte é fundamental para preservar a viabilidade dos patógenos. Alguns componentes do meio podem ser prejudiciais para determinados microrganismos. Além disso, o próprio material absorvente utilizado no suabe pode ser prejudicial, como o algodão, que possui ácidos graxos insaturados que podem ser tóxicos a determinados microrganismos, causando sua morte (RUBBO & BENJAMIN, 1951; ELLNER & ELLNER, 1966). No entanto, outros trabalhos (COLLEE et al., 1974; ROSS, 1977) sugerem que o algodão não tenha componentes tóxicos. Acredita-se que a quantidade de bactérias absorvidas por suabes de algodão seja menor e que parte dos microrganismos fiquem retidos no algodão, diminuindo a quantidade de bactérias depositadas nas placas de cultivo. Os suabes de algodão foram substituídos por outros materiais, como poliéster sintético, viscosa e poliuretano, ou meios de transporte sem nutrientes foram adicionados aos suabes de algodão para prolongar a sobrevivência bacteriana (ELLNER & ELLNER, 1966; BARBER et al., 1998).

O Ágar presente nos meios de transporte permite a redução da dispersão bacteriana no meio. Deve ser firme para suportar a agitação durante o transporte e, ao mesmo tempo, flexível, para evitar que se quebre no momento em que o suabe é introduzido ou retirado (STUART, 1959). Nas quantidades em que são encontrados nos meios comerciais, ajudam a manter um ambiente úmido e anaeróbio, favorecendo a sobrevivência bacteriana (DUHAMEL et al., 1992; HINDIYEH et al., 2001). Na ausência de umidade, a maioria das bactérias sofre eventos celulares irreversíveis, que podem acarretar em morte, como desnaturação proteica, ruptura de membrana e perda de compostos citoplasmáticos (POTTS, 2001).

A oxidação é uma importante causa de morte bacteriana durante o transporte (STUART, 1959). O tioglicolato de sódio foi selecionado para retardar este processo por ser o melhor agente redutor em meios de transporte (STUART, 1959; DUHAMEL et al., 1992). Agentes redutores combinam com as moléculas de oxigênio livres, auxiliando a manter um ambiente anaeróbio (DUHAMEL et al., 1992).

Alguns sais presentes nos meios, como cloreto de cálcio, cloreto de sódio e cloreto de magnésio, mantém as bactérias permeáveis aos nutrientes, contribuindo para a sua sobrevivência (BRIDSON, 1998). Por outro lado, a quantidade reduzida de nutrientes nos meios pode inibir o crescimento de bactérias comensais na amostra, evitando acidificação excessiva do meio e impedindo a inibição competitiva (ISIBOR & AMADI, 2010).

2.2.2.1 Meio de transporte Stuart

O meio Stuart comercial (Tabela 1) consiste em uma modificação do meio proposto originalmente por Moffett et al. (1948) e Stuart et al. (1954), formulados para a conservação de bactérias fastidiosas. A baixa concentração de nutrientes no meio garante a sobrevivência bacteriana (STUART, 1959). No entanto, a presença do glicerofosfato de sódio, que pode ser metabolizado por bactérias intestinais e outras Gram-negativas que possuem glicerofosfato desidrogenases específicas - como *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella aerogenes* (CROOKES & STUART, 1959), pode favorecer o crescimento excessivo destas, prejudicando a amostra a ser analisada (BRIDSON, 1998). O azul de metileno age como um indicador de oxidação, apresentando coloração azul na presença de oxigênio no meio (STUART, 1959).

Tabela 1 - Composição do meio de transporte comercial Stuart.

Componentes	g/L em água destilada
Glicerofosfato de sódio	10,0
Tioglicolato de sódio	0,5
Hidrocloreto de L-cisteína	0,5
Cloreto de cálcio	0,1
Azul de metileno	0,001
Ágar	5,0
pH 7,4 ± 0,2	

Adaptado de Bridson (1998)

2.2.2.2 Meio de transporte Cary Blair

O meio Cary Blair (Tabela 2) consiste em uma modificação do meio Stuart e é utilizado preferencialmente para a conservação de bactérias Gram-negativas e anaeróbias, como *Salmonella* sp. e *Shigella* sp e para amostras intestinais e fecais. O meio previne o crescimento excessivo de bactérias, principalmente as que possuem glicerofosfato desidrogenases específicas (CROOKES & STUART, 1959). Isso se dá pela substituição do glicerofosfato de sódio, presente no meio Stuart, por fosfatos inorgânicos como agentes tampão (CARY & BLAIR, 1964; BRIDSON, 1998).

Tabela 2 - Composição do meio de transporte comercial Cary Blair.

Componentes	g/L em água destilada
Hidrogenofosfato Dissódico	1,1
Tioglicolato de sódio	1,5
Cloreto de sódio	5,0
Cloreto de cálcio	0,09
Ágar	5,6
pH 8,4 ± 0,2	

Adaptado de Bridson (1998)

2.2.2.3 Meio de transporte Amies

O meio de transporte Amies (1967) (Tabela 3) foi desenvolvido a partir de uma modificação do meio Stuart (STUART et al., 1954; STUART, 1959), substituindo-se o glicerofosfato de sódio, presente no meio Stuart, por um tampão inorgânico (fosfato), assim como procedeu Cary & Blair (1964). O cálcio e o magnésio foram adicionados ao meio com o intuito de aumentar a sobrevivência bacteriana através do controle osmótico e do fornecimento de eletrólitos para os microrganismos.

Tabela 3 - Composição do meio de transporte comercial Amies.

Componentes	g/L em água destilada
Hidrogenofosfato Dissódico	1,15
Dihidrogênio fosfato de potássio	0,2
Tioglicolato de sódio	1,0
Cloreto de sódio	3,0
Cloreto de potássio	0,2
Cloreto de cálcio	0,1
Cloreto de magnésio	0,1
Ágar	4,0
pH 7,2 ± 0,2	

Adaptado de Bridson (1998)

2.2.2.4 Meio de transporte Amies com carvão

O meio de transporte Amies com carvão (Tabela 4) possui os mesmos componentes que o Amies, com a adição do carvão. A importância do carvão em meios de transporte ainda não foi esclarecida, entretanto, sugere-se que ele seja capaz de absorver inibidores e resíduos bacterianos (como toxinas) que podem se acumular no meio durante o armazenamento (STUART et al., 1954; KELLOG et al., 1976). A presença do carvão poderia permitir a sobrevivência de bactérias patogênicas por um período mais longo (BRIDSON, 1998). Stuart (1959) já tinha observado este benefício na sobrevivência de *N. gonorrhoeae*, no entanto, como o carvão altera a coloração do meio, não foi bem aceito na medicina humana. No entanto, o carvão apresenta certa toxicidade às bactérias Gram-positivas (MANDLER & SFONDRINI, 1977), sendo aconselhável a sua utilização para a conservação de bactérias Gram-negativas.

Tabela 4 - Composição do meio de transporte comercial Amies com carvão.

Componentes	g/L em água destilada
Carvão	10,0
Hidrogenofosfato Dissódico	1,15
Dihidrogênio fosfato de potássio	0,2
Tioglicolato de sódio	1,0
Cloreto de sódio	3,0
Cloreto de potássio	0,2
Cloreto de cálcio	0,1
Cloreto de magnésio	0,1
Ágar	4,0
pH 7,2 ± 0,2	

Adaptado de Bridson (1998)

2.3 Controle de qualidade de suabes e meios de transporte comerciais

Sabendo-se que determinados componentes dos meios de transporte ou materiais presentes em suabes podem influenciar negativamente a viabilidade de microrganismos nas amostras, foram desenvolvidos métodos para o controle de qualidade de suabes e meios de transporte (M40-P-*Quality Control of Microbiological Transport Systems: Proposed Standard*), elaborados pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), em 2003.

O documento M40-P propõe dois protocolos (Método Quantitativo - *Swab Elution Method* e Método Qualitativo - *Roll-Plate Method*) que apresentam metodologias e resultados semelhantes (SILBERT et al., 2004) e foram estabelecidos de acordo com diversos trabalhos publicados. Através dessas metodologias é possível avaliar a viabilidade de microrganismos por tempos determinados e temperaturas diferentes.

A metodologia sugere que os testes de controle de qualidade sejam realizados em triplicata, ou seja, três suabes de cada tipo devem ser testados por período de armazenagem, temperatura e diluição do inóculo. Além disso, é proposta a utilização de amostras padrão do *American Type Culture Collection* (ATCC). No entanto, a análise de amostras ATCC

não é indicada para testes de controle de qualidade de suabes e meios de transporte para bactérias que atuem em sinergismo na patogenia da doença com outros microrganismos comensais, como *Brachyspira hyodysenteriae*, por exemplo (DUHAMEL et al., 1992). Além disso, a ausência de materiais biológicos nestas amostras, como: proteína, muco, exsudato e outros microrganismos competidores, encontrados em amostras clínicas, pode prejudicar a recuperação do patógeno desejado. A presença de exsudato mucopurulento ou sanguinolento na amostra pode conferir proteção aos microrganismos patogênicos da dessecação e do ar (PERRY, 1997; BARBER et al., 1998; NCCLS, 2003).

A sobrevivência dos microrganismos em suabes e meios de transporte deve ser observada após o armazenamento das amostras em duas faixas de temperatura: ambiental (20-25°C) e refrigerada (4-8°C), que correspondem às temperaturas onde permanecem a maioria das amostras clínicas após as coletas (NCCLS, 2003).

A concentração bacteriana utilizada no inóculo varia conforme o tipo de bactéria, sendo divididas em três categorias: aeróbias e anaeróbias facultativas; anaeróbias; fastidiosas. A concentração dos inóculos utilizados nos testes não é determinada com o intuito de refletirem a concentração de bactérias em amostras clínicas. A escolha da concentração é realizada para permitir a avaliação precisa do desempenho dos suabes e meios de transporte (NCCLS, 2003). A quantidade do inóculo absorvida depende do tipo de material do suabe. Suabes feitos de *rayon* ou poliéster sintético podem absorver 100µL (PERRY, 1997), enquanto que o poliuretano consegue absorver aproximadamente 50µL do inóculo. Sabendo-se disso, quando utilizados suabes de poliuretano, dilui-se o inóculo a 1:5, enquanto para os outros tipos de suabes é utilizada a diluição 1:10 (NCCLS, 2003).

Durante a execução das técnicas, placas que apresentam > 300 UFC não são contabilizadas (GREENBERG et al., 1992). Para os cálculos das taxas de sobrevivência bacteriana é selecionada a diluição que apresenta contagens bacterianas mais próximas a 300 colônias na hora zero. Os percentuais de recuperação bacteriana para cada tipo de suabe e meio de transporte, temperatura e tempo de armazenamento são calculados considerando-se 100% os obtidos na H0 (NCCLS, 2003).

2.3.1 Método Quantitativo (*Swab Elution Method*)

Este método permite uma avaliação quantitativa da habilidade de meios de transporte em manter a viabilidade de microrganismos (NCCLS, 2003). O fluxograma da técnica está representado na Figura 1.

O inóculo bacteriano inicial deve apresentar a concentração inicial de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (equivalente à escala 0,5 de McFarland). Em seguida, é diluído em solução salina 0,85% (pH 6,8 a 7,2) até que seja obtida a concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Incuba-se 100 μ L em poços de placas de microtitulação, onde os suabes são inseridos por 10 segundos para absorção do material. Em seguida, são armazenados nos tubos com ou sem meio de transporte e mantidos em temperaturas específicas (ambiente e refrigerada) por determinados períodos de tempo. Os suabes que correspondem à hora zero (H0) são removidos imediatamente dos tubos para processamento. Após o armazenamento, são imersos em 1mL de solução salina 0,85% e homogeneizados em vórtex por 15 segundos para que o inóculo inicial seja diluído até a obtenção de diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Ao final 100 μ L de cada diluição são plaqueados em duplicata (Figura 1). Todo o processo, desde a preparação do inóculo, acondicionamento nos tubos com o respectivo meio de transporte e o armazenamento (refrigerado ou ambiente) não deve ultrapassar 20 minutos para garantir que não haja redução de bactérias viáveis, especialmente anaeróbias fastidiosas (NCCLS, 2003).

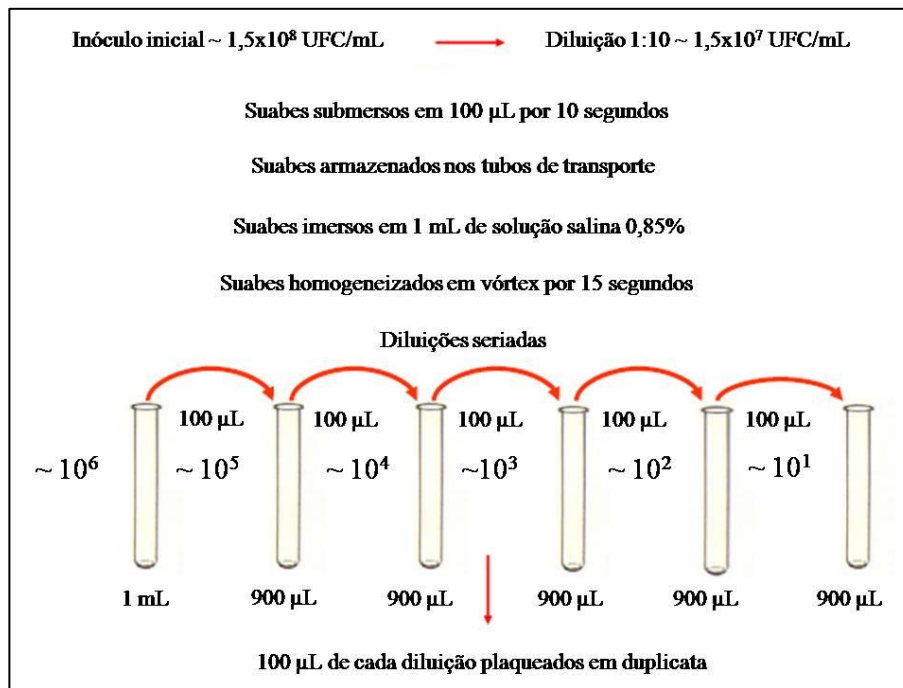


Figura 1 - Fluxograma do Método Quantitativo (*Swab Elution Method*).
Adaptado de NCCLS (2003)

2.3.2 Método Qualitativo (*Roll-Plate Method*)

Na rotina laboratorial, geralmente o método *Roll-Plate* é o mais utilizado para plaqueamento de suabes em meios de cultivo. No entanto, não se trata de um método quantitativo, mas de uma aproximação semi-quantitativa (NCCLS, 2003).

Alguns estudos observaram uma menor eficácia na recuperação de bactérias fastidiosas após inoculação através do *Roll-Plate Method* quando comparado ao método quantitativo (PERRY & MATTHEWS, 2003). No entanto, Arbique et al. (2003) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos nos dois métodos. O método qualitativo (*Roll-Plate Method*) é menos trabalhoso e economicamente acessível quando comparado ao método quantitativo (ARBIQUE et al., 2003). Além disso, é o que mais se aproxima do que é realizado com amostras provenientes de casos clínicos, pois considera variáveis mecânicas envolvidas no processo de plaqueamento das amostras (ARBIQUE et al., 2003; NCCLS, 2003).

O fluxograma do método está representado na Figura 2. O inóculo deve ser preparado em solução salina 0,85% (pH 6,8-7,2) a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, que equivale à escala 0,5 de McFarland. A partir do inóculo inicial, devem ser realizadas quatro diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), para que ao final sejam obtidas concentrações bacterianas de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL a $1,5 \times 10^4$ UFC/mL, sendo que as três concentrações menores são utilizadas. Incuba-se 100µL de cada concentração em placas de microdiluição para posterior imersão dos suabes por 10 segundos para absorção do inóculo. Em seguida, são armazenados nos tubos com ou sem meio de transporte e mantidos em temperaturas específicas (ambiente e refrigerada) por determinados períodos de tempo.

O plaqueamento das amostras é realizado através do contato de toda a superfície do suabe em todo o Ágar. O procedimento deve ser repetido mais duas vezes, após a rotação da placa em 60° a cada semeadura. As bordas do Ágar devem ser evitadas. Após 15 minutos do plaqueamento, deve-se incubar as placas na temperatura e tempo de armazenamento desejadas (NCCLS, 2003). Todo o procedimento não deve exceder 20 minutos para não ocorrer perda na viabilidade do inóculo antes do armazenamento dos suabes nas temperaturas desejadas.

Este teste é realizado em triplicata, ou seja, para cada diluição, tempo de armazenamento e temperatura são utilizados três suabes. Para o cálculo de UFC por tipo de suabe/meio de transporte a cada dia e temperatura é feita uma média com os três valores obtidos.

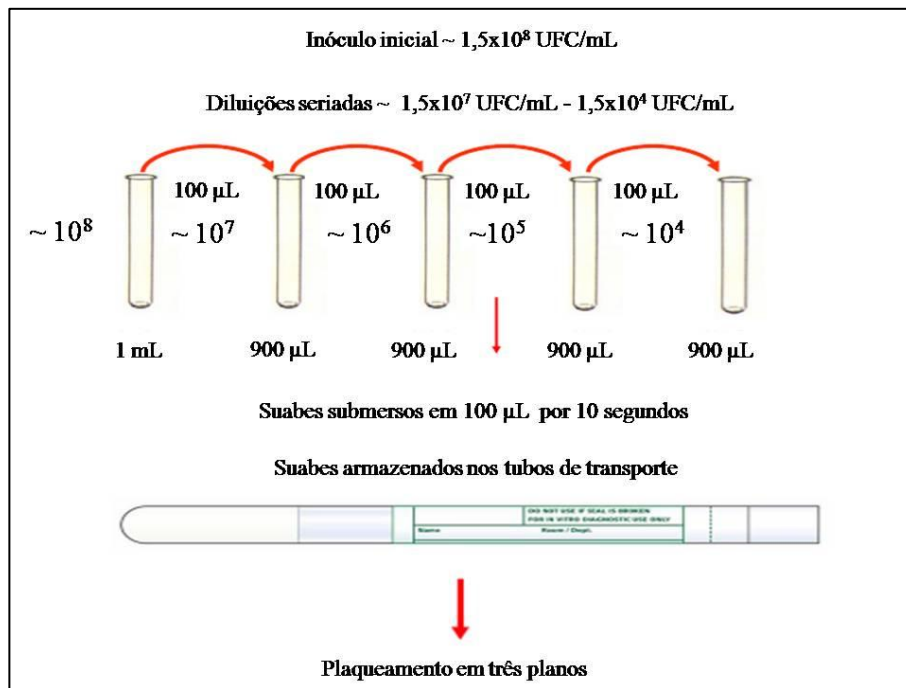


Figura 2 - Fluxograma do Método Qualitativo (*Roll-Plate Method*).

Adaptado de NCCLS (2003)

3 ARTIGO

“EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO NA SOBREVIVÊNCIA DE *Staphylococcus hyicus*”

Abstract

Four commercial transport media (Amies, Amies with charcoal, Cary Blair and Stuart) and swabs without transport medium were assessed regarding their capacity to preserve S. hyicus for periods of up to 10 days at two different temperatures (room temperature [20-25°C] and refrigerated [4-8°C]). We did not find in the literature information on the effect of temperature and transport media for the survival of this bacteria. The Roll-Plate Method was used with a reference strain of S. hyicus (ATCC 11249), following recommendation of NCCLS (2003). The samples were stored for 10 days in two temperatures and after that, swabs were plated in Tween 80 Agar, counting bacterial colonies at each 24 hours. Samples held in all transport media showed significantly better performance ($P \leq 0.05$) in refrigeration. Storage in refrigeration in Amies medium performed better than all other transport media and swabs ($P \leq 0.05$). In room temperature, Amies medium and swabs without transport medium worked similarly ($P > 0.05$), and presented the best results in this temperature. Additionally, refrigerated Amies medium showed high performance for up to nine storage days and swabs without transport medium for up to three days. Collectively, the high performance in refrigerated Amies medium indicated that this is the most suitable medium for shipping of S. hyicus. However, considering S. hyicus resistance to desiccation, easiness of transportation and low cost, swabs without transport medium could also be indicated, when stored at room temperature. This form of shipment could be viable when the time predicted to transport to the laboratory would be smaller than 48 hours, since this form of preservation showed survival for up to 72 hours.

Key words: Swine, *Staphylococcus hyicus*, swabs, transport media.

INTRODUÇÃO

A Epidermite exsudativa (EE) é uma doença de pele causada pelo coco Gram-positivo *Staphylococcus (S.) hyicus*. A EE acomete suínos de diversas idades, sendo mais frequente em leitões de maternidade ou recém-desmamados (FRANA, 2012). Os sinais clínicos e lesões geralmente são típicos (DOSTER, 1995), mas podem ocorrer variações e, por isso, recomenda-se a confirmação do diagnóstico pelo isolamento bacteriológico após a coleta de suabes, principalmente de lesões de pele (WEGENER, 1992; FRANA, 2012). Esta é uma forma de amostragem rápida, economicamente viável, não invasiva e que pode ser aplicada em animais vivos, sem a necessidade de eutanásia (DUHAMEL et al., 1992).

O exame bacteriológico depende diretamente da viabilidade das bactérias nas amostras, que pode ser afetada pelo transporte dos suabes, principalmente com relação à temperatura na qual são transportados e o tempo de duração do transporte (PERRY, 2001; NCCLS, 2003; PERRY & MATTHEWS, 2003), já que algumas bactérias são incapazes de sobreviver em suabes após longos períodos de armazenamento (BARRY et al., 1972). Normalmente é recomendado o armazenamento de amostras em temperaturas baixas e a utilização de meios de transporte para o acondicionamento de suabes quando o tempo entre a coleta e o processamento da amostra for longo (BARRY et al., 1972), a fim de aumentar a sobrevivência bacteriana (STUART, 1959).

Diversos tipos de suabes e meios de transporte estão disponíveis comercialmente, mas não existem avaliações sobre a sobrevivência de *S. hyicus* em suabes e meios de transporte comerciais. O objetivo deste trabalho foi avaliar quatro tipos de meios de transporte comerciais e a conservação em suabes sem meio quanto à capacidade de manter *S. hyicus* durante 10 dias de armazenamento sob duas temperaturas diferentes (ambiente [20-25°C] e refrigerada [4-8°C]).

MATERIAL E MÉTODOS

O método usado para a comparação dos meios de transporte e suabes foi o Método Qualitativo (*Roll-Plate Method*), recomendado pelo NCCLS (2003), pois considera variáveis mecânicas envolvidas no processo de plaqueamento das amostras, aproximando-se do que é realizado com amostras provenientes de casos clínicos (ARBIQUE et al., 2003; NCCLS, 2003). Resumidamente consta de:

Amostragem: para a preparação de culturas puras foi utilizada uma amostra de *S. hyicus* ATCC (*American Type Culture Collection*) 11249.

Formas de conservação: foram utilizados meios de transporte e suabes frequentemente utilizados na conservação de amostras clínicas. Dessa forma, cinco formas de conservação foram avaliadas:

(1) Meio de transporte Amies. Suabe feito com haste de plástico, com uma das extremidades envolvida por fibras de *rayon* (viscose), Cral-Plast®;

(2) Meio de transporte Amies com carvão. Suabe feito com haste de plástico e uma das extremidades envolvida por fibras de *rayon* (viscose), Cral-Plast®;

(3) Meio de transporte Stuart. Suabe feito com haste de plástico e extremidade envolta por algodão, Labor Import®;

(4) Meio de transporte Cary Blair. Suabe feito com haste de plástico, com uma das extremidades envolvida por fibras de *rayon* (viscose), Cral-Plast®;

(5) Suabe sem meio de transporte. Feito com haste de plástico e extremidade envolta por algodão, Labor Import®.

Todos os meios e suabes foram utilizados seguindo as recomendações dos fabricantes.

Inóculo: foram selecionadas três a quatro colônias de *S. hyicus* ATCC 11249 e inoculadas em caldo Müller Hinton para incubação a 36°C em estufa em média por duas horas, até que o inóculo atingisse a turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Quando necessário, foram realizados ajustes na turbidez do caldo com solução salina estéril 0,85%.

Método Qualitativo (*Roll-Plate Method*): a partir do inóculo, quatro diluições foram preparadas em solução salina 0,85%: 1:10 ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL), 1:100 ($1,5 \times 10^6$

UFC/mL), 1:1.000 ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL) e 1:10.000 ($1,5 \times 10^4$ UFC/mL). Os suabes foram submersos nos poços das placas de microtitulação, que continham 100 μ L de três das quatro diluições (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), onde foram mantidos por 10 segundos para a absorção das diluições do inóculo pela extremidade absorvente. Em seguida, os suabes foram acondicionados nos tubos e armazenados à temperatura ambiente (20-25°C) e refrigerados (4-8°C) por até 10 dias. Os suabes correspondentes à hora zero foram imediatamente removidos dos tubos e plaqueados em Ágar Tween 80 (NCCLS, 2003). Para cada tipo de meio de transporte (5), tempos de armazenamento (10), temperaturas (2) e diluições (3) foram utilizadas três repetições (suabes), totalizando 900 suabes.

Decorrido o tempo de armazenamento, os suabes foram semeados em três planos, girando-se as placas a 60° a cada semeadura, rotando os suabes para que todas as superfícies da extremidade absorvente entrassem em contato de forma uniforme com a superfície da placa do meio de cultivo (Tween 80). A seguir foram incubadas a 37°C por 20 horas. Após o período de incubação, a cada 24 horas, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC) desde a hora zero até 10 dias de armazenamento. As placas que apresentaram > 300 não foram usadas para a contagem (GREENBERG et al., 1992).

Para os cálculos das taxas de sobrevivência de *S. hyicus* foi escolhida a diluição 10^{-4} ($1,5 \times 10^4$ UFC/mL), pois esta apresentou contagens bacterianas mais próximas a 300 colônias na hora zero. Os percentuais de recuperação de *S. hyicus* para cada tipo de suabe e meio de transporte, temperatura e tempo de armazenamento foram calculados considerando-se 100% os obtidos na hora zero (NCCLS, 2003). Para fins de discussão dos resultados, estipulou-se que taxas de recuperação bacteriana superiores a 50% fossem consideradas altas e valores inferiores a 50% representassem baixa viabilidade.

Análise Estatística: para avaliar o desempenho de cada tipo de meio de transporte, nas diferentes temperaturas de conservação, foram comparados os percentuais médios de recuperação da bactéria ao longo do período de armazenamento, com o uso de um teste não paramétrico (Teste de Kruskal-Wallis) no programa SAS (Statistical Analysis System, 2005). O mesmo teste foi utilizado para comparar as duas temperaturas de armazenamento, dentro de cada meio de transporte. Diferenças foram consideradas significativas com o valor de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados das taxas de sobrevivência (recuperação), nos diferentes meios de transporte ao longo dos dias e nas duas temperaturas, estão apresentados na Figura 1. Nas amostras conservadas em suabes sem meio de transporte, em temperatura ambiente, as taxas de sobrevivência foram próximas de 70% nos dois primeiros dias. Foram observadas quedas sucessivas ao longo do armazenamento, alcançando <20% a partir do oitavo dia. Nas amostras sem meio de transporte, em refrigeração, a taxa de sobrevivência variou de 43,0 a 31,7%, do primeiro ao quarto dia, com queda para <20% a partir do quinto dia.

Com o meio Amies, taxa de sobrevivência de *S. hyicus* superior a 100% foi observada nos primeiros dois dias em temperatura ambiente, além de altas taxas de sobrevivência ainda no quinto e sexto dias de armazenamento (53,5% e 67,2% respectivamente). Em sete dos 10 dias de armazenamento em refrigeração foi observada recuperação acima de 100%, com queda para 76,1% e 30,4% no nono e décimo dias, respectivamente.

Ocorreu intensa queda na taxa de sobrevivência de *S. hyicus* nas primeiras 24 horas de armazenamento em temperatura ambiente (25,4%) com o meio de transporte Amies com carvão; nos demais dias de armazenamento a taxa permaneceu abaixo de 20%. Em refrigeração, foi observada sobrevivência que variou de 71,4 a 76,7%, nos três primeiros dias de armazenamento. Do quarto ao sétimo dia, a taxa esteve próxima de 40% e, nos últimos três dias de armazenamento, caiu para valores abaixo de 30%.

Para o meio de transporte Cary Blair, em temperatura ambiente, a taxa de sobrevivência de *S. hyicus* esteve abaixo de 10% em todos os dias de armazenamento. Nas amostras refrigeradas, as taxas de recuperação foram instáveis, sobretudo nos primeiros cinco dias armazenamento, com valores variando de 7,2% a 60,0%. Nos demais dias de armazenamento, os valores estiveram próximos ou abaixo de 20%.

A taxa de sobrevivência no meio de transporte Stuart foi de 43,8% após 24 horas de armazenamento em temperatura ambiente, tendo reduzido para 12,5% e 1,5% no segundo e terceiro dia de armazenamento; a partir do quarto dia de armazenamento não foi mais possível isolar *S. hyicus*. A sobrevivência das amostras refrigeradas foi bastante estável ao

longo do armazenamento com variação de 24,6 a 42,6%; em seis dos dez dias de armazenamento os valores foram próximos de 30%.

As amostras mantidas em refrigeração apresentaram maior taxa de recuperação ($P \leq 0,05$) do que as amostras mantidas em temperatura ambiente (Figura 2), em todos os meios de transporte, mas não nos suabes sem meio de transporte ($P > 0,05$). Na comparação efetuada nas amostras mantidas em temperatura ambiente, houve diferença ($P \leq 0,05$) entre todos os suabes com meio de transporte, sendo o melhor resultado observado com Amies e o pior com Stuart. O suabe sem meio de transporte apresentou desempenho semelhante ($P > 0,05$) aos meios Amies e Amies-Carvão. Nas amostras refrigeradas, o meio Amies foi superior a todos os outros tipos de suabes ($P \leq 0,05$). O segundo melhor meio foi o Amies com carvão. O meio Cary Blair teve resultado semelhante ($P > 0,05$) ao meio Stuart e ao suabe sem meio de transporte.

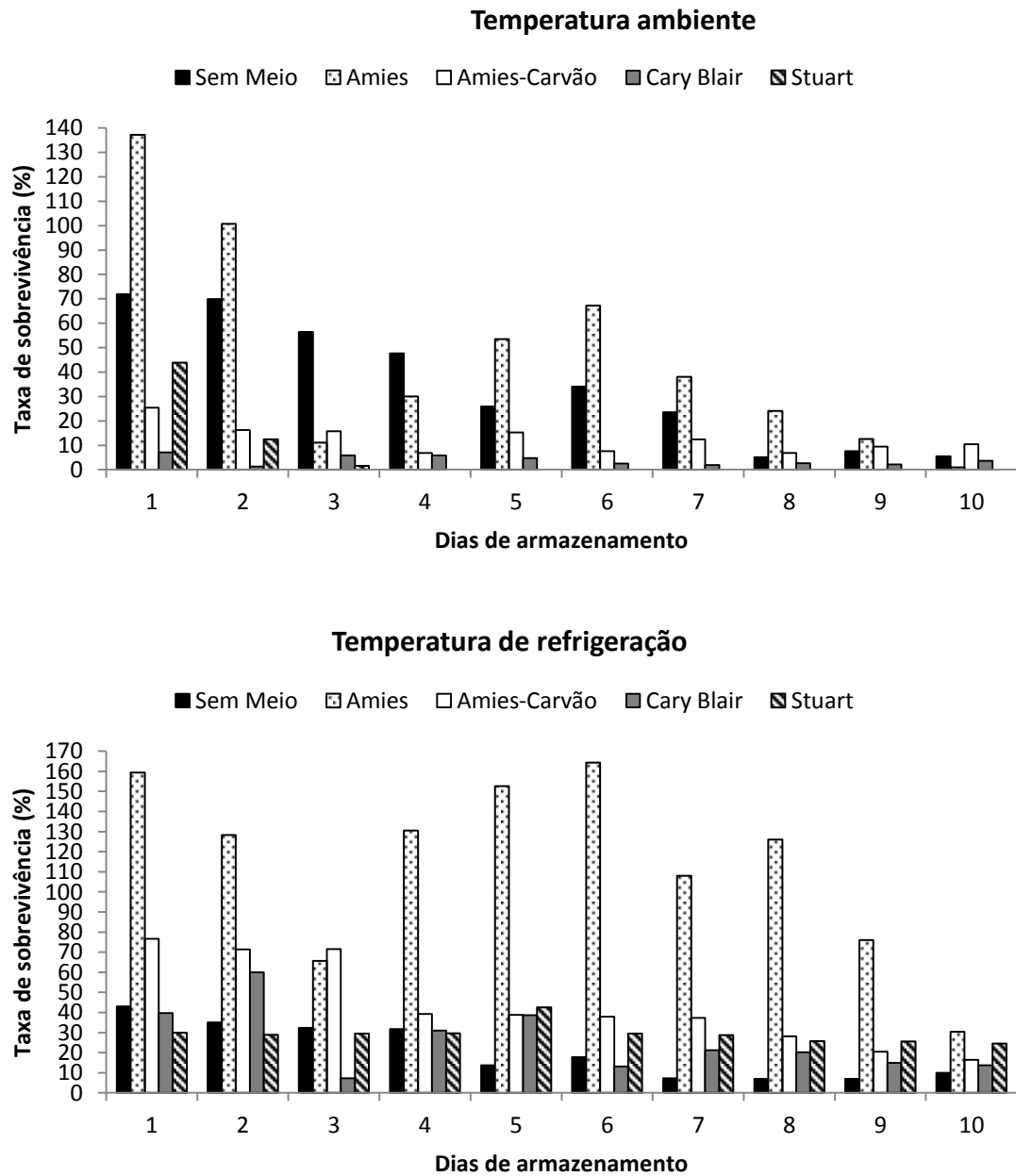


Figura 1 - Taxas de sobrevivência de *S. hyicus* obtidas em cinco tipos de suabes e meios de transporte a cada dia de armazenamento, após manutenção em temperatura ambiente ou em refrigeração.

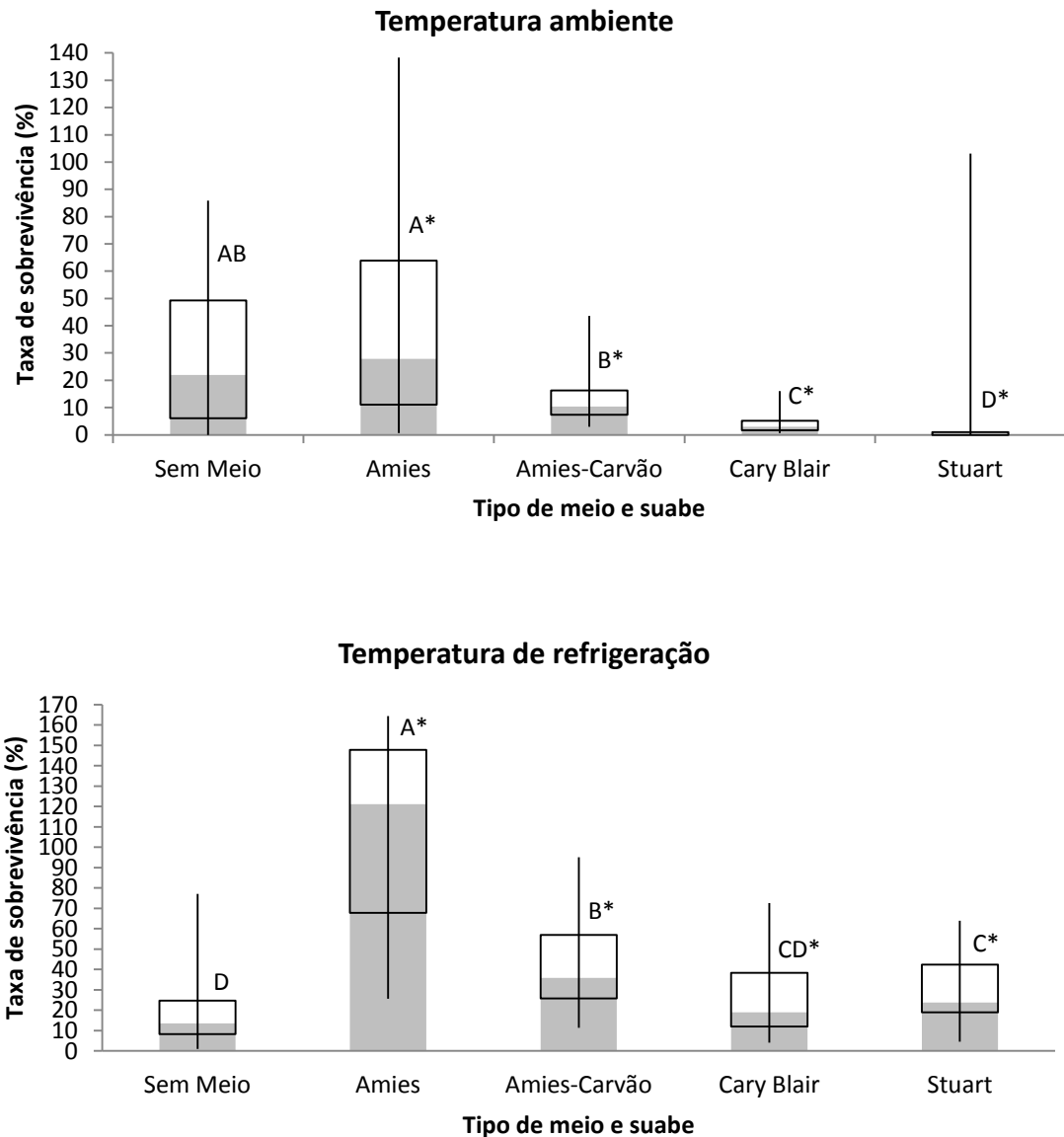


Figura 2 - Sobrevivência de *S. hyicus* em diversos meios de transporte, ao longo de dez dias de armazenamento, em temperatura ambiente ou em refrigeração. Os limites inferiores e superiores das caixas indicam os primeiros e terceiros quartis, respectivamente. Os limites inferiores e superiores das linhas verticais indicam os valores mínimos e máximos, respectivamente. O limite superior, das barras em cinza, representa o valor da mediana. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tipos de suabe, em cada temperatura, pelo teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). Asteriscos indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as temperaturas de armazenamento, dentro de cada tipo de suabe.

DISCUSSÃO

O envio de materiais clínicos para o laboratório utilizando meios de transporte, deve facilitar a coleta, reduzir custos de transporte e proporcionar resultados de exames laboratoriais equivalentes aos obtidos com os métodos usuais de coleta e remessa de materiais ao laboratório. Em amostras contaminadas, o uso de meios de transporte deve permitir a recuperação de patógenos que se encontrem em títulos baixos, evitando o crescimento excessivo de contaminantes capazes de interferir com o seu isolamento, mesmo após armazenamento por 48 horas na temperatura ambiente (DUHAMEL et al., 1992). Especificamente para *S. hyicus*, não foram encontrados na literatura estudos descrevendo o desempenho e utilidade de meios de transporte para o envio de materiais para o laboratório. Neste trabalho, foram testados quatro meios de transporte e suabes mantidos em tubos na ausência de Ágar conservante.

Em ambientes secos, a maioria das bactérias sofre danos celulares irreversíveis, que podem acarretar em morte, como desnaturação proteica, ruptura de membrana e perda de compostos citoplasmáticos (POTTS, 2001). Um resultado inesperado no trabalho foi uma taxa de sobrevivência do *S. hyicus* superior a 50% por 72 horas nos suabes conservados sem meio de transporte na temperatura ambiente. Acredita-se que a resistência dos estafilococos à dessecação tenha sido fundamental para o bom resultado obtido nestas condições. Em função da estrutura da parede celular, bactérias Gram-positivas (incluindo os estafilococos) tendem a ser bastante resistentes a fatores como ausência de umidade, ruptura e lise celular (WILSON & MILES, 1975; FRANA, 2012; TORTORA et al., 2012). Usando a conservação em suabe sem meio de transporte em temperatura ambiente, não houve diferença estatisticamente significativa comparando os meios Amies e Amies com carvão e resultados melhores do que os obtidos com os meios Cary Blair e Stuart.

Avaliando a sobrevivência de *S. hyicus* nos diferentes meios, suabes e temperaturas testadas, foi possível observar que as amostras refrigeradas em meio Amies mostraram desempenho estatisticamente superior a todos os outros tipos de conservação avaliados. Apesar de haver flutuação nas taxas de recuperação bacteriana entre os dias avaliados (principalmente títulos baixos no terceiro dia de armazenamento em refrigeração), foi observada capacidade satisfatória para a manutenção da viabilidade de *S. hyicus* por até

nove dias nesta temperatura. Na temperatura ambiente, as amostras também apresentaram boa performance no meio Amies, superior a todos os outros meios, mas estatisticamente igual à conservação em suabes sem meio de transporte.

Hindiye et al. (2001) também registraram desempenho superior do meio Amies para a conservação de bactérias anaeróbias e aeróbias por mais de 24 horas quando comparado com outros meios comerciais, como Stuart. A grande quantidade de sais no meio Amies pode ter contribuído para a sobrevivência de *S. hyicus*, pois os eletrólitos podem manter o metabolismo bacteriano e promover o controle osmótico (AMIES, 1967; BRIDSON, 1998). Um dos componentes do Amies é o hidrogenofosfato de sódio, que pode atuar como tampão (AMIES, 1967), impedindo a acidificação do meio que pode ser gerada quando houver crescimento bacteriano excessivo. Outra vantagem do Amies é a presença de um segundo tampão (dihidrogênio fosfato de potássio), que confere ao meio uma estabilidade maior de pH. Pela avaliação atual, o meio Amies foi capaz de manter a viabilidade de *S. hyicus* por longos períodos, principalmente em amostras refrigeradas.

A adição de carvão ao meio Amies forma o Amies com carvão. Sugere-se que o componente seja capaz de absorver inibidores e resíduos bacterianos (como toxinas) que podem se acumular no meio durante o armazenamento (STUART et al., 1954; KELLOG et al., 1976), favorecendo a sobrevivência de bactérias por períodos mais longos, incluindo patógenos (BRIDSON, 1998). Quando comparado a outros meios de transporte, o Amies com carvão apresentou desempenho significativamente inferior ao Amies nas temperaturas testadas. Barber et al. (1998) também encontraram intensa queda na sobrevivência de *S. aureus* (46%) nas primeiras 24 horas de armazenamento na temperatura ambiente no Amies com carvão. Mandler & Sfondrini (1977) sugeriram que o carvão possa ser tóxico para Gram-positivas, o que poderia explicar a performance inferior do meio na conservação de *Staphylococcus*.

O meio Cary Blair é uma modificação do Stuart, com a substituição do tampão glicerofosfato de sódio por fosfato inorgânico. É utilizado para a conservação de Gram-negativas e anaeróbias, principalmente amostras retais e fecais (CARY & BLAIR, 1964). Neste trabalho, amostras de *S. hyicus* mantidas neste meio à temperatura ambiente apresentaram intensa redução na taxa de isolamento já nas primeiras 24 horas de armazenamento, resultando na pior recuperação entre todos os tipos de suabes e meios

neste dia e temperatura. Já as amostras refrigeradas apresentaram taxas de recuperação superiores às mantidas na temperatura ambiente, porém instáveis na maior parte do tempo de armazenamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Barber et al. (1998), com taxas de sobrevivência de *S. aureus* de apenas 20% nas primeiras 24 horas e 4% após 48 horas na temperatura ambiente. Os resultados obtidos neste e em outros trabalhos demonstram que este meio não é recomendado para a conservação de estafilococos, principalmente na temperatura ambiente.

S. hyicus não apresentou boas taxas de sobrevivência no meio Stuart, tanto em temperatura ambiente quanto refrigerado. Na temperatura ambiente, a partir do quarto dia de armazenamento, já não foi mais possível isolar a bactéria. Por essa razão, quando comparado aos outros tipos de meios e suabes, o Stuart apresentou o pior desempenho na temperatura ambiente. Já em refrigeração, não demonstrou diferença significativa com o meio Cary Blair e melhor desempenho que suabes sem meio de transporte. Barber et al. (1998) observaram que o meio Stuart foi eficiente em manter amostras de *S. aureus* por 24 horas em temperatura ambiente, com variações de 81 a 141% de sobrevivência, mas que no segundo dia variaram de 29 a 166%. As amostras não foram avaliadas por mais tempo, por isso não foi possível determinar o tempo limite de conservação das amostras de *S. aureus*. Especificamente em relação ao *S. hyicus*, com os resultados obtidos, sugere-se que o meio Stuart deve ser evitado para o armazenamento.

Segundo alguns autores (RUBBO & BENJAMIN, 1951; ELLNER & ELLNER, 1966), o algodão presente na extremidade dos suabes de meios como o Stuart e o suabe sem meio de transporte usados neste estudo pode ser tóxico a determinados microrganismos, causando sua morte. No entanto, outros autores (COLLEE et al., 1974; ROSS, 1977) indicam que o algodão não teria tais componentes tóxicos. Acredita-se que a quantidade de bactérias absorvidas por suabes de algodão seja baixa e que parte dos microrganismos retidos no algodão não sejam transferidos, diminuindo a quantidade de células depositada nas placas de cultivo. Neste trabalho, a ausência de isolamento de *S. hyicus* em suabes com meio Stuart a partir de quatro dias de armazenamento na temperatura ambiente provavelmente não tenha relação com o uso de suabes de algodão, pois o desempenho negativo não foi observado em amostras refrigeradas. Além disso, suabes de algodão sem meio de transporte apresentaram boa performance na conservação de *S. hyicus* na

temperatura ambiente. Durante o experimento, foram observadas grandes variações no volume dos materiais absorventes (algodão e *rayon*) presentes na extremidade dos suabes, o que pode ter determinado variações nas quantidades de inóculo de *S. hyicus* transferidas para a superfície do Ágar. Isto pode ter tido relação com o crescimento flutuante observado em dias sucessivos de avaliação de meios de transporte e suabes. Para tentar controlar este efeito na avaliação das taxas de sobrevivência de cada suabe, o NCCLS (2003) recomenda o uso de triplicatas e que sejam calculadas as médias de UFC obtidas para cada tipo de suabe, para cada temperatura e dia de armazenamento.

Neste trabalho foi observado que todos os suabes com meio de transporte apresentaram melhor desempenho na conservação de *S. hyicus* quando mantidos em refrigeração. Estes resultados corroboram estudos anteriores que demonstraram melhor recuperação de diferentes espécies bacterianas armazenadas em refrigeração (ROSS, 1977; ARBIQUE et al., 2000; PERRY, 2001; ARBIQUE et al., 2003; THOMSON & MILLER, 2003). Em temperatura ambiente, existe uma aceleração do metabolismo da maioria das bactérias, gerando maior multiplicação e mudanças negativas para populações bacterianas, como acúmulo de substâncias tóxicas, alterações de pH e esgotamento de nutrientes.

Suabes sem meio de transporte não apresentaram diferença significativa na conservação de *S. hyicus* entre as duas temperaturas, que pode ter ocorrido devido à diminuição do metabolismo bacteriano que ocorre pela dessecação do suabe, independentemente da temperatura de conservação.

De acordo com os resultados do trabalho, a utilização do meio Amies refrigerado foi vantajosa e seria a melhor alternativa para a conservação de *S. hyicus* entre a coleta no campo e chegada ao laboratório. A conservação de amostras é crítica num país de grande extensão territorial como o Brasil, em que nem sempre é possível enviar e processar rapidamente amostras coletadas no campo. Outra alternativa interessante que emergiu a partir dos resultados é a possibilidade de acondicionar materiais para envio em suabes sem meio de transporte, pois também apresentaram boas taxas de sobrevivência (superiores a 50%) por até três dias de armazenamento na temperatura ambiente. Na rotina do atendimento clínico em granjas de criação de suínos, pela praticidade, economicidade e desempenho satisfatório, a remessa em suabes sem meio de transporte poderia ser indicada

para transportes com previsão de chegada do material ao laboratório em tempo inferior a 48 horas.

CONCLUSÕES

- Entre todos os meios de transporte e suabes analisados, o meio Amies em refrigeração apresentou o melhor desempenho para a conservação do *S. hyicus*;

- Suabes sem meio de transporte podem ser usados para remessas de materiais ao laboratório na temperatura ambiente com previsão de chegada em tempo inferior a 48 horas. Como apresentaram desempenho similar entre as duas temperaturas de armazenamento, pela praticidade e baixo custo, poderia ser indicada a remessa na temperatura ambiente;

- Os meios Cary Blair e Stuart não devem ser utilizados na conservação de *S. hyicus*;

- O desempenho de todos os meios de transporte testados foi significativamente superior quando amostras de *S. hyicus* foram armazenadas em refrigeração.

REFERÊNCIAS

AMIES, C. R. A modified formula for the preparation of Stuart's Transport Medium. **Canadian Journal of Public Health**, v. 58, p. 296–300, 1967.

ANDRESEN, L. O. Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 20, p. 301-310, 1998.

ARBIQUE, J. C.; FORWARD, K. R.; LEBLANC, J. Evaluation of four commercial transport media for the survival of *Neisseria gonorrhoeae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.36, p.163-168, 2000.

ARBIQUE, J.; CAMPBELL, S.; MACFARLANE, M.; DAVIDSON, R. J. Comparison of methodologies for anaerobic organisms describes in NCCLS document M40-P, quality control of microbiological transport devices. **Proceedings**...In: European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Glasgow, p.1-4, 2003.

BARBER, S.; LAWSON, P. J.; GROVE, D. I. Evaluation of bacteriological transport swabs. **Pathology**, v. 30, p. 179-182, 1998.

BARRY, A. L.; FAY, G. D.; SAUER, R. L. Efficiency of a transport medium for the recovery of aerobic and anaerobic bacteria from applicator swabs. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 31-33, 1972.

BRIDSON, E. Y. **The Oxoid Manual**. 8. ed. Hampshire: Basingstoke, 371p., 1998.

CARY, S. G.; BLAIR, E. B. New transport medium for shipment of clinical specimens. Fecal specimens. **Journal of Bacteriology**, v. 88, p. 96-98, 1964.

COLLEE, J. G.; WATT, B.; BROWN, R.; JOHNSTONE, S. The recovery of anaerobic bacterian from swabs. **The Journal of Hygiene**, v. 72, n. 3, p. 339-347, 1974.

DOSTER, A. R. Skin Diseases of Swine. **Swine Health and Production**, v. 3, n. 6, p. 256-261, 1995.

DUHAMEL, G. E.; BERNARD, R. J.; MATHIESEN, M. R.; ESKRIDGE, K. M. Comparison of six commercially available transport media for maintenance of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 285-292, 1992.

ELLNER, P. D.; ELLNER, C. J. Survival of bacteria on swabs. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 2, p. 905-906, 1966.

FRANA, T. S. Staphylococcosis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. **Diseases of Swine**. 10. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, p. 834-840, 2012.

GREENBERG, A. E.; CLESCERI, L. S.; EATON, A. D. 9215 heterotrophic plate count. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water**. 18. ed. Washington, D.C.: APHA, p. 933-934, 1992.

HINDIYEH, M.; ACEVEDO, V.; CARROLL, K. C. Comparison of three transport systems for maintenance of anaerobic and fastidious aerobic organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 67, p. 317-318, 2001.

KELLOG, D. S.; HOLMES, K. K.; HILL, G. A. Laboratory Diagnosis of Gonorrhoea. In: MARCUS, D.; SHERRIS, J. C. **Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology**. 4. ed. Washington D. C.: American Society of Microbiology, p. 6, 1976.

MANDLER, F.; SFONDRINI, D. Evaluation of survival of bacteria on dry swabs and transport systems. **Annali Sclavo**, v. 19, n. 4, p. 537-545, 1977.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Quality Control of Microbiological Transport Systems; Approved Standard. M40-P**, v. 23, n. 34, p. 1-18, 2003.

PERRY, J. L. Effects of temperature on fastidious organism viability during swab transport. **Proceedings...**In: General Meeting of the American Society for Microbiology, Orlando, C-55, 2001.

PERRY, J. L.; MATTHEWS, J. S. Compliance of two popular swab transport systems with performance standards detailed by the new NCCLS proposed standard, M40-P. **Proceedings...**In: General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D. C., C-42, 2003.

POTTS, M. Desiccation tolerance: a simple process. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 553-9, 2001.

ROSS, P. W. The isolation of *Streptococcus pyogenes* from throat swabs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 10, p. 69-76, 1977.

RUBBO, S. D.; BENJAMIN, M. Some observations on survival of pathogenic bacteria on cotton-wood swabs. **British Medical Journal**, v. 55, p. 983-987, 1951.

SAS INSTITUTE. **SAS User's Guide Release 9.1.3**. SAS Institute, Cary, NC. 2005.

STUART, R. D.; TOSHACH, S. R.; PATSULA, T. M. The problem of transport of specimens for culture of gonococci. **Canadian Journal of Public Health**, v. 45, p. 73-83, 1954.

STUART, R. D. Transport medium for specimens in public health bacteriology. **Public Health Reports**, v. 74, n. 5, p. 431-438, 1959.

THOMSON, R. B. J. R.; MILLER, J. M. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 286-330, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 934p, 2012.

WEGENER, H. C. *Staphylococcus hyicus* epidemiology and virulence in relation to exudative epidermitis in pigs. **Tese de doutorado**. Lyngby: Technical University of Denmark, 1992. 116p.

WILSON, G. S.; MILES, A. **Principles of Bacteriology, Virology and Immunity**. London: Edward Arnold. 6. ed, p. 764-790, 1975.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho demonstrou que o meio de transporte Amies em refrigeração foi o mais indicado na manutenção da viabilidade do *S. hyicus*. A melhor performance deste meio de transporte ocorreu possivelmente pela composição do meio e pelo armazenamento em refrigeração, que diminuiu o metabolismo bacteriano e, conseqüentemente, manteve as células viáveis por um período mais longo.

Surpreendentemente, suabes sem meio de transporte apresentaram taxas de recuperação bacteriana satisfatórias quando armazenados na temperatura ambiente por até 72 horas. Além disso, nesta temperatura, não apresentaram diferença estatística em seu desempenho quando comparados ao meio Amies, demonstrando que para o armazenamento de bactérias resistentes à dessecação, como *S. hyicus*, é possível utilizar suabes sem meio para envio de amostras ao laboratório na temperatura ambiente com tempos de transporte de até 48 horas.

Este foi o primeiro trabalho a comparar o desempenho de meios de transporte e suabes para a conservação do *S. hyicus*. A doença causada pelo agente (EE) ocorre frequentemente em granjas tecnificadas de suínos em todo o mundo. Seu diagnóstico depende basicamente da análise clínica na granja, mas deve ser confirmado pela coleta de suabes de pele de animais afetados e exames laboratoriais. Por essa razão, a identificação dos melhores tipos de meio de transporte e suabes, além da temperatura ideal de armazenamento, são importantes para complementar a atividade do veterinário envolvido na clínica de suínos.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C. Association between production of fibrinolysin and virulence of *Staphylococcus hyicus* in relation to exudative epidermitis in pigs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 38, n. 3, p. 295-297, 1997.

AHRENS, P.; ANDRESEN, L. O. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 1833-1837, 2004.

AMIES, C. R. A modified formula for the preparation of Stuart's Transport Medium. **Canadian Journal of Public Health**, v. 58, p. 296-300, 1967.

ANDRESEN, L. O.; WEGENER, H. C.; BILLE-HANSEN, V. *Staphylococcus hyicus*-skin reactions in piglets caused by extracellular products and by partially purified exfoliative toxin. **Microbial Pathogenesis**, v. 15, p. 217-225, 1993.

ANDRESEN, L. O.; BILLE-HANSEN, V.; WEGENER, H. C. *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin: purification and demonstration of antigenic diversity among toxins from virulent strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 2, n. 2, p. 113-22, 1997.

ANDRESEN, L. O. Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 20, p. 301-310, 1998.

ANDRESEN, L. O. Development and evaluation of an indirect ELISA for detection of exfoliative toxin ExhA, ExhB or ExhC produced by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 68, p. 285-292, 1999.

ANDRESEN, L. O.; AHRENS, P. A multiplex PCR for detection of genes encoding exfoliative toxins from *Staphylococcus hyicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1265-1270, 2004.

ARBIQUE, J. C.; FORWARD, K. R.; LEBLANC, J. Evaluation of four commercial transport media for the survival of *Neisseria gonorrhoeae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.36, p.163-168, 2000.

ARBIQUE, J.; CAMPBELL, S.; MACFARLANE, M.; DAVIDSON, R. J. Comparison of methodologies for anaerobic organisms describes in NCCLS document M40-P, quality control of microbiological transport devices. **Proceedings**...In: European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Glasgow, p.1-4, 2003.

ASTM. **Standard Terminology of Packaging and Distribution Environments**. West Conshohocken: ASTM, 2002.

BAIRD-PARKER, A. C. The classification of Staphylococci and Micrococci from world-wide sources. **Journal of General Microbiology**, v. 38, p. 363-387, 1965.

BARBER, S.; LAWSON, P. J.; GROVE, D. I. Evaluation of bacteriological transport swabs. **Pathology**, v. 30, p. 179-182, 1998.

BARCELLOS, D.; ALBERTON, G. C.; SOBESTIANSKY, J.; DONIN, D. G.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORÉS, N. Doenças de Pele. In: BARCELLOS, D.; SOBESTIANSKY, J. **Doenças dos Suínos**. 2. ed. Goiânia: Cânone Editorial, p. 475-479, 2012.

BARRY, A. L.; FAY, G. D.; SAUER, R. L. Efficiency of a transport medium for the recovery of aerobic and anaerobic bacteria from applicator swabs. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 31-33, 1972.

BRIDSON, E. Y. **The Oxoid Manual**. 8. ed. Hampshire: Basingstoke, 371p., 1998.

CARY, S. G.; BLAIR, E. B. New transport medium for shipment of clinical specimens. Fecal specimens. **Journal of Bacteriology**, v. 88, p. 96-98, 1964.

COLLEE, J. G.; WATT, B.; BROWN, R.; JOHNSTONE, S. The recovery of anaerobic bacteria from swabs. **The Journal of Hygiene**, v. 72, n. 3, p. 339-347, 1974.

COUNCILMAN, W. T. The pathology and diagnosis of diphtheria. **American Journal of Medicine Science**, v. 106, p. 540-552, 1893.

CROOKES, E. M.; STUART, R. D. The value of aerosporin in the isolation of *Neisseria* from swabs forwarded to the laboratory in transport medium. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 78, p. 283-288, 1959.

DEVRIESE, L. A. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 6, p. 787-92, 1977.

DEVRIESE, L. A.; SCHLEIFER, K. H.; ADEGOKE, G. O. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 58, p. 45-55, 1985.

DOSTER, A. R. Skin Diseases of Swine. **Swine Health and Production**, v. 3, n. 6, p. 256-261, 1995.

DUHAMEL, G. E.; BERNARD, R. J.; MATHIESEN, M. R.; ESKRIDGE, K. M. Comparison of six commercially available transport media for maintenance of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 285-292, 1992.

ELLNER, P. D.; ELLNER, C. J. Survival of bacteria on swabs. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 2, p. 905-906, 1966.

FRANA, T. S. Staphylococcosis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. **Diseases of Swine**. 10. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, p. 834-840, 2012.

FUDABA, Y.; NISHIFUJI, K.; ANDRESEN, L. O.; YAMAGUCHI, T.; KOMATSUZAWA, H.; AMAGAI, M.; SUGAI, M. *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins selectively digest porcine desmoglein 1. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, p. 171-176, 2005.

GREENBERG, A. E.; CLESCERI, L. S.; EATON, A. D. 9215 heterotrophic plate count. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water**. 18. ed. Washington, D.C.: APHA, p. 933-934, 1992.

HAJSIG, D.; BABIC, T.; MADIC, J. Exudative epidermitis in piglets. II. Distribution of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*: findings in healthy piglets. **Veterinarski Arhiv**, v. 55, p. 45-54, 1985.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. The Integument. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. St. Louis: Elsevier, p. 1182, 2007.

HINDIYEH, M.; ACEVEDO, V.; CARROLL, K. C. Comparison of three transport systems for maintenance of anaerobic and fastidious aerobic organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 67, p. 317-318, 2001.

HUNTER, D.; TODD, J. N.; LARKIN, M. Exudative epidermitis of pigs. **The British Veterinary Journal**, v. 126, p. 225-229, 1970.

ISIBOR, J. O.; AMADI, P. U. Comparison of a modified peptone water transport medium with two commercially available transport media for the recovery of aerobes from swab specimens. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 23, p. 3464-3467, 2010.

JONES, L. D. Exudative epidermitis of pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 17, n. 63, p. 179-193, 1956.

KELLOG, D. S.; HOLMES, K. K.; HILL, G. A. Laboratory Diagnosis of Gonorrhoea. In: MARCUS, D.; SHERRIS, J. C. **Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology**. 4. ed. Washington D. C.: American Society of Microbiology, p. 6, 1976.

L'ECUYER, C. L.; JERICHO, K. Exudative epidermitis in pigs: etiological studies and pathology. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 30, n. 4, p. 94-101, 1966.

L'ECUYER, C. L. Exudative epidermitis in pigs: bacteriological studies on the causative agent *Staphylococcus hyicus*. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 31, p. 243-247, 1967.

L'ECUYER, C. L.; ALEXANDER, D. C. Exudative epidermitis in pigs. Treatment trials. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 10, n. 9, p. 227-237, 1969.

MANDLER, F.; SFONDRINI, D. Evaluation of survival of bacteria on dry swabs and transport systems. **Annali Sclavo**, v. 19, n. 4, p. 537-545, 1977.

MILLER, M. J.; HOLMES, H. T.; KRISHER, K. General principles of specimen collection and handling. In: MURRAY, R. P.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, p. 55-66, 2003.

MOFFETT, M.; YOUNG, J. L.; STUART, R. D. Centralized gonococcus culture for dispersed clinics; the value of a new transport medium for gonococci and trichomonas. **British Medical Journal**, v. 28, n. 2, p. 421–424, 1948.

MOTTA, A. P.; BIONDO, N.; SATO, J. P. H.; BARCELLOS, D. Epidermite exsudativa em suínos. **A Hora Veterinária**, v. 181, p. 62-67, 2011.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Quality Control of Microbiological Transport Systems; Approved Standard. M40-P**, v. 23, n. 34, p. 1-18, 2003.

NEUMANN, E. J.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J. **Swine Disease Manual**. Iowa: American Association of Swine Veterinarians, p. 23-24, 2009.

OLIVEIRA, S. J. **Guia Bacteriológico Prático**. Canoas: ULBRA. 3. ed, p. 71-76, 2012.

PARK, C. K.; KANG, B. K. Studies on exudative epidermitis in pigs. I. Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from diseased and healthy pigs. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 251-257, 1986.

PERRY, J. L. Assessment of swab transport systems for aerobic and anaerobic organism recovery. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1269-1271, 1997.

PERRY, J. L. Effects of temperature on fastidious organism viability during swab transport. **Proceedings...**In: General Meeting of the American Society for Microbiology, Orlando, C-55, 2001.

PERRY, J. L.; MATTHEWS, J. S. Compliance of two popular swab transport systems with performance standards detailed by the new NCCLS proposed standard, M40-P. **Proceedings...**In: General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D. C., C-42, 2003.

PIGLETTER. Greasy pig (disease review). **International Pigletter**, v. 11, p. 30-2, 1991.

POTTS, M. Desiccation tolerance: a simple process. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 553-9, 2001.

ROSS, P. W. The isolation of *Streptococcus pyogenes* from throat swabs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 10, p. 69-76, 1977.

ROSS, P. W.; LOUGH, H. Survival of upper respiratory tract bacteria on cotton-wool swabs. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 430-433, 1978.

RUBBO, S. D.; BENJAMIN, M. Some observations on survival of pathogenic bacteria on cotton-wool swabs. **British Medical Journal**, v. 55, p. 983-987, 1951.

SATO, H.; TANABE, T.; KURAMOTO, M.; TANAKA, K.; HASHIMOTO, T.; SAITO, H. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* and its exfoliative activity in the piglet. **Veterinary Microbiology**, v. 27, p. 263-275, 1991.

SATO, H.; WATANABE, T.; HIGUCHI, K.; TERUYA, K.; OHTAKE, A.; MURATA, Y.; SAITO, H.; AIZAWA, C.; DANBARRA, H.; MAEHARA, N. Chromosomal and extrachromosomal synthesis of exfoliative toxin from *Staphylococcus hyicus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 4069-4100, 2000.

SHIMIZU, A.; OKADA, K.; KAWANO, J.; TERANISHI, H.; KIMURA, S.; SUGIHARA, K. Experimental *Staphylococcus hyicus* infection in piglets. **Science Reports of Faculty of Agriculture Kobe University**, v. 18, p. 207-212, 1989.

SILBERT, S.; CIRILO, L. F.; TOGNIM, M. C. B.; PEREIRA, A.; SADER, H. S. Avaliação de duas marcas de swab utilizadas para o transporte de bactérias em temperaturas ambiente e refrigerada. **NewsLab**, v. 67, p. 74-89, 2004.

SMITH, W. J.; TAYLOR, D. J.; PENNY, R. H. C. **A colour atlas of diseases and disorders of the pig**. London: Wolfe Publishing, p. 113-117, 1990.

SOBESTIANSKY, J.; SANTIN, A. P. I.; PÔRTO, R. N. G.; MORENO, A. M.; SOUZA, M. A.; BARCELLOS, D. E. S. N. Coleta de material para exames laboratoriais. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORENO, A. M.; SOBESTIANSKY, A.; POLEZE, E. **Suínos: coleta e remessa de material para laboratórios para fins de diagnóstico**. Goiânia: Gráfica Art 3, p. 47-52, 2005.

SOMPOLINSKY, D. De l'impetigo contagiosa suis et du *Micrococcus hyicus* n. sp.. **Scweiz Arch Tierheilkd**, v. 95, p. 302-309, 1953.

SPINOLA, J. **Die Krankheit der Schweine**. Berlin: Verlag Hirschwald, p. 146-148, 1842.

STUART, R. D.; TOSHACH, S. R.; PATSULA, T. M. The problem of transport of specimens for culture of gonococci. **Canadian Journal of Public Health**, v. 45, p. 73-83, 1954.

STUART, R. D. Transport medium for specimens in public health bacteriology. **Public Health Reports**, v. 74, n. 5, p. 431-438, 1959.

TANABE, T.; SATO, H.; KURAMOTO, M.; SAITO, H. Purification of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* and its antigenicity. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2973-2977, 1993.

TANABE, T.; SATO, H.; SATO, H.; WATANABE, K.; HIRANO, M.; HIROSE, K.; KUROKAWA, D.; NAKANO, K.; SAITO, H.; MAEHARA, N. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 48, p. 9-17, 1996.

THOMSON, R. B. J. R.; MILLER, J. M. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 286-330, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 934p, 2012.

WEGENER, H. C.; SKOV-JENSEN, E. W. A longitudinal study of *Staphylococcus hyicus* colonization of vagina of gilts and transmission to piglets. **Epidemiology and Infection**, v. 109, p. 433-444, 1992.

WEGENER, H. C.; ANDRESEN, L. O.; BILLE-HANSEN, V. *Staphylococcus hyicus* virulence in relation to exudative epidermitis in the piglet. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 119-125, 1993.

WEGENER, H. C.; SKOV-JENSEN, E. W. Exudative epidermitis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, p. 469-474, 1999.

WILSON, G. S.; MILES, A. **Principles of Bacteriology, Virology and Immunity**. London: Edward Arnold. 6. ed, p. 764-790, 1975.