

Herramientas disponibles para diagnosticar la infección por *Erysipelothrix rhusiopathiae*

■ Priscilla F. Gerber¹ y Tanja Opriessnig^{1,2*}

Imágenes cedidas por las autoras

► Resumen

Durante más de 135 años la bacteria grampositiva *Erysipelothrix* spp. se ha asociado con enfermedades clínicas en los cerdos. A pesar de disponer de medidas preventivas y antimicrobianos eficaces, a menudo el tratamiento es obstaculizado por enfoques diagnósticos inapropiados. Este artículo resume los conocimientos actuales sobre las herramientas de diagnóstico disponibles para confirmar la presencia de *Erysipelothrix rhusiopathiae* asociada con enfermedades en los cerdos.

Palabras clave: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, diagnóstico, enfermedades, cerdos

► Summary

Update on diagnostic tools for *Erysipelothrix rhusiopathiae* associated disease in pigs

The gram positive bacterium *Erysipelothrix* spp. has been associated with clinical disease in pigs for more than 135 years. Despite availability of effective preventive measures and antimicrobials, treatment is often hampered by inappropriate diagnostic approaches. This article summarizes current knowledge on diagnostic tools available for confirmation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* associated disease in pigs.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, diagnostic, disease, pigs

Contacto con las autoras: ¹The Roslin Institute and The Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Midlothian, UK. ²Veterinary Diagnostic Laboratory, Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, USA. *Email: Tanja.Opriessnig@roslin.ed.ac.uk

Los organismos del género *Erysipelothrix*, ampliamente distribuidos en la naturaleza, causan un amplio espectro de enfermedades en mamíferos, reptiles, anfibios, peces y aves, incluyendo la erisipela en cerdos y erisipeloide en personas (Brooke y Riley, 1999; Wang *et al.*, 2010). *Erysipelothrix* spp. se ha aislado a partir de diversos mamíferos y aves independientemente del estado de la enfermedad, y también de productos alimenticios tales como la carne de cerdo, pollo y mariscos (Fidalgo *et al.*, 2000; Nakazawa *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002). En humanos,

las infecciones con *Erysipelothrix* spp. suelen estar relacionadas con la exposición ocupacional a los animales y productos infectados. La erisipela porcina sigue siendo un importante motivo de decomiso de la canal en los mataderos (Opriessnig *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2008). El hospedador principal de *Erysipelothrix* spp. es el cerdo (Opriessnig y Wood, 2012), pero esta bacteria también causa pérdidas económicas en jabalíes, pavos, gallinas, emús, terneros, ovejas y corderos (Brooke y Riley, 1999). En la actualidad el género *Erysipelothrix* consta de dos especies principales, *E. rhu-*

siopathiae y *E. tonsillarum*, y dos especies menos frecuentemente aisladas, *Erysipelothrix* sp. cepa 1 y *Erysipelothrix* sp. cepa 2 (tabla 1) (Takahashi *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1999). Otras especies de *E. rhusiopathiae* se consideran de baja virulencia en los cerdos (Takahashi *et al.*, 2008) y se ha sugerido que *Erysipelothrix* sp. cepa 1 probablemente sea específica bovina (Hassanein *et al.*, 2001). Existen al menos 28 serotipos (1a, 1b-26 y N) reconocidos hasta la fecha (tabla 1). Entre los 15 serotipos de *E. rhusiopathiae*, los serotipos 1 (subdividido en serotipos 1a y 1b) y los serotipos 2 son los más impor-

Tabla 1. Especies de *Erysipelothrix*, serotipos asociados y tipos de antígeno de superficie (Spa).

Especies	Serotipos	tipo de Spa
<i>E. rhusiopathiae</i>	1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17, N	SpaA
	4, 6, 11, 19, 21	SpaB
<i>E. tonsillarum</i>	3, 7, 10, 14, 20, 22, 23, 24, 25, 26	-
Especies <i>E. cepa</i> 1	13	-
Especies <i>E. cepa</i> 2	18	SpaC

tantes en la producción mundial de porcino (Coutinho *et al.*, 2011; Opriessnig *et al.*, 2010; To *et al.*, 2012).

Debido a la importancia de la erisipela porcina, se utilizan ampliamente vacunas vivas atenuadas e inactivadas. Sin embargo, continúa habiendo pérdidas económicas (Bender *et al.*, 2009; Imada *et al.*, 2004; To *et al.*, 2012). La reciente introducción y la disponibilidad de nuevas pruebas con mayor sensibilidad analítica puede dar lugar a una mejor evaluación de la conformidad de la vacuna y la sensibilidad para el diagnóstico de las infecciones de *E. rhusiopathiae* antes de una posible exposición en el futuro.

SIGNOS CLÍNICOS

En cerdos se conocen tres presentaciones clínicas (Opriessnig y Wood, 2012). La forma aguda puede estar asociada a una elevada morbilidad y mortalidad en cuestión de días y se caracteriza por

una enfermedad repentina con fiebre, letargo, depresión, inapetencia, evitación del movimiento o paso torpe y/o muerte súbita a menudo asociada con lesiones cutáneas romboides (figura 1). Las cerdas gestantes con infección aguda pueden abortar. Esencialmente, la forma subaguda se asemeja a la forma aguda, pero los signos clínicos suelen ser menos graves. En los rebaños de cría se puede observar infertilidad, descarga vulvar pre y posparto y camadas pequeñas o con mayor número de lechones momificados. La erisipela subaguda también puede pasar inadvertida. La forma crónica puede acompañarse de infecciones agudas, subagudas o subclínicas y, a menudo se caracteriza por cojera debido al desarrollo de artritis, crecimiento reducido e insuficiencia cardíaca debido a lesiones proliferativas como endocarditis, a veces asociadas con la muerte súbita (Opriessnig y Wood, 2012).

DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN

En la tabla 2 se proporciona un resumen de los métodos de diagnóstico utilizados comúnmente. El diagnóstico de la erisipela se realiza principalmente por el cultivo y la identificación de *E. rhusiopathiae* a partir de tejidos basándose en el crecimiento y las características bioquímicas; sin embargo, los métodos son laboriosos y necesitan mucho tiempo. La serotipificación, aunque ahora rara vez se realiza, es la herramienta tradicional para la caracterización adicional de las cepas de *Erysipelothrix* spp. Los métodos actuales de cultivo bacteriológico requieren por lo menos 1-3 días para el aislamiento de esta bacteria y hasta ocho días para determinar su serotipo (Bender *et al.*, 2010). Recientemente, también hay disponibles métodos para mejorar el diagnóstico *ante mortem* de *E. rhusiopathiae* que incluyen el uso de fluidos orales para la detección de ácidos nucleicos bacterianos y anticuerpos anti-*Erysipelothrix* spp. (Giménez-Lirola *et al.*, 2013). En los últimos años ha aumentado la recolección de muestras de fluidos orales para fines de vigilancia y diagnóstico debido a la facilidad de este método de recolección y a la rentabilidad (Ramírez *et al.*, 2012). El uso de fluidos orales como muestra de diagnóstico para la infección por *Erysipelothrix rhusiopathiae* tal vez también podría proporcionar información sobre la eficacia de la vacunación.

Aislamiento bacteriano

Los miembros del género *Erysipelothrix* son no móviles, no esporulantes, no-ácido rápido, bacilos grampositivos delgados y anaerobios facultativos que crecen entre 5 y 44 °C, con un crecimiento óptimo entre los 30 y 37 °C (Brooke y Riley, 1999). Se utilizan comúnmente para el cultivo directo en agar de tripticosa de soja que contiene 5 % de sangre de oveja o placas de agar ácido nalidixico colistina con sangre de oveja al 5 % (CNA) (Bender *et al.*, 2009). En medios de agar, las colonias son claras, circulares y muy pequeñas (0,1-0,5 mm de diámetro) después de 24 horas de incubación a 37 °C (figura 2), con un aumento de tamaño después de 48 horas (Carter, 1990). La mayoría de las cepas inducen una estrecha zona de hemólisis parcial en agar sangre. El género *Erysipelothrix* es generalmente inactivo y no reacciona con catalasa, oxidasa, rojo de metilo o indol



Figura 1. Cerdo infectado experimentalmente con *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Presenta lesiones romboides multifocales o difusas en la piel.

Tabla 2. Herramientas de diagnóstico disponibles para demostrar la presencia de *Erysipelothrix* spp. y para caracterizar mejor la bacteria.

Aplicación	Herramientas diagnósticas	Comentarios
Detección de bacterias vivas	Aislamiento directo de bacterias	Laborioso y lento (>3 días)
		Permite el análisis de los antimicrobianos y aislar aún más la caracterización
		Baja sensibilidad
	Aislamiento indirecto de bacterias por enriquecimiento previo	Interferencia con tratamientos antimicrobianos previos
		Laborioso y lento (>3 días)
		Permite el análisis de los antimicrobianos y aislar aún más la caracterización
Detección de antígenos	Inmunohistoquímica	Especialmente útil en lesiones crónicas y piel
		Ninguna interferencia del tratamiento antimicrobiano previo con la detección
		Requiere disponibilidad de antisuero
Detección de ADN	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Sensible y rápido
		Requiere electroforesis
		Ninguna interferencia del tratamiento antimicrobiano previo con la detección
	PCR en tiempo real	Sensible y rápido
		No necesita electroforesis, más rápido en comparación con la PCR convencional
		Ninguna interferencia del tratamiento antimicrobiano previo con la detección
Amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP)	Requiere equipos sofisticados y técnicos de laboratorio con experiencia	
	Sensible y rápido	
	Rentable y sólo requiere equipo rudimentario	
Detección de anticuerpos	ELISA	Puede utilizarse para detectar y controlar la respuesta humoral en el tiempo
		Bajo coste
		Puede utilizarse para detectar y controlar la respuesta humoral en el tiempo
Otras caracterizaciones	Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	Bajo coste
		Puede utilizarse para detectar y controlar la respuesta humoral en el tiempo
		Posibilidad de multiplexación para la detección simultánea de anticuerpos frente a varios agentes patógenos
	Serotipado	Requiere la disponibilidad de un aislado
		Es capaz de diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo
		Lento (>3 días tras el aislamiento inicial)
Otras caracterizaciones	Serotipado	Requiere la disponibilidad de un aislado
		Lento (>3 días tras el aislamiento inicial)
		Requiere disponibilidad de antisuero contra todos los serotipos

(Cottral 1978), pero produce ácido y sulfuro de hidrógeno en agar triple azúcar-hierro (figura 3; Vickers y Bierer, 1958). El cultivo directo puede ser complicado debido a la contaminación de las muestras, las condiciones del tejido y el tratamiento antimicrobiano previo del cerdo.

Para dar cuenta de la baja sensibilidad del cultivo directo, se utilizan comúnmente caldos de enriquecimiento antes del aislamiento en placas de agar (Bender *et al.*, 2009). Un medio utilizado es el caldo selectivo de *Erysipelothrix*, un caldo infusión cerebro-corazón suplementado con suero. Se ha demostrado que el uso de esta etapa de enriquecimiento aumenta las tasas de aislamiento 9,5 veces en comparación con el cultivo directo en agar sangre (Bender *et al.*, 2009). La disponibilidad de los aislamientos permite al laboratorio llevar a cabo las sensibilidades antimicrobianas y una caracterización adicional de los aislamientos si así se desea.



Figura 2. Aspecto característico de una colonia de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en agar colistina-ácido nalidixico (CNA) después de 48 horas de incubación. Cortesía del Dr. J. Bender.



Figura 3. Producción de hidrógeno sulfuro por *Erysipelothrix rhusiopathiae* en agar triple azúcar-hierro. Cortesía del Dr. J. Bender.

ARTÍCULOS

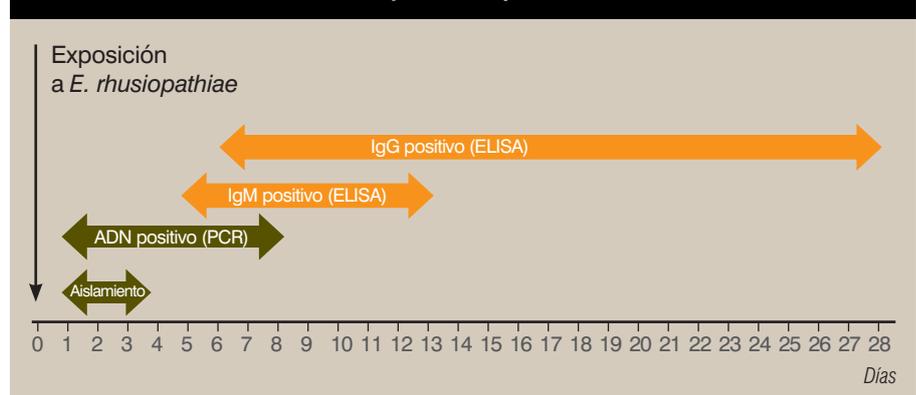
Técnica inmunohistoquímica

Para los laboratorios es común recibir tejidos de animales que han sido tratados previamente con agentes antimicrobianos. Estos pueden complicar el éxito del diagnóstico a la hora de demostrar la presencia de *Erysipelothrix* spp. En los casos de cultivo negativo donde se sospecha que *Erysipelothrix* es el agente causal, es muy útil la inmunohistoquímica (IHC) para detectar *E. rhusiopathiae* en el tejido fijado en formol incluido en parafina. Específicamente, la IHC también es beneficiosa para la detección de antígenos de *Erysipelothrix* en lesiones de la piel (figura 4), que son a menudo negativas al cultivo (Opriessnig *et al.*, 2010).

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza cada vez más en los laboratorios de diagnóstico veterinario (Makino *et al.*, 1994; Takeshi *et al.*, 1999; Yamazaki, 2006). Aunque los ensayos de PCR proporcionan una identificación más rápida y sensible de *Erysipelothrix* spp. (figura 5), la PCR convencional que requiere el uso de electroforesis para detectar el producto amplificado debe distinguirse de la PCR en tiempo real que permite la amplificación simultánea y la detección del objetivo dentro del tubo cerrado, eliminando así los posi-

Figura 5. Detección esperada de *Erysipelothrix rhusiopathiae* de fluido oral por diferentes métodos desde el día 1 hasta el día 28 después de la infección experimental. Los datos representan los valores medios de siete corrales y se han adaptado de Giménez-Lirola *et al.*, 2013.



bles problemas de contaminación por la amplificación posterior de los métodos de aislamiento y reduciendo el tiempo del proceso (Makino *et al.*, 1994; Pal *et al.*, 2009; Shimoji *et al.*, 1998; Takeshi *et al.*, 1999; Yamazaki, 2006). La PCR en tiempo real tiene el beneficio adicional de que se pueden detectar varios objetivos de forma simultánea en las llamadas reacciones multiplex. Mediante el uso de este método se ha logrado la identificación y la diferenciación de diferentes especies de *Erysipelothrix* en una sola reacción (*E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, y *E. sp. cepa 1*) (Pal *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha descrito un ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección de *E. rhusiopathiae* (Yamazaki *et al.*, 2014). El LAMP tiene la principal ventaja de ser más barato y requiere menos instrumentación para lograr la amplificación en comparación con la PCR en tiempo real. Esto es debido principalmente a la amplificación isotérmica del ácido nucleico a una temperatura constante de 60-65 °C que se puede lograr mediante el uso de un simple bloque de calor sin necesidad de un caro termociclador capaz de alternar los pasos de temperatura. La reacción puede evaluarse a simple vista a través de tintes fluorescentes que se intercalan o directamente etiquetan ADN facilitando su uso en laboratorios con recursos limitados o incluso directamente en el campo (Boonham *et al.*, 2014). Además, generalmente el LAMP se considera de sensibilidad similar y es comparable con la PCR en tiempo real. Se están utilizando de cuatro a seis *primers* que reconocen entre seis y ocho regiones de la secuencia de ADN objetivo (Boonham *et al.*, 2014). Aunque el LAMP para *Erysipelothrix* (Yamazaki *et al.*, 2013) ha demostrado una gran sensibilidad en el crecimiento de *E. rhusiopathiae* en caldos de cultivo enriquecidos, debe realizarse una evaluación adicional en muestras de campo para facilitar el uso de este método.

Aplicaciones serológicas

La evaluación de la respuesta inmunitaria humoral frente a *E. rhusiopathiae* puede ser importante para determinar la situación del hato, y para cumplir el

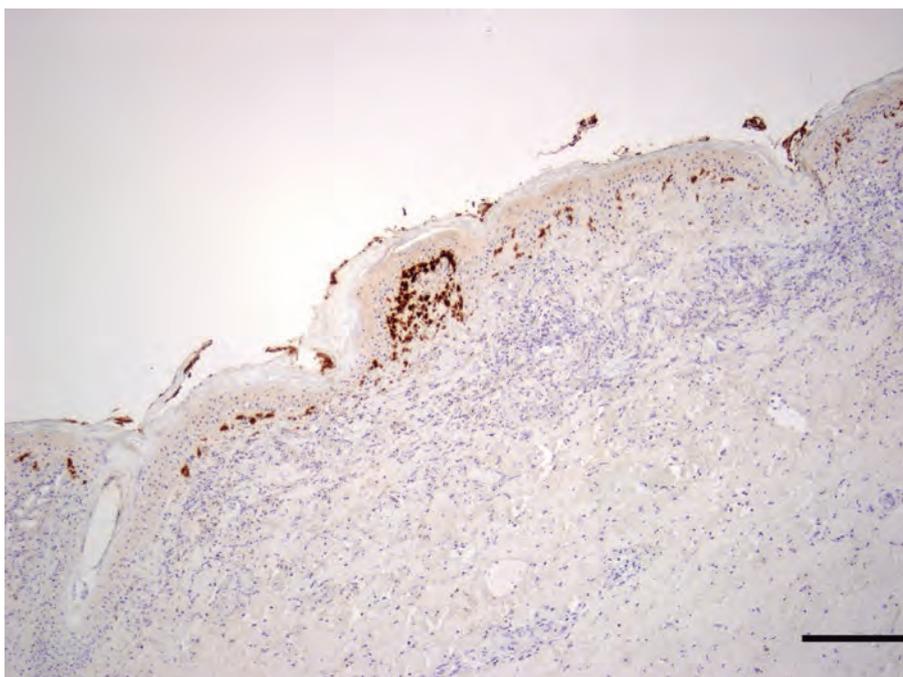


Figura 4. Piel de cerdo. La tinción inmunohistoquímica con un antisuero policlonal frente a *Erysipelothrix rhusiopathiae* revela tanto bacterias como abundantes organismos (tinción oscura) en la dermis. Complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa método de contraste con hematoxilina.

programa vacunal. Se han descrito varios ensayos en nuestras propias instalaciones y test comerciales ELISA para la detección de anticuerpos anti-*E. rhusiopathiae*. Generalmente, estos ensayos tienen un formato simple y la capacidad de analizar un gran número de muestras en un periodo de tiempo corto con la determinación objetiva de los resultados (Chin *et al.*, 1992; Imada *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 1998).

Recientemente, se ha desarrollado un inmunoensayo de fluorescencia con microesferas multiplex (FMIA) para la detección de suero e IgG anti-*E. rhusiopathiae* (figura 5). El FMIA ha demostrado tener una mayor sensibilidad para la detección temprana en comparación con las pruebas disponibles en nuestras instalaciones y los ELISA comerciales (Giménez-Lirola *et al.*, 2012; Giménez-Lirola *et al.*, 2013). Cada vez se están utilizando más FMIA en la serología veterinaria (Anderson *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Gundersen *et al.*, 1992; Lawson *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2011). La prueba es similar a un ELISA indirecto, con la diferencia de que el antígeno está acoplado a partículas paramagnéticas con un código de color que queda en una matriz de suspensión líquida en lugar de ser recubierto en una superficie lineal. Esta matriz de partículas permite procedimientos de lavado muy exigentes, que pueden reducir significativamente los problemas de fondo y la multiplexación de hasta 500 analitos en una sola prueba. Después de finalizar las incubaciones con un reactivo de detección, las partículas se separaron dentro de un citómetro de flujo con dos láseres o LED, uno para clasificar la identidad de la partícula (región) y otro para cuantificar la unión fluoróforo reportada (Boonham *et al.*, 2014).

Caracterización de los aislamientos de *Erysipelothrix* spp.

Los métodos de diferenciación de *Erysipelothrix* en los aislamientos de campo pueden proporcionar información útil a los propietarios de cerdos y veterinarios durante situaciones de brote de erisipela (Imada *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2004). La herramienta más común para la caracterización de aislamientos de *E. rhusiopathiae* es a través de serotipificación mediante el uso de un gel de inmunodifusión en gel de agar con

el tipo específico de antisueros de conejo y recuperación de antígeno por extracción acuosa en caliente (Kucsera, 1973) (figura 6). En los cerdos, el 75-80 % de los aislamientos se clasifican como serotipo 1 o 2 (Wang *et al.*, 2010). Históricamente se ha determinado que el serotipo 1 está presente de forma habitual en los casos agudos, mientras que el serotipo 2 es más frecuente en los cerdos afectados crónicamente (Opriessnig y Wood, 2012). Sin embargo, se han demostrado resultados contradictorios en la patogenicidad con diferentes aislados del mismo serotipo (Wang *et al.*, 2010). Para clasificar en especies los aislamientos de *Erysipelothrix* se aplican varios métodos de tipificación molecular. En la actualidad se conocen *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. sp.* cepa 1, y *E. sp.* cepa 2 (tabla 1) (Coutinho *et al.*, 2011; Dunbar y Clarridge, III, 2000; Imada *et al.*, 2004; Okatani *et al.*, 2000; Opriessnig *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 1992). Cuando las cepas de *Erysipelothrix* se analizaron mediante polimorfismos de longitud de

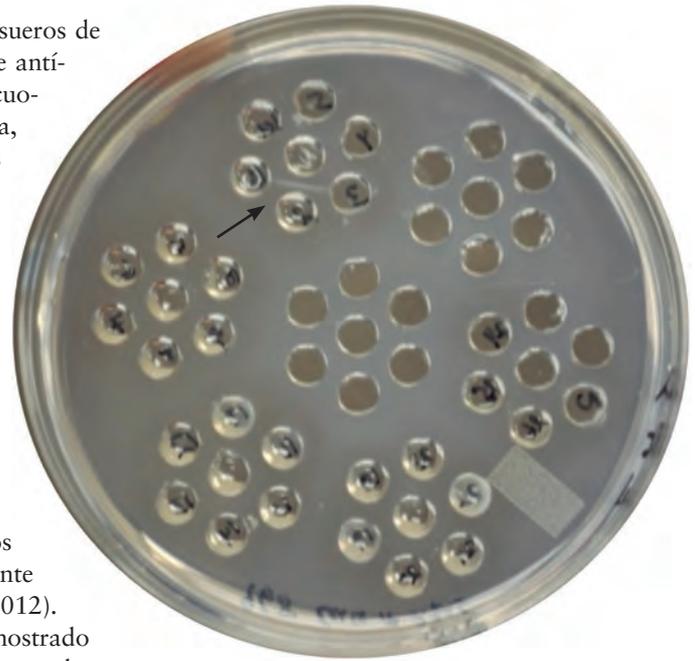


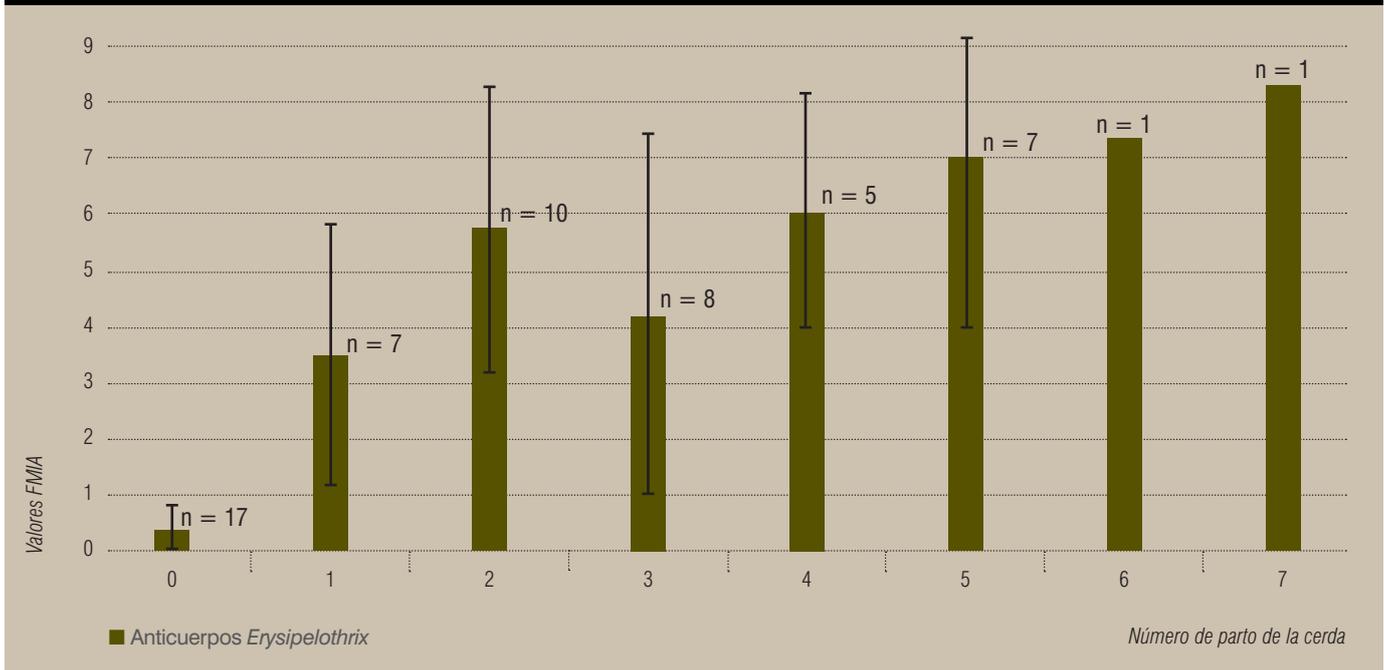
Figura 6. Placa típica para determinar el serotipo de *Erysipelothrix* spp. Los antígenos se colocan en los pocillos centrales y los antisueros en los que los rodean. La flecha indica una línea de precipitación entre un antisuero y el antígeno utilizado.

fragmentos de restricción (RFLP), tanto en *E. tonsillarum* y *E. rhusiopathiae* contenían cepas de serotipo 2 (virulenta) y 7 (avirulenta) (Imada *et al.*, 2004), lo que sugiere que no hay relación directa entre el serotipo y la virulencia (Takahashi *et al.*, 1992).

► Discusión

Erysipelothrix sp. es importante en la producción porcina. Con los intentos para reducir o incluso eliminar el uso de antimicrobianos en los animales de producción, probablemente los enfoques preventivos ganan importancia y por lo tanto, es posible que en un futuro aumente el monitoreo de las infecciones por *Erysipelothrix* spp. en las poblaciones (figura 7). Es importante que los profesionales del laboratorio, veterinarios y propietarios de cerdos evalúen cuidadosamente qué prueba deberá indicar la respuesta que están buscando y también tener en cuenta las limitaciones de cada una de ellas. Por ejemplo, la detección de anticuerpos frente a *Erysipelothrix* spp. podría indicar anticuerpos adquiridos pasivamente, anticuerpos en respuesta a una vacunación previa, una infección previa o una infección aguda/subaguda. Sólo puede evaluarse con el uso de pruebas complementarias adecuadas. Además, en los casos de brotes clínicos de otros patógenos que pueden inducir lesiones similares también es necesario incluir el virus de la peste porcina clásica y bacterias capaces de causar enfermedad sistémica como *Actinobacillus* sp. y otras. La secuenciación, una herramienta común para caracterizar los virus que no se utiliza de rutina para *Erysipelothrix* spp., probablemente gane importancia en el futuro debido a una disminución sustancial del coste y tiempo de obtención de resultados.

Figura 7. Análisis transversal de los niveles de anticuerpos *Erysipelothrix* en un rebaño de reproductoras, vacunadas según lo determinado por un inmunoensayo de fluorescencia con microesferas multiplex (FMIA).



Aunque se utilizan varios métodos de biología molecular para diferenciar especies del género *Erysipelothrix*, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se considera el “estándar de oro” entre los métodos actuales de tipificación basados en el ADN (Opriessnig *et al.*, 2004; To *et al.*, 2012). Recientemente, se ha desarrollado un nuevo método de caracterización de las cepas basándose en la secuencia de nucleótidos de una región hipervariable en la superficie de protección (Spa) gen A para discriminar la cepa de vacuna viva de los aislamientos de campo (Nagai *et al.*,

2008). Se investiga la prevalencia de Spa entre las cepas aisladas a partir de tejidos de campo para determinar el papel de las proteínas Spa en la protección de la vacuna y la patogénesis. Hoy en día, el antígeno Spa, que se puede dividir en SpaA, SpaB1, SpaB2 y SpaC (Shen *et al.*, 2010), es una de las mejores proteínas de superficie caracterizadas de *Erysipelothrix* spp. y se asocia con la protección frente a la enfermedad clínica (Ingebritson *et al.*, 2010; To *et al.*, 2010). Las proteínas Spa se asocian con ciertos serotipos (tabla 1) (To y Nagai, 2007). Por el contrario, se encontraron cepas

de *E. tonsillarum* que no contenían ningún tipo detectable de Spa (Shen *et al.*, 2010; To y Nagai, 2007).

Para determinar el tipo Spa de *Erysipelothrix* spp. se reportan algunos métodos, que incluyen SDS-PAGE y Western Blotting (Imada *et al.*, 1999; Makino *et al.*, 1998; Shimoji *et al.*, 1999; To y Nagai, 2007) y la PCR convencional y en tiempo real para SpaA, SpaB y SpaC (Ingebritson *et al.*, 2010). El uso de PCR multiplex en tiempo real tiene la ventaja de proporcionar un método rápido, sensible y de alta capacidad de procesamiento para la detección de Spa (Shen *et al.*, 2010).

BIBLIOGRAFÍA

Anderson S., Wakeley P., Wibberley G., Webster K., Sawyer J., 2011. Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection methods. *J Immunol Methods* 366, 79-88.

Bender J.S., Kinyon J.M., Kariyawasam S., Halbur P.G., Opriessnig T., 2009. Comparison of conventional direct and enrichment culture methods for *Erysipelothrix* spp. from experimentally and naturally infected swine. *J Vet Diagn Invest* 21, 863-868.

Bender J.S., Shen H.G., Irwin C.K., Schwartz K.J., Opriessnig T., 2010. Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environ-

mental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 17, 1605-1611.

Boonham N., Kreuze J., Winter S., van d. V., Bergervoet J., Tomlinson J., Mumford R., 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res* 186, 20-31.

Brooke C.J., Riley T.V., 1999. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol* 48, 789-799.

Carter GR. 1990. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In: Cole, J. R. (ed.), *Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology and Mycology*, 5th ed. Academic Press, Springfield, Illinois, 195-196.

Chen T.H., Lee F., Lin Y.L., Pan C.H., Shih C.N., Lee M.C., Tsai H.J., 2013. Development of a Luminex assay for the detection of swine antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Immunol Methods* 396, 87-95.

Chin J.C., Turner B., Eamens G.J., 1992. Serological assay for swine erysipelas using nitrocellulose particles impregnated with an immunodominant 65 kDa antigen from *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol* 31, 169-180.

Cottral GE. 1978. *Erysipelothrix*. In: *Manual of standardized methods for veterinary microbiology*, Cornell University Press, Ithaca, NY. 429-436.

Coutinho T.A., Imada Y., Barcellos D.E., Oliveira S.J., Moreno A.M., 2011. Phenotypic and molecular characterization of recent and archived *Erysipelothrix* spp.

- isolated from Brazilian swine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69, 123-129.
- Dunbar S.A., Clarridge J.E., III, 2000. Potential errors in recognition of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J Clin Microbiol* 38, 1302-1304.
- Fidalgo S.G., Wang Q., Riley T.V., 2000. Comparison of methods for detection of *Erysipelothrix* spp. and their distribution in some Australian seafoods. *Appl Environ Microbiol* 66, 2066-2070.
- Giménez-Lirola L.G., Xiao C.T., Halbur P.G., Opriessnig T., 2012. Development of a novel fluorescent microbead-based immunoassay and comparison with three enzyme-linked immunoassays for detection of anti-*Erysipelothrix* spp. IgG antibodies in pigs with known and unknown exposure. *J Microbiol Methods* 91, 73-79.
- Giménez-Lirola L.G., Xiao C.T., Zavala M., Halbur P.G., Opriessnig T., 2013. Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. *J Microbiol Methods* 92, 113-121.
- Gundersen S.G., Haagensen I., Jonassen T.O., Figenschau K.J., de J.N., Deelder A.M., 1992. Magnetic bead antigen capture enzyme-linked immunoassay in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. *J Immunol Methods* 148, 1-8.
- Hassanein R., Sawada T., Kataoka Y., Itoh K., Suzuki Y., 2001. Serovars of *Erysipelothrix* species isolated from the tonsils of healthy cattle in Japan. *Vet Microbiol* 82, 97-100.
- Imada Y., Goji N., Ishikawa H., Kishima M., Sekizaki T., 1999. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infect Immun* 67, 4376-4382.
- Imada Y., Mori Y., Daizoh M., Kudoh K., Sakano T., 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay employing a recombinant antigen for detection of protective antibody against swine erysipelas. *J Clin Microbiol* 41, 5015-5021.
- Imada Y., Takase A., Kikuma R., Iwamaru Y., Akachi S., Hayakawa Y., 2004. Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. *J Clin Microbiol* 42, 2121-2126.
- Ingebritson A.L., Roth J.A., Hauer P.J., 2010. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. *Vaccine* 28, 2490-2496.
- Kucsera G., 1973. Proposal for standardization of designations used for serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Migula) Buchanan. *Int J System Bacteriol* 23, 184-188.
- Lawson S., Lunney J., Zuckermann F., Osorio F., Nelson E., Welbon C., Clement T., Fang Y., Wong S., Kulas K., Christopher-Hennings J., 2010. Development of an 8-plex Luminex assay to detect swine cytokines for vaccine development: assessment of immunity after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccination. *Vaccine* 28, 5356-5364.
- Makino S., Okada Y., Maruyama T., Ishikawa K., Takahashi T., Nakamura M., Ezaki T., Morita H., 1994. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. *J Clin Microbiol* 32, 1526-1531.
- Makino S., Yamamoto K., Murakami S., Shirahata T., Uemura K., Sawada T., Wakamoto H., Morita H., 1998. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microbiol Pathogenesis* 25, 101-109.
- Nagai S., To H., Kanda A., 2008. Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains by nucleotide sequence analysis of a hypervariable region in the spaA gene: discrimination of a live vaccine strain from field isolates. *J Vet Diagn Invest* 20, 336-342.
- Nakazawa H., Hayashidani H., Higashi J., Kaneko K., Takahashi T., Ogawa M., 1998. Occurrence of *Erysipelothrix* spp. in chicken meat parts from a processing plant. *J Food Prot.* 61, 1207-1209.
- Okatani A.T., Hayashidani H., Takahashi T., Taniguchi T., Ogawa M., Kaneko K.I., 2000. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Erysipelothrix* spp. *J Clin Microbiol* 38, 4332-4336.
- Opriessnig T., Bender J.S., Halbur P.G., 2010. Development and validation of an immunohistochemical method for rapid diagnosis of swine erysipelas in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. *J Vet Diagn Invest* 22, 86-90.
- Opriessnig T., Hoffman L.J., Harris D.L., Gaul S.B., Halbur P.G., 2004. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. *J Vet Diagn Invest* 16, 101-107.
- Opriessnig T., Wood R.L., 2012. Chapter 54: Erysipelas. In: *Diseases of Swine*. 10th Edition. Editors: Zimmerman J.J., Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. John Wiley & Sons, Inc. 10:750-759.
- Pal N., Bender J.S., Opriessnig T., 2009. Rapid detection and differentiation of *Erysipelothrix* spp. by a novel multiplex real-time PCR assay. *J Appl Microbiol* 108, 1083-1093.
- Ramírez A., Wang C., Prickett J.R., Pogranichny R., Yoon K.J., Main R., Johnson J.K., Rademacher C., Hoogland M., Hoffmann P., Kurtz A., Kurtz E., Zimmerman J., 2012. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 104, 292-300.
- Sato H., Yamazaki Y., Tsuchiya K., Aoyama T., Akaba N., Suzuki T., Yokoyama A., Saito H., Maehara N., 1998. Use of the protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in the enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination. *Zentralbl Veterinarmed B* 45, 407-420.
- Shen H.G., Bender J.S., Opriessnig T., 2010. Identification of surface protective antigen (spa) types in *Erysipelothrix* reference strains and diagnostic samples by spa multiplex real-time and conventional PCR assays. *J Appl Microbiol* 109, 1227-1233.
- Shimoji Y., Mori Y., Fischetti V.A., 1999. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity. *Infect Immun* 67, 1646-1651.
- Shimoji Y., Mori Y., Hyakutake K., Sekizaki T., Yokomizo Y., 1998. Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. *J Clin Microbiol* 36, 86-89.
- Takahashi T., Fujisawa T., Tamura Y., Suzuki S., Muramatsu M., Sawada T., Benno Y., Mitsuoka T., 1992. DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. *Int J Sys Bact* 42, 469-473.
- Takahashi T., Fujisawa T., Umeno A., Kozasa T., Yamamoto K., Sawada T., 2008. A taxonomic study on *Erysipelothrix* by DNA-DNA hybridization experiments with numerous strains isolated from extensive origins. *Microbiol Immunol* 52, 469-478.
- Takahashi T., Sunama P., Satra J., Cholsindhu N., Kongthon S., Jitnupong W., Yamamoto K., Kijima M., Furuuchi S., 1999. Serotyping and pathogenicity of *Erysipelothrix* strains isolated from tonsils of slaughter pigs in Thailand. *J Vet Med Sci* 61, 1007-1011.
- Takeshi K., Makino S., Ikeda T., Takada N., Nakashiro A., Nakanishi K., Oguma K., Katoh Y., Sunagawa H., Ohyama T., 1999. Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. *J Clin Microbiol* 37, 4093-4098.
- To H., Nagai S., 2007. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clin Vaccine Immunol* 14, 813-820.
- To H., Sato H., Tazumi A., Tsutsumi N., Nagai S., Iwata A., Nagano T., 2012. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan. *J Vet Med Sci* 74, 949-953.
- To H., Someno S., Nagai S., Koyama T., Nagano T., 2010. Immunization with truncated recombinant protein SpaC of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain 715 serovar 18 confers protective immunity against challenge with various serovars. *Clin Vaccine Immunol* 17, 1991-1997.
- Vickers C.L., Bierer B.W. 1958. Triple sugar iron agar as an aid in the diagnosis of erysipelas. *J Am Vet Med Assoc* 133:543-544.
- Wagner B., Freer H., Rollins A., Erb H.N., 2011. A fluorescent bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies to *B. burgdorferi* outer surface proteins in canine serum. *Vet Immunol Immunopathol* 140, 190-198.
- Wang Q., Chang B.J., Riley T.V., 2010. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol* 140, 405-417.
- Wang Q., Fidalgo S., Chang B.J., Mee B.J., Riley T.V., 2002. The detection and recovery of *Erysipelothrix* spp. in meat and abattoir samples in Western Australia. *J Appl Microbiol* 92, 844-850.
- Yamazaki Y., 2006. A multiplex polymerase chain reaction for discriminating *Erysipelothrix rhusiopathiae* from *Erysipelothrix tonsillarum*. *J Vet Diagn Invest* 18, 384-387.
- Yamazaki Y., Oba E., Kashiwagi N., Sugita K., Shiiba K., Baba Y., Shimoji Y., Yamazaki W., 2014. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Lett Appl Microbiol* 58, 362-369.