

## Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína

### Current aspects of pathogenesis and diagnosis of porcine pleuropneumonia

Clarissa Silveira Luiz Vaz<sup>1</sup> Sérgio Ceroni da Silva<sup>2</sup>

#### - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

#### RESUMO

A pleuropneumonia suína, causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, é uma doença caracterizada pela apresentação fibrino-hemorrágica com pleurite adesiva. A enfermidade está presente em todos os países produtores de suínos, sendo responsável por prejuízos econômicos elevados. No Brasil e no mundo, diversos grupos vêm conduzindo estudos na busca por um melhor entendimento da doença e de sua epidemiologia. Avanços importantes foram obtidos, entre os quais a caracterização dos fatores de virulência, implicados na apresentação clínica da enfermidade; e a aplicação de novos métodos de diagnóstico. A difusão das técnicas de biologia molecular como ferramenta diagnóstica em Medicina Veterinária tem contribuindo para a identificação de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Nesta revisão, são abordados os aspectos mais recentes sobre a patogênese e o diagnóstico deste importante patógeno.

**Palavras-chave:** pleuropneumonia suína, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, diagnóstico, PCR.

#### ABSTRACT

Porcine pleuropneumonia is a highly contagious disease caused by the bacterium *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a pathogen responsible for substantial losses worldwide to the pig industry. The disease is characterized by fibrinous pleuritis with hemorrhagic and necrotic lesions in the lungs, and pleural adhesions. Specific and precise methods for the identification of this pathogen are still required. In the present article we review the pathogenesis, as the traditional and the recently developed molecular methods employed for the identification and characterization of *A. pleuropneumoniae*.

**Key words:** porcine pleuropneumonia, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, diagnosis, PCR

#### INTRODUÇÃO

A pleuropneumonia suína, cujo agente etiológico é o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, caracteriza-se pelo desenvolvimento de broncopneumonia necrosante e hemorrágica, com exsudação de fibrina, causando pleurite. A apresentação severa e, muitas vezes, fatal determina prejuízos à indústria suinícola (MORES et al., 1984; FENWICK & HENRY, 1994; DESROSIERS, 1998). A correta identificação do patógeno é necessária à adoção de métodos de controle e profilaxia. Neste sentido, novos métodos de diagnóstico vêm sendo empregados junto às técnicas tradicionais, dando mais precisão e rapidez ao resultado. Nos últimos anos, diversos estudos vêm sendo conduzidos, buscando um melhor entendimento da doença e do patógeno. O presente artigo tem por objetivo revisar os aspectos mais recentes sobre a patogênese e identificação de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

#### A pleuropneumonia suína

As pneumonias determinam elevados prejuízos à suinocultura comercial, sendo a ocorrência favorecida pelo sistema de produção, tipicamente intensivo. No período de 1999 a 2001, a prevalência de pneumonia em suínos abatidos no Brasil foi de 75,70% (SILVA et al., 2001). Dentre as pneumonias bacterianas, a pleuropneumonia suína é uma das mais importantes em todo o mundo. A prevalência do agente etiológico no Brasil foi de 42,86% (MORENO et al., 2001), determinada através da inibição da hemolisina. É

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup>Médico Veterinário, Faculdade de Veterinária, PPGCV e Centro de Biotecnologia, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, 91501-970, Porto Alegre. E-mail: ceroni@dna.cbiot.ufrgs.br. Autor para correspondência.

provável que este número seja maior, uma vez que a técnica utilizada não detecta todos os sorotipos. Na avaliação de um surto da doença, PROTAS et al. (1985) demonstraram um aumento de 38% nas despesas devido ao tratamento e perda de animais, comparado ao período anterior ao surto. Pleurite e hepatização pulmonar, decorrentes da infecção, afetando mais de 10% do parênquima, reduzem 14,7% o desenvolvimento do suíno infectado (PIFFER et al., 1985).

Suínos de todas as idades podem ser acometidos, contudo leitões em crescimento pertencentes a rebanhos cronicamente infectados são os mais vulneráveis e severamente afetados (STEVENSON, 1998; TAYLOR, 1999). Em um surto típico da enfermidade, ocasionado por uma cepa virulenta, a morbidade pode exceder a 50%, com índices de mortalidade variando entre 1 a 10% (FENWICK & HENRY, 1994).

O início da doença geralmente é repentino, sendo que alguns animais podem morrer sem demonstrar sinais clínicos. Estes se caracterizam, na enfermidade superaguda, por temperatura corporal em torno de 41°C, letargia, dispnéia e cianose, além da presença de exsudato espumoso e hemorrágico nas narinas e boca. A forma aguda cursa com aumento de temperatura e insuficiência cardíaca, com marcada perda de condições dos animais após 24 horas do início da enfermidade. Os animais apresentam dispnéia e anorexia, e a doença pode evoluir para a morte. Após a resolução da fase aguda, é possível o desenvolvimento da forma subaguda ou crônica, cujos sinais clínicos são mais brandos. Os animais apresentam diminuição da taxa de ganho de peso e as lesões pulmonares produzem cicatrizes, provocando retardo no crescimento (STEVENSON, 1998; TAYLOR, 1999).

As principais lesões são encontradas na cavidade torácica, envolvendo pulmões, pleura e pericárdio. Na apresentação aguda, a pleuropneumonia suína cursa com lesões fibrino-hemorrágicas no pulmão, enquanto a presença de nódulos no parênquima pulmonar e aderência da pleura à área necrótica caracterizam a forma crônica (MORES et al., 1984). Brônquios e traquéia apresentam grande quantidade de exsudato espumoso avermelhado (DIDIER et al., 1984). Em muitos casos, as lesões pulmonares consolidam-se, permanecendo somente o foco de pleurite, cuja alta prevalência ao abate sugere pleuropneumonia (TAYLOR, 1999). Isso ocorre especialmente em lesões crônicas. A presença de broncopneumonia purulenta costuma ser um indicativo de infecção bacteriana secundária (STEVENSON,

1998).

Os animais que sobrevivem às infecções agudas ou que estão infectados de forma subclínica tornam-se portadores de *A. pleuropneumoniae*, o qual permanece nas lesões pulmonares ou nas tonsilas, podendo, com menos frequência, ser encontrado na cavidade nasal (KUME et al., 1984; BRANDRETH & SMITH, 1987). Posteriormente à infecção aguda, pode estabelecer-se um caráter crônico e enzoótico da enfermidade, cuja baixa e constante exposição induzem imunidade ao rebanho, restringindo uma nova infecção (FENWICK & HENRY, 1994). A introdução de um novo sorotipo de *A. pleuropneumoniae* em rebanhos cronicamente infectados normalmente resulta em baixa morbidade (NIELSEN, 1988).

Os sinais clínicos podem ser exacerbados por infecções anteriores ou concomitantes, geralmente causadas por *Mycoplasma spp*, *Salmonella spp*, *Pasteurella spp*, vírus da PRRS e vírus da Doença de Aujeszky (FENWICK & HENRY, 1994; TAYLOR, 1999). *Pasteurella multocida* foi isolada concomitantemente a *A. pleuropneumoniae* em 94% das infecções mistas encontradas por DIDIER et al. (1984). Outros agentes secundários foram identificados como *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus spp*, *Salmonella choleraesuis* e *Mycoplasma spp*.

### Etiologia

O agente, inicialmente caracterizado como pertencente ao gênero *Haemophilus* (SHOPE, 1964), foi transferido ao gênero *Actinobacillus* pela demonstração de sua estreita relação com a espécie *Actinobacillus lignieresii*, através de estudos de homologia de DNA (POHL et al., 1983). *A. pleuropneumoniae* é um patógeno bacteriano específico de suínos, os quais são hospedeiros específicos, possivelmente pela capacidade de obter ferro apenas da transferrina suína (INZANA, 1991).

As espécies do gênero *Actinobacillus* são pequenos bacilos gram-negativos, imóveis, aeróbicos, facultativamente anaeróbicos e fermentadores de glicídeos. *A. pleuropneumoniae* é um cocobacilo hemolítico (BIBERSTEIN et al., 1977; INZANA, 1991) que se apresenta em cultura como colônias mucóides e iridescentes. As cepas virulentas são capsuladas e se multiplicam em meios acrescidos de NAD (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) (FENWICK & HENRY, 1994).

*A. pleuropneumoniae* apresenta 2 biotipos, diferenciados pela necessidade de NAD para sua multiplicação. O biotipo 1 é NAD-dependente, enquanto as linhagens NAD-independentes são

descritas como biotipo 2, também consideradas menos patogênicas, porém capazes de induzir enfermidade superaguda e morte (DOM & HAESEBROUCK; 1992). São descritos 15 sorotipos, baseados nas diferenças dos antígenos capsulares, sendo os sorotipos 13 e 14 pertencentes ao biotipo 2, e os demais ao biotipo 1 (BLACKALL et al., 2002). Os sorotipos 1 e 5 são subdivididos em a e b (NIELSEN 1986; JOLIE et al., 1994). Todos são potencialmente patogênicos, diferindo quanto a sua virulência (HAESEBROUCK et al., 1997).

O antígeno O dos lipopolissacarídeos apresenta similaridade estrutural em determinados sorotipos, sendo responsável por reações cruzadas entre os sorotipos 1, 9 e 11, entre os sorotipos 3, 6 e 8 e entre os sorotipos 4 e 7 (INZANA & MATHISON, 1987; PERRY et al., 1990). O conhecimento do sorotipo de *A. pleuropneumoniae* prevalente numa determinada região auxilia os estudos de epidemiologia, profilaxia e seleção do teste sorológico sorotipo-específico a ser empregado. A sorotipificação do patógeno é importante por confirmar o prévio diagnóstico microbiológico (NIELSEN, 1988; TAYLOR, 1999) e para o adequado emprego de vacinas, as quais são sorotipo-específicas (MITTAL et al., 1993).

A sorotipificação é normalmente realizada pelas técnicas de soro-aglutinação ou teste de coaglutinação, e o resultado pode ser confirmado através dos testes de difusão em gel de agarose ou hemaglutinação indireta. Estes últimos são geralmente empregados para a identificação final, no caso da ocorrência de isolados não sorotipificáveis (NICOLET, 1988; GUTIERREZ et al., 1993; FENWICK & HENRY, 1994; TAYLOR, 1999). Todos os métodos são eficientes, porém não excluem a ocorrência das reações cruzadas entre os sorotipos relacionados (MITTAL et al., 1993; MOLNÁR & MOLNÁR, 1994). PIFFER et al. (1987) relatam a ocorrência de amostras auto-aglutinantes, o que impede a sorotipificação, sendo a ocorrência de cepas não sorotipificáveis bastante freqüente (FENWICK & HENRY, 1994).

### Epidemiologia

A transmissão do patógeno ocorre principalmente por meio de contato direto com exsudatos respiratórios (STEVENSON, 1998), sendo também possível através de aerossol a curtas distâncias. *A. pleuropneumoniae* permanece viável por alguns dias no ambiente se estiver protegido por muco ou outro tipo de material orgânico, sugerindo-se a transmissão através de fômites. Os suínos portadores constituem o meio mais freqüente de disseminação ao serem introduzidos em rebanhos sem

exposição prévia à enfermidade (FENWICK & HENRY, 1994; TAYLOR, 1999). O desenvolvimento da doença clínica depende de vários fatores, desde a virulência do agente, o número de organismos presentes no ambiente; e a suscetibilidade imunológica dos animais, incluindo as condições do confinamento (FENWICK & HENRY, 1994).

A distribuição dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* difere entre regiões (NIELSEN, 1988) e a importância epidemiológica dos sorotipos pode divergir entre países, pois algumas cepas mostram-se com baixa virulência em determinados continentes, podendo ser epidêmicas em outros (TAYLOR, 1999). No Brasil, os sorotipos 3, 5 e 7 são os mais prevalentes, já tendo sido identificados os sorotipos 1, 4, 9 e 12 (PIFFER et al., 2001b). A enfermidade foi relatada pela primeira vez no país no ano de 1981, sendo registrados vários surtos desde então. É possível que o agente tenha sido introduzido através da importação de suínos portadores, ou que já estivesse presente no rebanho brasileiro, surgindo pelas condições de confinamento da criação (PIFFER et al., 1987).

### Fatores de virulência

A virulência entre os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* é variável, porém todos são capazes de induzir a doença em suínos (HAESEBROUCK et al., 1997). As linhagens mais virulentas, se inoculados  $10^2$  microorganismos, podem desencadear a enfermidade com alta morbidade e mortalidade (STEVENSON, 1998). Particularmente, os sorotipos 1, 5, 9 e 11 estão envolvidos nos surtos mais severos da doença, quando se associa alta mortalidade. Os sorotipos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 e 12, ainda que produzam lesões pulmonares semelhantes aos demais sorotipos, são geralmente menos virulentos e causam índices mais baixos de mortalidade (TAYLOR, 1999). Embora o sorotipo 3 seja considerado de baixa virulência, no Brasil vem sendo isolado de lesões típicas de casos clínicos de pleuropneumonia suína (PIFFER et al., 1997).

### Exotoxinas

*A. pleuropneumoniae* produz *in vivo* e *in vitro* as toxinas ApxI, ApxII e ApxIII, codificadas pelo gene *apxA* que está organizado em um operon que inclui os genes *C*, *A*, *B* e *D*. O produto do gene *C* está envolvido na ativação da toxina, o gene *A* codifica para a toxina, enquanto os genes *B* e *D* codificam para proteínas envolvidas na secreção do produto (JANSEN et al., 1995b). Mais recentemente foi descrita a toxina ApxIV, exclusiva de *A. pleuropneumoniae* e

produzida somente *in vivo*, sendo secretada por todos os sorotipos (SCHALLER et al., 1999).

ApxI é fortemente hemolítica e citotóxica, sendo produzida pelos sorotipos 1, 5, 9, 10 e 11. ApxII é fracamente hemolítica e moderadamente citotóxica, sendo secretada por todos os sorotipos, exceto o 10. ApxIII é produzida pelos sorotipos 2, 3, 4, 6 e 8, e embora não seja hemolítica, é fortemente citotóxica (KAMP et al., 1991). Amostras do biotipo 2 produzem somente ApxII *in vivo* e *in vitro* (DOM et al., 1994).

JANSEN et al. (1995a) estudaram a ação de linhagens do sorotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* destituídas dos genes que codificam para as toxinas ApxI e ou ApxII, ou dos genes *apxIBD* para secreção das toxinas, sobre neutrófilos. Estes mutantes não foram capazes de induzir lesão e morte nestas células, comprovando a importância destas toxinas na neutralização das defesas do hospedeiro. Através da demonstração de que a inativação dos genes *apxIBD* leva à incapacidade de secretar ApxI e ApxII, foi comprovado que estes genes são essenciais para a secreção da toxina ApxII, pois este operon não contém os genes **B** e **D**.

Suínos infectados por *A. pleuropneumoniae* produzem anticorpos contra as toxinas Apx, o que indica sua utilidade como antígenos com finalidade de diagnóstico (KAMP et al., 1991). ApxIV, por ser antigenicamente específica e secretada por todos os sorotipos, é promissora quanto ao uso para diagnóstico ou produção de vacinas (SCHALLER et al., 1999).

### Cápsula

A cápsula é considerada um importante fator de virulência de *A. pleuropneumoniae*, devido à sua capacidade em prevenir a ativação do sistema Complemento e de inibir a fagocitose (FENWICK & HENRY, 1994). O antígeno é utilizado para sorotipificação e ensaios sorológicos (INZANA & MATHISON, 1987).

Na avaliação da capacidade imunogênica da cápsula, altos títulos de anticorpos foram detectados no soro de coelhos e suínos imunizados ou convalescentes de infecções experimentais, ambas as espécies desafiadas com extratos totais do sorotipo 5 de *A. pleuropneumoniae*, na presença de adjuvante. Contudo, cápsula purificada deste sorotipo produziu imunogenicidade baixa nestes animais, o que parece diminuir seu potencial para a utilização isoladamente em vacinas (FENWICK et al., 1986; INZANA & MATHISON, 1987). Mutantes acapsulados dos sorotipos 1 e 5 induziram forte resposta imune em suínos, sem produzir doença clínica ou lesões. Os

animais não apresentaram título de anticorpos para cápsula, indicando que estes mutantes podem ser bons candidatos para a produção de vacinas, protegendo os suínos frente ao desafio com linhagens virulentas homólogas ou heterólogas (INZANA et al., 1993).

### Lipopolissacarídeos

Lipopolissacarídeos (LPS) são os principais constituintes da membrana externa de bactérias gram-negativas, sendo compostos de polissacarídeos e lipídeo A. Este último é considerado uma endotoxina (HAESEBROUCK et al., 1997). Os LPS de *A. pleuropneumoniae* apresentam forte atividade endotóxica, mesmo quando pequenas quantidades são administradas, o que foi demonstrado após a inoculação em suínos e coelhos. Os primeiros foram mais sensíveis. A alta sensibilidade dos suínos às endotoxinas liberadas durante as infecções por *A. pleuropneumoniae* facilita a penetração no epitélio do trato respiratório e induzem à pneumonia ou choque. As endotoxinas purificadas induziram lesões típicas dos estágios agudos de pleuropneumonia ao serem inoculadas pela via intrabronquial em suínos, evidenciando seu envolvimento na patogenicidade de *A. pleuropneumoniae* (FENWICK et al., 1986).

### Proteínas ligantes da transferrina

Em *A. pleuropneumoniae* o sistema de aquisição de ferro, necessário à multiplicação bacteriana, é comum às espécies *Actinobacillus*, *Haemophilus* e *Pasteurella*, sendo constituído de receptores localizados em sua superfície. Estes são formados por proteínas ligantes da transferrina (TBP) denominadas Tbp 1 e Tbp 2. As proteínas de *A. pleuropneumoniae* são específicas para a transferrina suína, tendo sua forma de atuação através da ligação direta a esta, sendo expressadas sob condições limitantes de ferro. A imunização de suínos com estas proteínas confere proteção limitada frente ao desafio com linhagens homólogas (HAESEBROUCK et al., 1997).

GERALD et al. (1992) demonstraram 65% de homologia no gene que codifica para uma proteína ligante de transferrina (*tfbA*) dos sorotipos 1 e 7 de *A. pleuropneumoniae*. Os sorotipos 2, 3, 4, 8, 9, 10 e 11 codificam e expressam uma proteína TfbA altamente homóloga àquela do sorotipo 7, enquanto os sorotipos 6 e 12 expressam proteína homóloga à TfbA encontrada no sorotipo 1. Os genes *tfbA* dos sorotipos 5a e 5b foram reconhecidos por uma sonda do sorotipo 1, porém reagiram fracamente com anticorpos obtidos contra a proteína TfbA do sorotipo 7, sugerindo que um tipo distinto de proteína TfbA está presente nestes

sorotipos. É possível que variações entre estas proteínas permitam aos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae* evitar a resposta imune do hospedeiro contra linhagens heterólogas. O envolvimento das TBP na virulência do patógeno é reforçado pela demonstração de que a inoculação de uma linhagem na qual os genes *tbpA* e *tbpB* foram deletados tornou-se não patogênica e incapaz de induzir resposta imune. Além disso, não foi possível o isolamento posterior do trato respiratório dos animais inoculados (BALTES et al., 2002).

#### Proteínas de membrana externa

Várias proteínas de membrana externa já foram identificadas em *A. pleuropneumoniae*. CRUZ et al. (1996) caracterizaram uma proteína com peso molecular de 48 kDa, identificada em todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e ausente em espécies gram-negativas relacionadas. Esta proteína apresentou-se imunogênica em suínos infectados com os sorotipos 5 ou 1, sugerindo seu potencial como antígeno responsável por resposta imune cruzada.

Um anti-soro produzido em coelhos e suínos contra *A. pleuropneumoniae* reconheceu três principais proteínas de membrana externa nos sorotipos 1 a 8, os quais apresentaram peso molecular de 17 kDa, 32 kDa e 42 kDa, respectivamente. A proteína de 17 kDa foi comum a *Escherichia coli*, *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus lignieresii*, *Actinobacillus suis* e ao biotipo 2 de *A. pleuropneumoniae*, sugerindo que contenha epitopo comum a vários organismos gram-negativos. As proteínas de 32 kDa e 42 kDa apresentaram epitopos comuns a alguns membros da família *Pasteurellaceae*, não apresentando potencial para o desenvolvimento de testes de diagnóstico específicos. Estas proteínas de membrana externa não são, portanto, antígenos espécie ou sorotipo-específicos (MacINNIS & ROSENDAL, 1987).

#### Identificação de *A. pleuropneumoniae*

##### Métodos convencionais de identificação

A história clínica, lesões características e apresentação de surtos de curso agudo auxiliam no diagnóstico de pleuropneumonia, o qual é confirmado pelo isolamento do agente (STEVENSON, 1998; TAYLOR, 1999). O isolamento de *A. pleuropneumoniae* a partir de suínos saudáveis ou infectados de forma subclínica costuma ser difícil ou não é possível. Deve-se considerar que a maioria dos rebanhos é endemicamente infectada, dos quais poucos animais demonstram a doença clínica

(FENWICK & HENRY, 1994; PIFFER et al., 2001b). Estes dados são comprovados por KICH et al. (2000) com o isolamento do agente a partir de animais procedentes de rebanhos com histórico negativo para pleuropneumonia.

*A. pleuropneumoniae* é comumente isolado de lesões pulmonares, tonsilas e, de forma menos freqüente, de outras partes do trato respiratório dos suínos (MORES et al., 1984; BRANDRETH & SMITH, 1987). Em casos superagudos com septicemia é possível isolar o agente de outros tratos (TAYLOR, 1999). Em lesões agudas, pode ser isolado através de semeadura direta em ágar sangue suplementado com NAD (BIBERSTEIN et al., 1977). Em casos crônicos, o isolamento direto é dificultado e, muitas vezes, negativo, não pela presença do agente em pequeno número, mas devido ao efeito inibidor sobre o crescimento de *A. pleuropneumoniae* causado por outros agentes habitantes normais do trato respiratório e menos fastidiosos (PIJOAN et al., 1983). Neste caso, métodos de isolamento seletivos facilitam a identificação de *A. pleuropneumoniae*, contudo podem não inibir a multiplicação de agentes gram-negativos como *P. multocida*, e membros da família *Enterobacteriaceae*, como *Proteus sp.*, comumente isolados (GILBRIDE & ROSENDAL, 1983; PIJOAN et al., 1983; RAPP et al., 1985).

As características de *A. pleuropneumoniae* que permitem identificá-lo são a dependência de NAD, produção de hemólise, reação de CAMP, hidrólise da uréia e fermentação de glicídeos específicos (RAPP et al., 1985). Esta espécie é caracterizada pelas provas bioquímicas de fermentação de glicose, sacarose, ribose, xilose, manitol, manose e frutose, sendo incapaz de produzir indol (BIBERSTEIN et al., 1977). São descritas variações na presença das enzimas catalase e oxidase, e na fermentação de lactose e xilose (BLANCHARD et al., 1993). O sinergismo entre as toxinas de *A. pleuropneumoniae* e *Staphylococcus aureus* é responsável pelo fenômeno CAMP, observado quando cultivados em ágar sangue, no qual a zona de  $\beta$ -hemólise é potencializada pela toxina de *A. pleuropneumoniae* (JANSEN et al., 1995b). Algumas amostras podem perder a capacidade hemolítica quando subcultivadas em laboratório (BIBERSTEIN et al., 1977).

Divergências nos resultados das provas tradicionalmente empregadas para caracterização de *A. pleuropneumoniae* têm sido descritas. A ocorrência de amostras sorotipificáveis negativas para a produção de urease foi evidenciada por RAPP et al. (1985); BLANCHARD et al. (1993); PIFFER et al. (1997) e KICH et al. (2000). Neste caso, a presença de

hemólise, identificação do sorotipo e o isolamento a partir de lesões típicas da enfermidade auxiliam na classificação como *A. pleuropneumoniae* (PIFFER et al., 1997). Variações na presença da reação de CAMP e na produção de hemólise são também relatadas. GUNNARSSON et al. (1977) identificaram os sorotipos 1 e 5 como hemolíticos, enquanto os sorotipos 2, 3, 4 e 6 não apresentaram hemólise. Segundo PIFFER et al. (1997), somente alguns dos isolados dos sorotipos 3 e 7 demonstraram a reação de CAMP, enquanto todas as amostras isoladas do sorotipo 5 foram positivas para este teste, possivelmente devido à toxina ApxI, fortemente hemolítica, presente apenas no sorotipo 5. Todos os isolados dos sorotipos 1, 5 e 9 apresentaram-se hemolíticos, enquanto as amostras dos sorotipos 3 e 7 foram hemolíticas em 53% e 71% dos casos, respectivamente. Estes sorotipos secretam ApxII, fracamente hemolítica, possivelmente explicando os resultados encontrados.

Mais recentemente, a separação imunomagnética vem sendo utilizada para a identificação de *A. pleuropneumoniae*, demonstrando-se mais sensível que o isolamento em cultura. O método tem ainda a vantagem de permitir a identificação do sorotipo, dependendo do anticorpo específico que é utilizado (GAGNÉ et al., 1998; PIFFER et al., 2001a).

Testes sorológicos são utilizados como ferramenta diagnóstica para pleuropneumonia, também sendo úteis para evidenciar a imunidade do rebanho e a disseminação da infecção (NIELSEN, 1988). Entre as técnicas de sorologia, o teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é de rápida execução e elevada sensibilidade, sendo portanto um dos mais utilizados na pesquisa de *A. pleuropneumoniae*. Testes de ELISA polivalente para detecção dos sorotipos 3, 5 e 7, tendo como antígenos os LPS de cadeia longa destes sorotipos ou a fase aquosa da extração fenólica da suspensão bacteriana detectam também os sorotipos 4, 6 e 8, de LPS homólogos (KICH et al., 1999; MACHADO et al., 2001). Por este motivo, são considerados úteis para a realização de uma triagem inicial, após a qual é possível a identificação do sorotipo mediante a utilização do teste de ELISA tendo como antígeno as cápsulas purificadas dos sorotipos 3, 5 e 7 (DUTRA et al., 2000).

#### Identificação através de técnicas de biologia molecular

Técnicas de biologia molecular vêm sendo empregadas de modo a contornar as dificuldades muitas vezes encontradas na identificação de *A. pleuropneumoniae* pelas técnicas convencionais. GRAM et al. (1996) analisaram 101 tonsilas de suínos,

das quais o agente foi identificado em 66 através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O isolamento tradicional em meio de cultivo permitiu identificar apenas 19 tonsilas positivas, demonstrando que PCR foi quase três vezes mais eficiente.

A técnica de PCR foi utilizada para a detecção dos genes *A* dos operons *apxI*, *apxII* e *apxIII*, que codificam para as exotoxinas de *A. pleuropneumoniae* (COLLARES, 2000). De 52 isolados de campo, previamente classificados por sorologia como *A. pleuropneumoniae*, 9 foram confirmados como o agente, 28 como *Actinobacillus minor* e 15 como outros microorganismos do trato respiratório de suínos. A reavaliação das provas bioquímicas nas amostras anteriormente classificadas como *A. pleuropneumoniae* confirmou o resultado da técnica de PCR. Entre as amostras identificadas como *A. pleuropneumoniae*, 5 não puderam ser sorotipificadas, porém apresentaram a amplificação de pelo menos um dos produtos de PCR correspondente a um dos genes para as toxinas, indicando tratar-se do agente.

A detecção por PCR dos genes *cpx*, cujos produtos estão envolvidos no transporte da cápsula de *A. pleuropneumoniae*, confirmou a caracterização prévia, microbiológica e bioquímica, de 111 amostras de um total de 120 isolados NAD-dependentes obtidos do trato respiratório de suínos. As amostras restantes, não sorotificáveis, não apresentaram amplificação dos genes *cpx*. Porém, através dos resultados anteriormente determinados para a presença dos genes que codificam para as toxinas Apx, foram diferenciadas de outros organismos NAD-dependentes de suínos (KLEIN et al., 2003).

GOTTSCHALK et al. (2003) descrevem a existência de amostras não patogênicas, identificadas como *A. pleuropneumoniae* através de técnicas bioquímicas e sorológicas, as quais, por PCR, demonstram perfil de toxinas divergente e ausência de ApxIV. Com base na comparação da seqüência de nucleotídeos do RNA ribossômico (rRNA) 16S destas amostras, foi demonstrado um nível divergência entre estas seqüências e aquela de *A. pleuropneumoniae*, indicando poder tratar-se de uma nova espécie. De modo semelhante, algumas das amostras analisadas por COLLARES (2000) e KLEIN et al. (2003), as quais haviam sido bioquimicamente classificadas como *A. pleuropneumoniae* não sorotificáveis, apresentavam resultados de amplificação por PCR dos genes para toxinas Apx e cápsula divergentes do esperado para a espécie e para o sorotipo. Estas amostras foram então analisadas quanto à presença dos genes que codificam para a toxina ApxIV, através

de PCR, e analisadas quanto às seqüências de DNA de regiões hipervariáveis do gene que codifica para o rRNA 16S, sendo reclassificadas como outras espécies do trato respiratório de suínos (BALESTRIN, 2002). Por outro lado, a detecção por PCR do gene *apxIVA* deve ser de extrema utilidade na identificação de *A. pleuropneumoniae*, uma vez que está presente em todos os sorotipos (COSTA, 2002).

Amostras de *A. pleuropneumoniae* cuja sorotipificação não é possível ou apresentam reações cruzadas que tornam o resultado impreciso, podem ser caracterizadas por métodos moleculares. A Amplificação Aleatória do DNA Polimórfico (RAPD) é uma variação da técnica de PCR, que utiliza *primers* únicos para amplificar ao acaso o DNA. São produzidos múltiplos fragmentos de DNA, gerando um perfil de amplificação que permite diferenciar os sorotipos. Os perfis obtidos com essa técnica permitiram a caracterização das amostras de referência dos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, as quais foram também distintas dos polimorfismos de DNA identificados em espécies relacionadas (HENNESSY et al., 1993). Esta metodologia foi aplicada a 14 isolados de campo não sorotipificáveis, previamente caracterizados como *A. pleuropneumoniae* através de métodos bioquímicos e sorológicos, e confirmadas pela detecção por PCR do gene *apxA*. Destas, 13 amostras foram caracterizadas pelo perfil de RAPD. Entre os 58 isolados de campo sorotipificados e, após, analisados pela técnica, aqueles pertencentes aos sorotipos 3, 4 e 5 não puderam ser diferenciados. No entanto, esta diferenciação poderia ser feita com a identificação e utilização de *primers* adequados (VAZ, 2002).

## CONCLUSÃO

A pleuropneumonia está presente em todos os países nos quais a suinocultura é relevante. Diversos fatores de virulência contribuem para a patogenicidade do agente etiológico, determinando a apresentação clínica da enfermidade. Através dos métodos convencionais, a identificação de *A. pleuropneumoniae* pode ser difícil, principalmente em se tratando de animais portadores, clinicamente saudáveis, os quais são os mais importantes do ponto de vista epidemiológico pelo envolvimento na disseminação do patógeno. Os métodos bioquímicos podem, algumas vezes, apresentar resultados conflitantes. Neste sentido, técnicas de biologia molecular auxiliam na identificação do agente, fornecendo um resultado

rápido e preciso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALESTRIN, R.C. **Aplicação da técnica de PCR para o gene *apxIVA* associada ao seqüenciamento do rDNA 16S na caracterização de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e espécies relacionadas.** 2002. 40f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) - Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BALTES, N.; HENNIG-PAUKA, I.; GERLACH, G.F. Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, p.283-287, 2002.
- BIBERSTEIN, E.L.; GUNNARSSON, A.; HURVELL, B. Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.1, p.7-11, 1977.
- BLACKALL, P.J. et al. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. **Veterinary Microbiology**, v.84, p.47-52, 2002.
- BLANCHARD, P.C.; WALKER, R.L.; GARDNER, I. Pleuropneumonia in swine associated with a urease-negative variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.279-282, 1993.
- BRANDRETH, S.R.; SMITH, I.M. Comparative virulence of some English strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes 2 and 3 in the pig. **Research in Veterinary Science**, v.42, p.187-193, 1987.
- COLLARES, R.M. **Análise molecular dos genes para as toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em isolados de campo.** 2000. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- COSTA, M.M. ***Actinobacillus pleuropneumoniae* e espécies relacionadas: genes *apxIVA* e rDNA 16S.** 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós-graduação do Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CRUZ, W.T., et al. Molecular characterization of a common 48-Kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.64, n.1, p.83-90, 1996.
- DESROSIERS, R. Control of bacterial respiratory diseases. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 1998, Birmingham. **Anais...** Birmingham: International Pig Veterinary Society, 1998. p.5-9.
- DIDIER, P.J.; PERINO, L.; URBANCE, J. Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*: microbiologic and pathologic findings. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.184, n.6, p.716-719, 1984.
- DOM, P.; HAESBROUCK, F. Comparative virulence of

- NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.39, p.303-306, 1992.
- DOM, P. et al. NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains: production of RTX toxins and interactions with porcine phagocytes. **Veterinary Microbiology**, v.39, p.205-218, 1994.
- DUTRA, V. et al. Padronização do teste de ELISA baseado em antígeno capsular purificado dos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.281-286, 2000.
- FENWICK, B.W.; OSBURN, B.I.; OLANDER, H.J. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.7, p.1433-1441, 1986.
- FENWICK, B.; HENRY, S. Porcine pleuropneumonia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.204, n.9, p.1334-1340, 1994.
- GAGNÉ, A. et al. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.1, p.251-254, 1998.
- GERALD, G.F. et al. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. **Infection and Immunity**, v.60, n.8, p.3253-3261, 1992.
- GILBRIDE, K.A.; ROSENDAL, S. Evaluation of a selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.47, p.445-450, 1983.
- GOTTSCHALK, M. et al. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? **Veterinary Microbiology**, v.92, p.87-101, 2003.
- GRAM, T. et al. Diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in tonsils by culture and polymerase chain reaction. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 1996, Bologna, Italy. **Anais...** Bologna : International Pig Veterinary Society, 1996. p.186.
- GUNNARSSON, A.; BIBERSTEIN, E.L.; HURVELL, B. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: agglutination reactions. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.8, p.1111-1114, 1977.
- GUTIERREZ, C.B. et al. Characterization of V factor-dependent organisms of the family *Pasteurellaceae* isolated from porcine pneumonic lungs in Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infection Diseases**, v.16, n.2, p.123-130, 1993.
- HAESEBROUCK, F. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. **Veterinary Microbiology**, v.58, p.239-249, 1997.
- HENNESSY, K.J.; IANDOLO, J.I.; FENWICK, B.W. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.5, p.1155-1159, 1993.
- INZANA, T.J.; MATHISON, B. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. **Infection and Immunity**, v.55, n.7, p.1580-1587, 1987.
- INZANA, T.J. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v.11, p.305-316, 1991.
- INZANA, T.I.; TODD, J.; VEIT, H.P. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. **Infection and Immunity**, v.61, n.5, p.1682-1686, 1993.
- JANSEN, R. et al. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. **Infection and Immunity**, v.63, n.1, p.27-37, 1995a.
- JANSEN, R. et al. The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v.126, p.139-144, 1995b.
- JOLIE, R.A.V.; MULKS, M.H.; THACKER, B.J. Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. **Veterinary Microbiology**, v.38, p.329-349, 1994.
- KAMP, E.M. et al. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v.59, n.9, p.3079-3085, 1991.
- KICH, J.D. et al. Utilização de um teste de ELISA polivalente para detecção de anticorpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.5, p.409-414, 1999.
- KICH, J.D. et al. Comparação de métodos de isolamento de bactérias NAD-dependentes do trato respiratório superior de suínos sadios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.1, p.1-6, 2000.
- KLEIN, C.S. et al. Detection of *A. pleuropneumoniae* in filed strains from healthy and diseased pigs. **Current Microbiology**, no prelo, 2003.
- KUME, K.; NAKAI, T.; SAWATA, A. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.46, n.5, p.641-647, 1984.
- MACHADO, H.G. et al. Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico sorológico de infecções pelos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.513-522, 2001.
- MacINNES, J.I.; ROSENDAL, S. Analysis of major antigens of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and related organisms. **Infection and Immunity**, v.55, n.7, p.1626-1634, 1987.

- MITTAL, K.R. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11. **Research in Veterinary Science**, v.55, p.179-184, 1993.
- MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L. The value of different serological tests in serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.41, n.3, p.247-253, 1994.
- MORES, N.; SOUZA, J.C.de A.; NOGUEIRA, R.H.G. Estudo experimental da pleuropneumonia suína causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp). 1- Patogenicidade e evolução das lesões anátomo-patológicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.36, n.6, p.679-693, 1984.
- MORENO, A.M.; BARBARINI JUNIOR, O.; BACCARO, M.R. Levantamento sorológico para *Actinobacillus pleuropneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999. 384p. p.159-160.
- NICOLET, J. Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Canadian Veterinary Journal**, v.29, p.578-580, 1988.
- NIELSEN, R. Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.27, p.41-58, 1986.
- NIELSEN, R. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Canadian Veterinary Journal**, v.29, p.580-582, 1988.
- PERRY, M.B. et al. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. **Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Diseases**, v.4, p.299-308, 1990.
- PIFFER, I.A. et al. Efeito das afecções pulmonares, observadas no abate, sobre o desenvolvimento dos suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2., 1985, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1985. p.105-106.
- PIFFER, I.A. et al. Sorotipos de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isolados no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.3, p.79-83, 1987.
- PIFFER, I.A. et al. Caracterização bioquímica e sorológica de amostras de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isoladas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.1, p.123-129, 1997.
- PIFFER, I.A. et al. Comparação entre o isolamento bacteriológico tradicional (IBT) e o método de separação imunomagnética (SIM) de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), sorotipo 5B, de tonsilas de leitões cronicamente infectados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001a. 384p. p.21-22.
- PIFFER, I.A. et al. **O diagnóstico da pleuropneumonia suína**. Concórdia : EMBRAPA, 2001b. 20p. (Circular Técnica, 29).
- PIJOAN, C.; MORRISON, R.B.; HILLEY, H.D. Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.1, p.143-145, 1983.
- POHL, S. et al. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica-like* organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb.nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.33, p.510-514, 1983.
- PROTAS, J.F.S. et al. Custo de um surto de pleuropneumonia suína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, n.2, p.241-244, 1985.
- RAPP, V.J.; ROSS, R.F.; YOUNG, T.F. Characterization of *Haemophilus spp.* isolated from healthy swine and evaluation of cross-reactivity of complement-fixing antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus* Taxon "Minor Group". **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, n.6, p.945-950, 1985.
- SCHALLER, A., et al. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinat of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbiology**, v.145, p.2105-2116, 1999.
- SHOPE, R.E. Porcine contagious pleuropneumonia. I - Experimental transmission, etiology and pathology. **Journal of Experimental Medicine**, n.119, p.357-368, 1964.
- SILVA, A.F. et al. Programa de gerenciamento de doenças respiratórias em suínos. I- Estudo do perfil de doenças respiratórias nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre : Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. 384p. p.31-32.
- STEVENSON, G.W. Bacterial pneumonia in swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 1998, Birmingham. **Anais...** Birmingham: International Pig Veterinary Society, 1998. p.11-20.
- TAYLOR, D.J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: STRAW, S.E. et al. **Diseases of swine**. 8.ed. Ames : Iowa State University, 1999. Cap.26, p.343-354.
- VAZ, C.S.L. **Genotipificação de amostras sorotipificáveis e não sorotipificáveis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* através de RAPD**. 2002. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.