



Simone Oliveira  
M.V., M.Sc., PhD  
Universidade de Minnesota  
oliv0107@umn.edu

## Atualização em diagnóstico: *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*

### Introdução

*Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* são alguns dos principais patógenos respiratórios associados, causadores de mortalidade nas fases de creche e terminação. Esses patógenos diferem consideravelmente com relação à patogenia, virulência e epidemiologia. Conhecer os detalhes da infecção causada por cada um desses microrganismos é importante para o entendimento e planejamento das estratégias de diagnóstico. Esse artigo descreve as características básicas de cada um desses patógenos, com o objetivo de prover informações essenciais para veterinários que atuam

no campo, para que maximizem a utilização de novos testes para diagnósticos.

### Colonizadores precoces versus tardios

Embora seja necessária a geração de mais dados para estabelecer o exato momento das infecções causadas pelo *H. parasuis*, *A. suis* e *A. pleuropneumoniae*, a percepção geral é que o *H. parasuis* coloniza o trato respiratório superior antes do *A. suis* e do *A. pleuropneumoniae*. Novos testes de PCR disponíveis para a detecção desses patógenos certamente proverão os dados necessários para

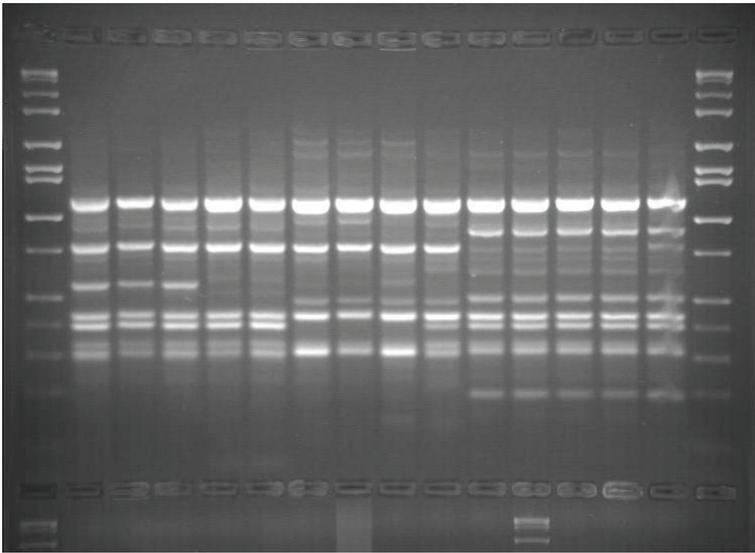
responder a essa questão. É importante conhecer o período e o momento da colonização para cada um desses microrganismos, para aperfeiçoar sua detecção e a administração de tratamentos com antibióticos.

O *Haemophilus parasuis* pode ser encontrado em ambas as cavidades nasais e nas tonsilas, enquanto o *A. suis* e o *A. pleuropneumoniae* são mais comumente encontrados nas tonsilas. Uma regra simples a seguir, para definir a prevalência da infecção no desmame, por exemplo, é coletar material das tonsilas através de *swabs* e submetê-los ao teste de PCR.

Há uma comparação da prevalência da colonização tonsilar pelo *H. parasuis* e pelo *A. suis*, no desmame, em um plantel de suínos endemicamente infectados por três períodos de desmame consecutivos. Os resultados demonstraram que todos os suínos coletados no desmame (30 suínos/período) foram positivos para o *H. parasuis*, enquanto apenas 70% foi positivo para o *A. suis*, através da prova do PCR. Esse plantel, especificamente, era negativo para o *A. pleuropneumoniae*. Esses dados sugerem que a colonização pelo *H. parasuis* é mais eficaz (tanto mais precoce como mais rápida) que a colonização pelo *A. suis*; entretanto, os mecanismos responsáveis por essa diferença são ainda desconhecidos. A porca é a fonte principal de *H. parasuis*, *A. suis* e *A. pleuropneumoniae* para os leitões e o trato respiratório superior, a sua rota de transmissão. Embora haja relatos de que o *A. suis*



A porca é a principal fonte de contaminação do *H. parasuis*, *A. suis* e *A. pleuropneumoniae*, e o trato respiratório superior a rota de transmissão.



A Técnica de PCR (Reação de cadeia pela polimerase), é um excelente suporte para detecção do momento da colonização dos agentes patogênicos.

possa ser encontrado na mucosa vaginal, com a pesquisa não foi detectada a presença deste patógeno nesse local, usando o PCR ou tentando o isolamento. Os testes nesse sentido foram realizados numa população reconhecidamente positiva para o *A. suis*, sendo o mesmo detectado nos *swabs* tonsilares das mesmas porcas que se revelaram negativas para a colonização vaginal.

A prova do PCR é um excelente suporte para o desenvolvimento e a avaliação das estratégias de controle e erradicação. Os *swabs* de tonsilas são as amostras de eleição para definir a prevalência da colonização em marãs, porcas ou leitões. A definição da prevalência inicial é crítica, para um acesso bem sucedido aos protocolos de tratamento. Ainda mais importante é o fato do PCR poder ser utilizado para definir o momento da colonização e para otimizar o estabelecimento dos tratamentos com antibióticos que atuem melhor frente aos microrganismos em questão. Tratamentos massivos com antibióticos podem reduzir ou eliminar a colonização pelo *A. pleuropneumoniae* e o *A. suis*. A redução da prevalência no desmame é, na verdade, tão benéfica quanto a erradicação para alguns plantéis, uma

vez que os sinais clínicos não ocorrerão durante o ciclo de produção. O efeito dos tratamentos massivos nos agentes colonizadores precoces, por outro lado, pode ser o oposto. A alta prevalência de colonização do *H. parasuis* (e do *S. suis*) no desmame é na verdade desejável, uma vez que a maioria dos suínos deveria ter contato com esses colonizadores normais do trato respiratório superior, na presença de imunidade maternal. Tratamentos com antibióticos visando agentes colonizadores tardios deveriam ser realizados de modo a permitir que alguma colonização com *H. parasuis* e *S. suis* ocorresse. Alguns plantéis têm relatado aumento na mortalidade devido a *H. parasuis* e *S. suis* após tratamento massivo com antibióticos para eliminar *A. suis* e *A. pleuropneumoniae* (*App*). O uso do PCR ajudará a lidar com essa diferença entre a colonização do *H. parasuis* / *S. suis* e a do *A. pleuropneumoniae* / *A. suis*.

### Isolamento - Amostragem Respiratória versus Sistêmica

O *H. parasuis*, *A. suis*, e *A. pleuropneumoniae* diferem consideravelmente em termos de pato-

genia e desenvolvimento de lesões. O *Haemophilus parasuis* pode ser isolado de pulmões sem lesões, mas os isolamentos nessas condições não são ideais para a caracterização de 'cepas problema', envolvidas com a mortalidade. O *H. parasuis* deve ser isolado de locais como a pleura (com pleurite), pericárdio, peritônio, baço, fígado, linfonodos, articulações e cérebro. Amostras para análise através de PCR devem ser coletadas também desses locais.

Já o isolamento do *A. suis* e do *A. pleuropneumoniae*, por sua vez, é interessante que seja realizado no trato respiratório. O *Actinobacillus suis* e o *A. pleuropneumoniae* devem ser isolados de pulmões lesionados. Ocasionalmente tem-se isolado microrganismos semelhantes ao *A. pleuropneumoniae* de pulmões sem lesões. Há espécies de actinobacilos que se assemelham bioquimicamente ao *A. pleuropneumoniae* e então se tem utilizado ferramentas adicionais de diagnóstico, como a sequenciação 16S rRNA, a genotipagem e o perfil das toxinas, para elucidar esses resultados. Foram documentados pelo menos dois casos de isolamento de actinobacilos de pulmões sem lesões, cujo diagnóstico foi confundido com o do *A. pleuropneumoniae*, com base em identificação bioquímica. O actinobacilo em questão continha apenas a toxina Apx II (espera-se que o *A. pleuropneumoniae* contenha uma combinação de toxinas Apx I, II, III e IV) e foi, por isso, tipificado como sendo do sorotipo 10, com base na prova de hemaglutinação indireta, o que sugeriu uma reação cruzada entre os membros desse grupo de actinobacilos e o *A. pleuropneumoniae*.

O *Actinobacillus suis* e o *A. pleuropneumoniae* têm em comum duas toxinas (Apx I e Apx II), sendo essa a causa da similaridade entre suas lesões pulmonares (necrose e hemorragia). Esses organismos diferem, entretanto, com relação à sua habilidade em invadir o hospedeiro e causar uma infecção sistêmica. Enquanto a maioria dos isolados de *A. suis* são recu-

perados do tecido pulmonar (o que reflete uma preferência na submissão da amostra para diagnóstico laboratorial), a mesma cepa, isolada do trato respiratório, é capaz de causar a doença sistêmica. Este é um fenômeno que não será observado no caso da infecção pelo *A. pleuropneumoniae*, por exemplo. Baseado nesses fatores, a amostragem para a detecção do *A. pleuropneumoniae*, por isolamento e/ou PCR, deveria incluir amostras de pulmões, sendo que as amostras pulmonares e de outros locais sistêmicos deveriam ser submetidas ao diagnóstico para o *A. suis*.

A diferença principal entre os isolamentos do *H. parasuis*, do *A. suis*, e do *A. pleuropneumoniae* oriundos de amostras de casos clínicos – entre as amostras que devem ser submetidas ao diagnóstico – é a sobrevivência desses patógenos nas espécies alvo. O *H. parasuis* é muito mais sensível à temperatura que o *A. suis* ou o *A. pleuropneumoniae*. No caso da submissão de amostras de pulmões com necrose e hemorragia, as chances de isolamento do *A. suis* ou do *A. pleuropneumoniae* serão maiores. Isso já não ocorre com o *H. parasuis*, sendo – nesse caso – o PCR a ferramenta de eleição para diagnosticá-lo se houver mortalidade e na presença de lesões e ausência do isolamento.

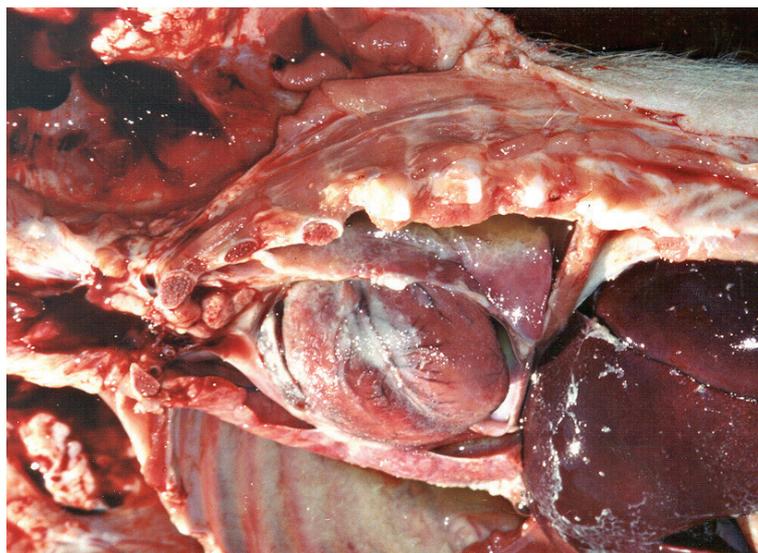
## Tipificação dos isolamentos

Os métodos de tipificação (e o significado dos resultados obtidos) diferem consideravelmente entre o *H. parasuis*, o *A. suis* e o *A. pleuropneumoniae*. A sorotipagem está disponível para o *H. parasuis* e para o *A. pleuropneumoniae*, mas não para o *A. suis*. A genotipagem está disponível para todos os três microrganismos, mas alguma informação útil poderia ser obtida para o *H. parasuis* e – talvez – para o *A. suis*. O *H. parasuis* não contém toxinas (conhecidas), enquanto o *A. suis* e o *A. pleuropneumoniae*, ambos contêm as toxinas Apx I e Apx II, as quais podem ser detectadas pelo teste de PCR. Os

perfis da toxina Apx são inerentes aos sorotipos do *A. pleuropneumoniae*, tendo sido utilizados, com bons resultados, como técnica alternativa para identificar sorogrupos de *A. pleuropneumoniae*. Os sorogrupos identificados pelos perfis da toxina do *A. pleuropneumoniae* são: 1, 2-8-15, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12-13 e 14. A maioria dos isolados identificados como perfil de toxina 2-8-15 e 12-13 é confirmado como sendo sorotipos 15 e 12, respectivamente, pelo método da hemaglutinação indireta (IHA). Foram testados 70 isolados de *A. suis*, de 12 grupos genotípicos diferentes, para a presença das toxinas Apx. Todos os isolados tinham ambas as toxinas Apx I e Apx II, mas não tinham Apx III e Apx IV.

A genotipagem é ainda uma das ferramentas mais confiáveis para tipificar o *H. parasuis*. É uma técnica que tem sido rotineiramente usada para caracterizar e comparar os isolados a campo de *H. parasuis* por quase 10 anos, no Laboratório de Diagnóstico da Universidade de Minnesota (MVDL). Agora se identifica tendências interessantes na epidemiologia molecular do *H. parasuis*. A variabilidade das linhagens é extremamente alta para esse microrganismo e há dados sugerindo que re-arranjos resultando em diferentes tipos cap-

sulares podem ocorrer dentro de um mesmo plantel. Isso poderia ser um mecanismo de evasão utilizado pelo *H. parasuis* para escapar da resposta imunitária do hospedeiro. Atualmente, esta é uma hipótese que precisa ser avaliada com maior profundidade. A prova ERIC-PCR nos fornece uma boa informação instantânea sobre a variabilidade genética do *H. parasuis*, dentro de uma população de suínos. Esta técnica tem se revelado como de extrema importância para a seleção de cepas a serem incluídas em vacinas autógenas e relatos de veterinários a campo confirmam que, quando as cepas corretas (prevalentes/recentes/sistêmicas) são adicionadas à vacina, a vacinação impactará de modo positivo na mortalidade. Não há dúvida de que os anticorpos têm um papel importante na proteção imunitária contra o *H. parasuis*. Suínos privados de colostro são altamente sensíveis à infecção sistêmica pelo *H. parasuis* e o declínio dos anticorpos maternos em suínos convencionais está associado ao início da mortalidade na creche. Em resumo, a vacinação é importante para a prevenção e o controle do *H. parasuis* e a seleção das cepas corretas a serem incluídas nas vacinas autógenas faz toda a diferença. No momento está sendo avaliado um “método baseado na sequência” alternativo para tipificar o *H. parasuis*.



O *H. parasuis*, Apx e o *A. suis*, diferem-se em termos de patogenia e lesões teciduais.

Esses métodos incluem a tipificação da sequência *multilocus* (MLST) e o sequenciamento dos genes que codificam antígenos. É esperado desenvolver um novo método para a tipificação do *H. parasuis* que forneça ambas as informações – epidemiológicas e antigênicas – para monitorar a infecção e selecionar cepas vacinais.

A importância da genotipagem para o *H. parasuis* não é exatamente a mesma que para o *A. suis* e o *App*. Para o *App* o método mais importante de tipificação é a sorotipagem (tanto por hemaglutinação indireta quanto pela definição do grupo do sorotipo pelo perfil das toxinas). A genotipagem não ajuda na seleção das cepas vacinais, embora possa ser potencialmente usada para seguir o movimento das mesmas entre plantéis. Nesse caso, a genotipagem se torna uma ferramenta importante para a avaliação da transmissão e de brechas na biossegurança. Para o *A. suis*, a genotipagem é o único sistema disponível para a tipificação de rotina. Está sendo realizada extensiva caracterização dos isolados de *A. suis* recuperados dos plantéis norte americanos de suínos e há a confirmação de que o *A. suis* é altamente colunável, o que significa que muitos grupos isolados compartilham o mesmo genótipo, toxina e os perfis de proteína celular total. Os médicos veterinários que trabalham com suínos têm utilizado a genotipagem do *A. suis* para caracterizar a variabilidade das cepas dentro dos plantéis e para selecionar cepas vacinais. Embora essa tenha se tornado uma prática comum em alguns plantéis de suínos, não há dados confirmando a eficácia das vacinas autógenas contra o *A. suis*.

## Sorologia

Não há testes sorológicos disponíveis para o *A. suis*. Testes de ELISA para o *H. parasuis* podem fornecer alguma informação significativa, caso sejam produzidos de acordo com especificações e utilizem a(s) cepa(s) problema do plantel como antígeno(s) de cobertura na placa de ELISA. As respostas sorológicas ao *H. parasuis*

são sorotipo-específicas. Um ELISA que contenha um sorotipo 5, por exemplo, trará melhores resultados para uma população infectada com esse sorotipo e uma infecção com um sorotipo diferente poderá gerar resultados sorológicos negativos.

A sorologia é uma das ferramentas mais importantes para monitorar as infecções pelo *App*. Existem hoje três variedades de testes sorológicos que podem ser utilizados na detecção de anticorpos contra esse patógeno. O teste de ELISA original para o *App* foi lançado pela empresa *Biovet*. Esses testes são sorotipo-específicos e detectam anticorpos contra a cadeia longa de lipo-polissacarídeos (LC-LPS) desse patógeno. Os sorogrupos identificados por esses testes incluem os sorotipos (1-9-11), 2, (3-6-8-15), (4-7), 5, 10, e 12. Os sorotipos entre parênteses não podem ser diferenciados. Alternativas recentemente introduzidas incluem o APX IV ELISA, do laboratório *IDEXX* e o teste Multi-*App* oferecido na Universidade de Montreal. Ambos os testes detectam anticorpos contra todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. O teste APX IV baseia-se na detecção de anticorpos contra uma toxina que se expressa durante a infecção (*App* IV) e o Multi-*App*. ELISA baseia-se na detecção de anticorpos contra uma mistura de LC-LPS, oriunda de todos os sorotipos do *A. pleuropneumoniae*. Como seria de se esperar, há discordâncias entre os resultados obtidos com cada um destes testes. O histórico clínico, o teste do PCR e o isolamento são críticos na elucidação de resultados positivos não esperados. É percebido comparando frequentemente o desempenho desses testes, com o objetivo de detectar soroconversão em suínos subclínicamente infectados após a infecção experimental com o *A. pleuropneumoniae*.

## Sumário

O *Haemophilus parasuis* continua sendo um patógeno que desafia a suinocultura. Muitas das dificuldades relativas à prevenção e ao controle da infecção causada por ele estão asso-

ciadas à alta variabilidade observada nesse patógeno e, possivelmente, à sua adaptabilidade à imunidade do plantel. O desenvolvimento de métodos de tipificação baseados na sequência, os quais fornecem ambas as informações, epidemiológicas e antigênicas, melhorarão sobremaneira a caracterização e a seleção das cepas vacinais do *H. parasuis*.

A tipificação do *Actinobacillus suis* está ainda em seus estágios iniciais. Embora a genotipagem seja útil para traçar o movimento das cepas e caracterizar sua variabilidade, tanto dentro do mesmo plantel como entre plantéis distintos, ainda é preciso entender como essa informação pode ajudar na prevenção e no controle da infecção. O próximo passo lógico na pesquisa voltada ao *A. suis* seria avaliar a eficácia das vacinas autógenas. Esse é um dos objetivos futuros da pesquisa. O tratamento massivo com antibióticos pode trazer mais problemas que benefícios, especialmente se afetar a prevalência – no desmame – de agentes colonizadores precoces como o *H. parasuis* e o *S. suis*. A vacinação pode ser uma boa alternativa na prevenção e no controle da doença, sem afetar a colonização de outros organismos comensais do trato respiratório.

O diagnóstico do *A. pleuropneumoniae* precisa ser revisado, havendo a necessidade do desenvolvimento de um protocolo validado para monitorar a infecção. Os novos testes sorológicos introduzidos recentemente no mercado têm criado confusão, gerando muitas vezes, mais perguntas do que respostas. É esperado elucidar muitas dessas questões com o experimento que estão sendo conduzidos no momento e é planejado usar os resultados para desenvolver e avaliar um protocolo padrão para o diagnóstico do *A. pleuropneumoniae*.

## Referências

Disponíveis na página da web de Bacteriologia Molecular:  
[www.molecularbacteriology.com](http://www.molecularbacteriology.com)