

Comparação de métodos de isolamento de bactérias NAD-dependentes do trato respiratório superior de suínos sadios

(Methods to isolate NAD-dependent bacteria from the upper respiratory tract of health pigs)

J.D. Kich^{1,2}, I.A. Piffer^{3,5}, D.E.S.N. Barcellos^{2,4}, A.L. Guidoni³, C.S. Klein³, M.B.B. Fávero³, R. Vizotto³

¹Centro de Ciências Rurais – URCAMP
Av. Tupi Silveira, 2099
96400-110 - Bagé, RS

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul

³Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves - EMBRAPA, Concórdia, SC

⁴FFFCMPA, RS

⁵Bolsista do CNPq

Recebido para publicação em 2 de agosto de 1999.
Projeto financiado pela EMBRAPA/CNPq

RESUMO

Secreções nasais, tonsilares e tecido tonsilar foram coletados de 67 leitões de 9 a 15 semanas de idade, provenientes de três rebanhos positivos para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), e de 50 leitões provenientes de dois rebanhos negativos. Foram classificados como positivos aqueles rebanhos com isolamento prévio de sorotipos 3, 5 e 7 e rebanhos negativos aqueles submetidos a controle veterinário, sem notificação de sintomas clínicos, lesões de pleuropneumonia suína e sem isolamento do agente. O material coletado foi submetido a três diferentes métodos de cultivo: 1- semeadura direta em meio de cultivo sólido seletivo; 2- diluição em caldo seletivo seguido de subsemeadura em meio de cultivo sólido seletivo; 3- diluição em caldo seletivo seguido de subsemeadura em ágar sangue. Entre as amostras NAD-dependentes recuperadas 86 foram classificadas como App, 13 como grupo *minor* e 21 como grupo *taxon* (C, D, E e F). Dos rebanhos positivos foram recuperadas quatro amostras de App (sorotipos 3, 7 e 12) e 51 não sorotificáveis. Dos rebanhos negativos foram recuperadas 31 amostras de App não sorotificáveis, indicando que o App faz parte da flora normal do trato respiratório superior dos suínos. O melhor método de isolamento de amostras NAD-dependentes de leitões portadores foi da biópsia de tecido tonsilar semeado diretamente em meio sólido seletivo (PPL0 ágar adicionado de 2µg de cristal violeta, 10µg NAD, 1µg de lincomicina, 1,4µg de bacitracina por ml).

Palavras-chave: Suíno, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuropneumonia

ABSTRACT

Nasal and tonsil secretions and tonsil tissue were collected from 67 piglets (9-to-15 weeks old) from three positive herds and from 50 piglets from two negative herds. Positive herds were those in which an *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) strain of serotype 3, 5 or 7 was isolated and negative ones those in which there was no notification of clinical symptoms or lesions of swine pleuropneumoniae, no App isolation and the herd was under veterinarian control. The collected material was submitted to three different bacterial culture methods: 1- direct streak on solid selective medium, 2- dilution in selective broth followed by subculture in solid selective medium, and 3- dilution in selective broth medium followed by subculture in blood agar. Among the NAD-dependent strains recovered 86 were App, 13 belonged to the minor group and 21 to the Taxon group (C, D, E e F). From the positive herds four serotyped strains of App (serotypes 3, 7 and 12) and 51 nonsorotipable strains were recovered. From the negative herds 31 nonsorotipable strains of App were recovered, indicating that App is a resident in the upper respiratory tract of pigs. The best method for recovering NAD-dependent strains from carrier piglets was achieved by direct culturing of tonsil tissue in solid selective medium (PPLO agar containing 2 μ g of crystal violet, 10 μ g of NAD, 1 μ g of lincomycin, 1,4 μ g of bacitracin per ml).

Keywords: Swine, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuropneumonia

INTRODUÇÃO

São reconhecidos sete membros fator-V nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) dependentes da família *Pasteurellaceae* isoladas do trato respiratório superior dos suínos: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) agente da pleuropneumonia suína (PS), *Haemophilus parasuis*, agente da doença de Glasser e *Haemophilus taxon minor group*, e taxons C, D, E e F. A PS é uma doença infecto-contagiosa que na forma aguda apresenta lesões fibrino-necro-hemorrágicas no pulmão e pleurite e na forma crônica, nódulos encapsulados no parênquima pulmonar e aderências de pleura adjacentes às áreas necróticas (Mores et al., 1984).

Baseados nas características de polissacarídeos capsulares, foram descritos para o App 12 sorotipos para o biovar 1 (NAD-dependentes), sendo que o sorotipo 5 apresenta dois subtipos 5A e 5B (Nicolet, 1971; Gunnarsson et al., 1977; Kilian et al., 1978; Rosendal & Boyd, 1982; Nielsen & O'Connor, 1983; Nielsen, 1985a,b; Nielsen, 1986a, b). No Brasil foram identificados os sorotipos 5, 3, 1, 4, 7 e 9 (Piffer et al., 1987; Saito et al., 1988; Piffer et al., 1997).

O App pode ser encontrado em suínos de todas as idades, tanto em animais doentes quanto em portadores assintomáticos, dos quais o agente é recuperado da cavidade nasal (Kume et al., 1984) e das tonsilas (Sidibé et al., 1993). Os portadores assintomáticos se constituem na forma mais importante de manutenção da infecção no rebanho e de transmissão da doença entre rebanhos, dado o trânsito e comércio de animais (Rosendal & Mitchell, 1983).

O número de App é grande nas lesões agudas, sendo fácil o isolamento por meio da semeadura direta em placas de ágar sangue com estria perpendicular de colônia fornecedora de NAD (Biberstein et al., 1977). Nos casos crônicos o isolamento é geralmente negativo, e outras bactérias podem exercer um efeito inibidor sobre o crescimento do App. Melhores resultados de isolamento têm sido observados quando utilizadas técnicas de diluição e meios de cultivo seletivos, tanto de lesões crônicas como de secreções nasais ou do tecido tonsilar de animais infectados subclínicamente (Little & Harding, 1980; Pijoan et al., 1983; Kume et al., 1984; Sidibé et al., 1993).

O presente trabalho teve como objetivo testar diferentes formas de isolamento de amostras NAD-dependentes do trato superior de leitões sadios provenientes de rebanhos cronicamente infectados e rebanhos considerados livres dessa infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 117 leitões entre 9 e 15 semanas de idade. Sessenta e sete leitões eram originados de três rebanhos onde já havia sido isolado o App, sem posterior repopulação do rebanho (positivos). Cinquenta leitões foram originados de dois rebanhos que estavam sob cuidados de um médico veterinário, sem diagnóstico ou suspeita de pleuropneumonia e sem registro de lesões suspeitas no abate.

De todos os leitões foram coletados, após anestesia dos animais, dois suabes nasais (local a), dois suabes tonsilares (local b) e um fragmento de tonsila (local c). A anestesia foi realizada com produto à base de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepan na dose de 0,4mg por quilograma de peso, por via intramuscular. Para a abordagem das tonsilas, o leitão foi suspenso e com auxílio de abridor de boca, abaixador de língua e iluminação de uma lanterna, as tonsilas foram localizadas no fundo da cavidade bucal. Após a realização dos suabes, foi introduzido o aparelho de biópsia e coletado 0,5cm³ do tecido tonsilar.

O material coletado foi submetido a três métodos de isolamento: 1) semeadura direta em meio de cultivo sólido descrito por Sidibé et al. (1993) e modificado com PPLO ágar contendo 2µg de cristal violeta/ml, 10µg NAD/ml, 1µg de lincomicina/ml e 1,4µg de bacitracina/ml (CVLB); 2) diluição em caldo BHI, adicionado de soro, extrato de levedura, NAD e antibióticos (Pijoan et al., 1983) em base 10 até 10⁻⁵ e subsemeadura, no dia seguinte, no meio CVLB e 3) mesmas diluições anteriores com a subsemeadura em ágar sangue com estria de *Staphylococcus aureus*. Todos os cultivos foram incubados a 37°C, numa atmosfera entre 5 a 10% de CO₂ por aproximadamente 18 horas.

Foram presuntivamente identificadas como NAD-dependentes aquelas colônias que apresentavam entre 1 e 2mm de diâmetro, com bordas regulares, translúcidas e iridiscentes. Colônias puntiformes também foram subcultivadas. A dependência do NAD foi determinada pela apresentação de satelitismo junto à estria do *S. aureus*, em placas de ágar sangue. As colônias NAD-dependentes foram submetidas à caracterização bioquímica e classificação das espécies, conforme métodos e tabelas descritas por Möller & Kilian (1990) e Gutierrez et al. (1993). As amostras caracterizadas como App foram submetidas à sorotipagem pelas técnicas de imunodifusão (Nicolet, 1971) e hemoaglutinação passiva (Mittal et al., 1983).

Os métodos e locais de isolamento foram comparados usando-se a análise de variância discreta do procedimento CATMOD do SAS (SAS, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização bioquímica das espécies NAD-dependentes da família *Pasteurellaceae* isoladas do sistema respiratório dos leitões é apresentada na [Tab. 1](#). Das 120 amostras isoladas, 86 foram classificadas como App, 13 como grupo *minor* e 21 como pertencentes aos demais grupos *taxon C*, *D*, *E* e *F*, aqui agrupados como grupo *taxon* (Kilian et al., 1978; Möller & Killian, 1990; Gutierrez et al., 1993)

Tabela 1. Caracterização bioquímica de espécies NAD-dependentes da família *Pasteurellaceae* isoladas do sistema respiratório superior de suínos saudáveis de 9 a 15 semanas de idade.

Característica bioquímica	App n=86	Grupo <i>minor</i> n=13	Taxon n=21
Hemólise ¹	100,00 ⁴	0	0
Eqüino ²	84,88	0	0
Ovino ³	15,12	0	0
CAMP	13,95	7,69	4,76
Indol	1,16	0	14,30
Urease	83,72	100,00	0
Glicose	97,67	100,00	100,00
Lactose	97,67	100,00	100,00
Sacarose	98,84	92,30	100,00
Manitol	20,93	0	19,00
Xilose	29,07	38,50	23,80
Arabinose	38,37	30,80	52,40
Trealose	77,91	76,90	52,40
Rafinose	97,67	92,30	90,50
Galactose	91,86	76,90	95,20
Ribose	61,63	38,50	90,50
Sorbitol	6,98	0	9,52
Manose	86,05	100,00	95,20
Esculina	2,33	0	0
Nitrato	97,67	100,00	95,20
Catalase	25,58	7,69	76,20
Oxidase	46,51	15,40	47,60

¹Hemólise independente da origem das hemácias; ²Hemólise sobre hemácias de eqüino;

³Hemólise sobre hemácias de ovino; ⁴Porcentagem de amostras com positividade ao teste

Entre as 86 amostras classificadas como App apenas 4/86 (4,65%) foram sorotipadas. Duas dessas amostras pertenciam ao sorotipo 3, uma ao sorotipo 7 e outra ao sorotipo 12. Esse é o primeiro registro de isolamento do sorotipo 12 no Brasil. As amostras sorotipadas foram isoladas em dois rebanhos positivos, enquanto que 31/82 (38%) das amostras não sorotificáveis foram isoladas em rebanhos considerados negativos, indicando que o App é componente da flora normal do trato respiratório superior do suíno. Por conseguinte, esses dados não podem ser comparados diretamente com os resultados dos trabalhos que se referem ao isolamento de amostras de App de sorotipos conhecidos. Os sorotipos descritos na literatura, independente do grau de severidade, já foram relacionadas com patogenicidade. A patogenicidade dessas amostras não sorotipadas é desconhecida e necessita de estudos específicos.

Foram encontradas 14 amostras de App urease negativas, nenhuma sorotificável. Embora o App seja classificado como urease positivo, Blanchard et al. (1993) e Piffer et al. (1997) registraram o isolamento de amostras de App sorotificáveis não produtoras de urease

O App é considerado CAMP teste positivo (Biberstein et al., 1977), porém entre as amostras avaliadas por Gutierrez et al. (1993), 19,5% foram negativas, e das avaliadas por Piffer et al. (1997), 52,2% foram positivas. Por definição, o grupo *minor* (Biberstein et al., 1977) é CAMP teste negativo, porém, quando uma amostra padrão do grupo *minor* foi cultivada em meio de cultivo enriquecido (Rapp et al., 1985), apresentou reação fraca ao teste de CAMP. As diferenças de resultados a princípio podem ser explicadas pelo enriquecimento do meio de cultivo utilizado e também pela dificuldade prática de diferenciação de uma reação fraca de uma negativa.

Os resultados da fermentação de glicose (Tab. 1) concordam com as observações de Sirois & Higgins (1991), Möller & Kilian (1990) e Piffer et al. (1997) que constataram 100% de positividade para essa fermentação, porém diferem das de Gutierrez et al. (1993) que encontraram apenas 12,5%

de amostras que fermentavam esse açúcar. Discrepâncias similares foram observadas com a lactose, rafinose, manitol, ribose, xilose, arabinose e trealose, demonstrando a complexidade em se usar esse critério na classificação das espécies desse gênero bacteriano. Isso levou ao estabelecimento da técnica de PCR (*arbitrary primed polymerase chain reaction*) para a identificação dessas amostras (Hennessy et al., 1993).

Na [Tab. 2](#) estão sumariados os resultados de isolamento de amostras NAD-dependentes por método bacteriológico e local de isolamento. Na análise global desses resultados observa-se que a eficiência dos métodos de isolamento de amostras bacterianas NAD-dependentes dependeu do local de isolamento. Quando se utilizaram suabes de secreções nasais (local a) e tonsilares (local b) não houve diferenças entre os métodos de isolamento adotados. Porém, com a utilização de tecido tonsilar (local c), o método 1 foi significativamente superior aos métodos 2 e 3 ([Tab. 2](#)).

Tabela 2. Isolamento de amostras NAD-dependentes segundo o método e o local de isolamento em suínos sadios

Método	Local de Isolamento		
	Secreção nasal	Secreção tonsilar	Tecido tonsilar
1	3 (2,56%) cA	11 (9,40%) bA	39 (32,48%) aA
2	7 (5,98%) aA	16 (13,68%) aA	8 (6,84%) aB
3	2 (1,71%) bA	11 (9,40%) aA	6 (5,13%) aB

1-Método da semeadura direta em meio seletivo sólido-CVLB, 2- diluição e cultivo em meio seletivo líquido-LB e subcultivo em meio seletivo sólido-CVLB, 3- diluição e cultivo em meio seletivo líquido-LB e subcultivo direto em ágar sangue
Valores seguidos por letras distintas maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si (P<0,05)

Quando analisadas as amostras classificadas como *App* separadamente ([Fig. 1](#)), observa-se uma distribuição similar àquela das amostras NAD-dependentes. O método de isolamento variou de acordo com o local examinado, e nesse caso também o tecido tonsilar semeado diretamente em meio seletivo sólido, enriquecido com NAD, possibilitou o isolamento de maior número de amostras.

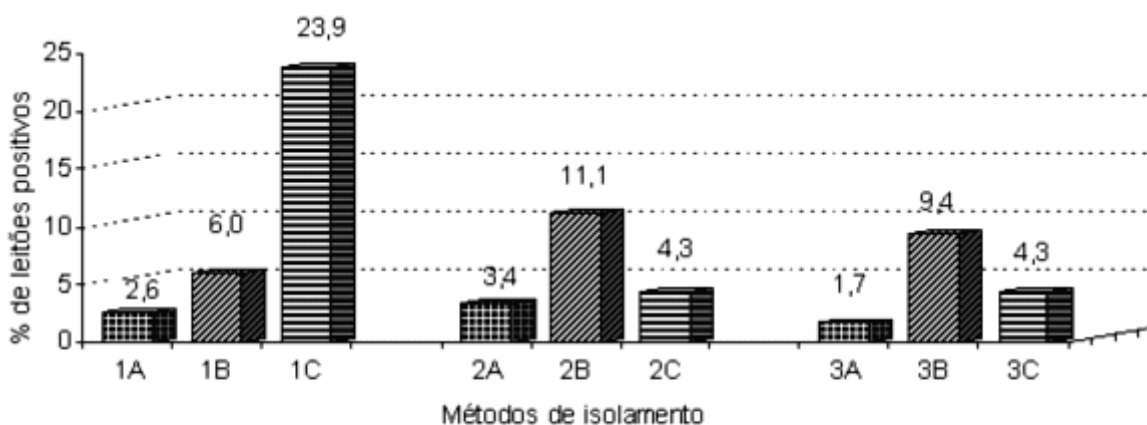


Figura 1. Porcentagem de animais positivos no isolamento de amostras classificadas como *App*, segundo o método e o local de isolamento: 1- semeadura direta em meio seletivo sólido-CVLB, 2- diluição e cultivo em meio seletivo líquido-LB e subcultivo em meio seletivo sólido-CVLB e 3- diluição e cultivo em meio seletivo líquido-LB e subcultivo direto em ágar sangue, e A- secreção nasal, B- secreção tonsilar e C- tecido tonsilar

O método 1 foi superior aos demais quando examinado o tecido tonsilar, e é mais simples no que diz respeito a processamento laboratorial, porém com coleta de material mais complexa. Não sendo possível a coleta do tecido tonsilar, a melhor alternativa seria coletar a secreção com suabe da superfície tonsilar (local b) e utilizar a diluição em LB e subcultivo posterior em CVLB (método 2). Observa-se que são os subcultivos que diferenciam os métodos 2 e 3 (no meio CVLB e no ágar sangue com estria de *S. aureus* fornecedora de NAD, respectivamente), e que o método 2 apresenta maior número de leitões com resultado positivo (P=0,054). Uma explicação poderia ser a limitação de NAD que é disponível em uma pequena superfície perto da estria da colônia fornecedora no método 3. No caso do cultivo em CVLB, essa disponibilidade abrange toda da superfície da placa.

CONCLUSÕES

O método mais eficaz de isolamento de amostras NAD-dependentes do trato respiratório superior de suínos portadores sadios foi o da biópsia de tecido tonsilar semeado diretamente em meio sólido seletivo. Amostras de App fazem parte da flora normal do trato respiratório superior dos suínos.

BIBLIOGRAFIA

BLANCHARD, P.C., WALKER, R.L., GARDNER, I. Pleuropneumonia in swine associated with a urease-negative variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1. *J. Vet. Diag. Inv.*, v.5, p.279-282, 1993. [[Links](#)]

BIBERSTEIN, E.L., GUNNARSSON, A., HURVELL, B. Cultural and biochemical criteria for the indentification of *Haemophilus* spp. from swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.7-11, 1977. [[Links](#)]

GUNNARSSON, A., BIBERSTEIN, E.L., HURVELL, B. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): agglutination reactions. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.1111-1114, 1977. [[Links](#)]

GUTIERREZ, C.B, TASCÓN, R.I., BARBOSA, J.I.R. et al. Characterization of V factor-dependent organisms of the family *Pasteurellaceae* isolated from porcine pneumonic lungs in Spain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.6, p.123-130, 1993. [[Links](#)]

HENNESSY, K.J., IANDOLO, J.J., FENWICK, B.W. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.1155-1159, 1993. [[Links](#)]

KILIAN, M., NICOLET, J., BIBERSTEIN, L. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* and proposal of a neotype strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.28, p.20-26, 1978. [[Links](#)]

KUME, K., NAKAI, T., SAWATA, A. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the cavities of healthy pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v. 46, p. 641-647, 1984. [[Links](#)]

LITTLE, T.W.A., HARDING, J.D.J. The interaction of *Haemophilus parahaemolyticus* and *Pasteurella multocida* in the respiratory tract of the pig. *Br. Vet. J.*, v.136, p.371-377, 1980. [[Links](#)]

- MITTAL, R.K., HIGGINS, R., LARIVIÈRE, S. Detection of type-specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae* - infected pigs by coagulation test. *J. Clin. Microbiol.*, v.18, p.1355-1357, 1983. [[Links](#)]
- MÖLLER, K., KILIAN, M. V Factor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p. 2711-2716, 1990. [[Links](#)]
- MORES, N., SOUZA, J.C.A, NOGUEIRA, R.H.G. Estudo experimental da pleuropneumonia suína causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp). Patogenicidade e evolução das lesões anátomo-patológicas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.36, p. 679-693, 1984. [[Links](#)]
- NICOLET, J. Sur l'hémophilose du porc. III. Différenciation sérologique de *Haemophilus parahaemolyticus*. *Zentralbl. Bacteriol. (A)*, v.216, p. 487-495, 1971.
- NICOLET, J. *Actinobacillus pleuropneumoniae* In: LEMAN, A.D. *Diseases of swine*. Ames: Iowa State University Press, 1992. p.401-413. [[Links](#)]
- NIELSEN, R. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 9. *Acta Vet. Scand.*, v.26, p.501-512, 1985a. [[Links](#)]
- NIELSEN, R. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 10. *Acta Vet. Scand.*, v.26, p.581-585, 1985b. [[Links](#)]
- NIELSEN, R. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.*, v.27, p.453-455, 1986a. [[Links](#)]
- NIELSEN, R. Serology of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. *Acta Vet. Scand.*, v.27, p.49-58, 1986b. [[Links](#)]
- NIELSEN, R., O'CONNOR, P.J. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. *Acta Vet. Scand.*, v.25, p.96-106, 1983. [[Links](#)]
- PIJOAN, C., MORRISON, R.B., HILLEY, H.D. Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter. *J. Clin. Microbiol.*, v.18, p.143-145, 1983. [[Links](#)]
- PIFFER, I.A., BRITO, M.A.V.P., BRITO, J.R.F. et al. D. E. Sorotipos de *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* isolados de suínos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.7, p.79-83, 1987. [[Links](#)]
- PIFFER, I.A., KLEIN, C., FÁVERO, M. et al. Caracterização bioquímica e sorológica de 55 amostras de *A. pleuropneumoniae* isoladas no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, p.123-129, 1997. [[Links](#)]
- RAPP, V.J., ROSS, R.F., ERICKSON, B.Z. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, p.185-192, 1985. [[Links](#)]
- ROSENDAL, S., BOYD, D.A. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, p.840-843, 1982 [[Links](#)]

ROSENDAL, S., MITCHELL, W. R. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs: a survey of Ontario pork producers, 1981. *Can. J. Comp. Med.*, v.47, p.1-5, 1983. [[Links](#)]

SAITO, A., LIMA, R.A.T., APOLLARO, R. et al. Isolation and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* (HPN) from nasal cavities or lungs of pigs In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY [[Links](#)] SOCIETY CONGRESS, 10, 1988, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro, IPVS, 1988. p.73. [[Links](#)]

SAS *User's guide*: Statistics, Version 5. Cary: SAS INSTITUTE 1990. 956p.

SIDIBÉ, M., MESSIER, S., LARIVIERE, S. et al. detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological test. *Can. J. Vet. Res.*, v.57, p.204-208, 1993. [[Links](#)]

SIROIS, M., HIGGINS, R. Biochemical typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, v.27, p. 397-401, 1991. [[Links](#)]

All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License

Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567
30123-970 Belo Horizonte MG - Brazil
Tel.: (55 31) 3409-2041
Tel.: (55 31) 3409-2042



abmvz.artigo@abmvz.org.br