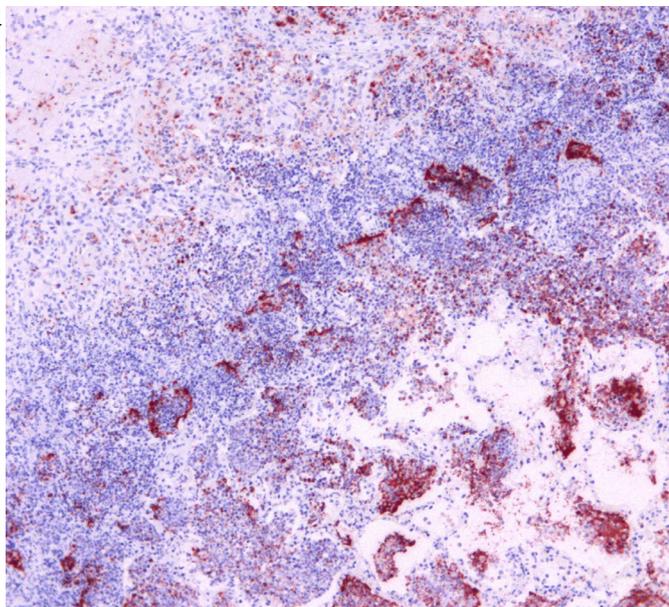


Foto: Marcos A. Z. Morés/Embrapa



***Pasteurella multocida* A como agente primário de pneumonia e serosites em suínos**

Nelson Morés¹
João Xavier de Oliveira Filho²
Marcos Antônio Zanella Morés³
Raquel Rebellato⁴
Catia Silene Klein⁵
Jalusa Deon Kich⁶
Arlei Coldebella⁷
David Emílio Santos Neves de Barcellos⁸

Introdução

Usualmente, a *Pasteurella multocida* sorotipo A (PmA) é considerada agente secundário às pneumonias provocadas por outros patógenos (Hansen et al., 2010). Todavia, em condições naturais, o agente também já foi associado a casos de pleurite, pericardite e septicemia (Pors et al., 2011), bem como pneumonia necro-hemorrágica, similar à causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, também denominada de “*A. pleuropneumoniae-like*” (Cappuccio et al., 2004). A maior dificuldade da comprovação da atuação primária de PmA está em reproduzir a doença na ausência de cofatores de infecção, sejam eles infecciosos ou não. Poucos trabalhos tiveram sucesso na reprodução de pneumonias, pleurisias e septicemias, e apenas com desafios repetidos via intranasal ou intratraqueal (Smith et al., 1973; Ono et al., 2003).

Nosso grupo teve sucesso no desenvolvimento dessas lesões em experimento piloto com PmA por inoculação intranasal (Kich et al., 2007), o que nos levou a pensar na existência de diferentes cepas dessa bactéria quanto à sua patogenicidade. O objetivo deste estudo foi investigar a virulência de diferentes isolados de PmA em suínos.

Pesquisa desenvolvida

O experimento foi conduzido na Embrapa Suínos e Aves, em acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (CEUA/CNPISA - Protocolo 005/2010). Foram utilizados 76 suínos com peso médio de 74 kg e idade média de 120 dias, obtidos de um rebanho experimental da Embrapa, Concórdia, SC, comprovadamente livre dos principais patógenos respiratórios, entre eles PmA.

¹ Médico-veterinário, mestre em Patologia, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

² Médico-veterinário, doutor em Ciências Veterinárias, Nova Mutum, MT

³ Médico-veterinário, mestre em Ciências Veterinárias, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

⁴ Farmaceutica, especialização em Microbiologia, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

⁵ Bióloga, mestre em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

⁶ Médica-veterinária, doutora em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

⁷ Médico-veterinário, doutor em Ciência Animal e Pastagens, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

⁸ Médico-veterinário, doutor em Microbiologia, professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

Oito diferentes cepas de PmA, isoladas de suínos com doença respiratória de diferentes regiões do Brasil, previamente submetidas à detecção de genes associados à virulência (VGAs), foram utilizadas para reprodução experimental da doença utilizando suínos como modelo animal (Tabela 1). O desafio dos animais foi realizado com 3,0 mL de cultivo da respectiva bactéria por gotejamento intranasal. Os suínos foram avaliados clinicamente (temperatura retal, sinais de dificuldade respiratória e tosse) duas vezes por dia e eutanasiados no 5º dia pós-inoculação (5dpi) para avaliação das lesões e colheita de materiais para exames laboratoriais. A eutanásia por eletrocussão e a necropsia foram realizadas no 5º dpi. Porém, os animais com sinais clínicos acentuados foram eutanasiados antes do 5º dpi por razões de bem-estar animal. No laboratório foram realizados exames histopatológico, bacteriológico e de imunohistoquímica para PmA.

Análise dos dados

Associações entre os sinais clínicos observados e lesões macroscópicas, observadas nos diferentes grupos, foram analisadas pelo teste exato de Fisher. O software estatístico adotado foi o SAS versão 9.2 (2008).

Resultados

Sinais clínicos

Os sinais clínicos mais relevantes foram: febre (temperatura retal $\geq 40^\circ\text{C}$) e dificuldade respiratória, com maior intensidade e prevalência nos suínos dos grupos G1, G3 e G7 ($p \leq 0,001$). A ocorrência de tosse foi um evento esporádico e irrelevante. Os suínos dos grupos G0 (controle), G6 e G8 não apresentaram alterações clínicas. Dezenove animais dos grupos desafiados foram eutanasiados antes do 5º dpi por apresentarem sinais clínicos acentuados.

Lesões

Houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na frequência e gravidade das lesões macroscópicas (Tabela 1). Os suínos dos grupos G1, G3 e G7 foram os mais afetados, enquanto que nos do G0 (controle) G6 e G8 nenhum suíno adoeceu. Nos demais grupos (G2 e G4) poucos animais adoeceram. As principais alterações observadas foram: pleurite fibrinosa difusa (Figura 1) ou focal (Figura 2), com ou sem pneumonia e/ou pericardite fibrinosa (Figura 3). Diversos animais apresentaram pneumonia fibrinonecro-hemorrágica com pleurite subjacente, lesão *App like* (Figura 4), caracterizada por necrose de coagulação do parênquima pulmonar, com exsudação inflamatória supurativa. Alguns animais apresentaram apenas pequenas áreas de consolidação pulmonar (Figura 5).

Além das lesões nos pulmões, pleura e pericárdio, alguns animais, também, apresentaram peritonite (Figura 6), hepatite necrótica, infarto esplênico, nefrite e otite interna. Nos suínos dos grupos G0, G6 e G8 não foram observadas lesões.

Tabela 1. Gravidade e número de suínos que adoeceram em cada grupo experimental.

Tipo de lesões	Grupo experimental								
	G0 ^a	G1 ^d	G2 ^{bc}	G3 ^d	G4 ^a	G5 ^{bc}	G6 ^{ab}	G7 ^{cd}	G8 ^{ab}
Sem alterações	12	0	4	0	7	5	8	1	8
Totais doentes	0	8	4	8	1	3	0	7	0
Lesões discretas	0	2	3	1	1	1	0	3	0
Lesões graves	0	6	1	7	0	2	0	4	0
Total de suínos	12	8	8	8	8	8	8	8	8

Grupos seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P \leq 0,05$) teste exato de Fisher.



Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 1. Pulmão de suíno do G1. Exsudação serofibrinosa difusa sobre o pulmão e pericárdio (pleurite e pericardite fibrinosa difusa).

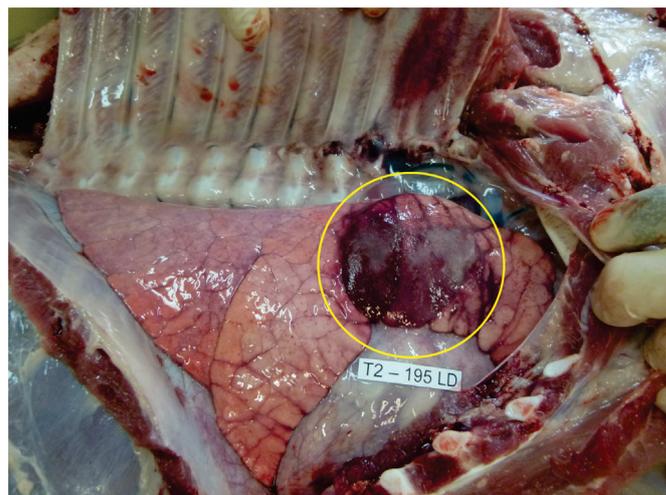


Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 4. Pulmão de suíno do G2. Área de pleuropneumonia fibrinosa (lesão *App like*) no lobo cardíaco direito (círculo).

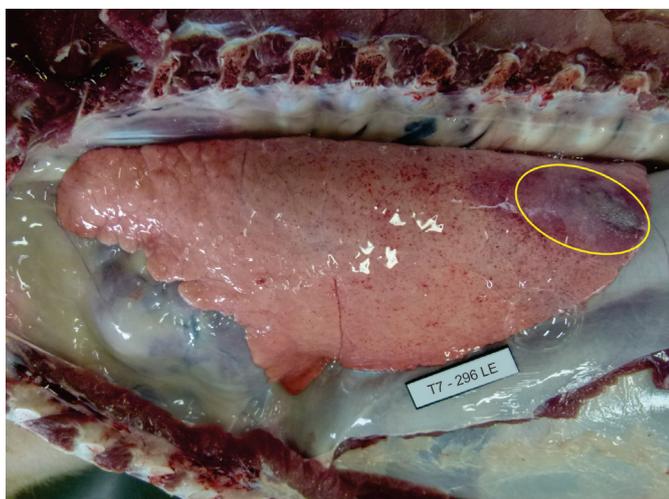


Foto: Nelson Morés/Embrapa

Figura 2. Pulmão de suíno do G7. Deposição de fibrina na superfície dorsal do lobo diafragmático esquerdo (elipse) (pleurite fibrinosa focal).

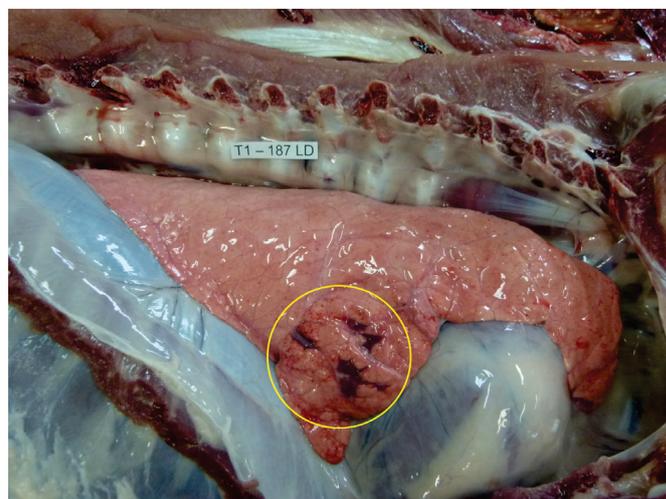


Foto: Nelson Morés/Embrapa

Figura 5. Pulmão de suíno do G1. Pequenas áreas de pneumonia no lobo cardíaco direito (círculo).



Foto: João X. de Oliveira Filho

Figura 3. Cavidade torácica de suíno do G4. Severa deposição serofibrinosa no saco pericárdico e sobre o coração (pericardite serofibrinosa difusa).

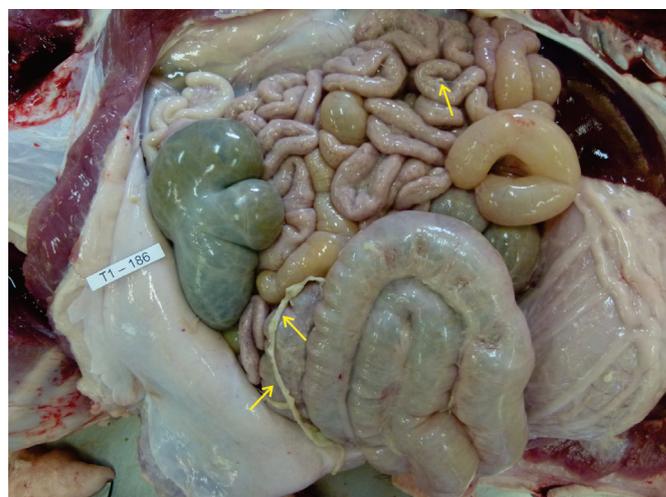


Foto: João X. de Oliveira Filho

Figura 6. Cavidade peritoneal de suíno do G1. Cordões de fibrina (setas) sobre as vísceras abdominais (peritonite fibrinosa discreta).

Em resumo, foram observados três padrões de lesões distintos, associados ou não entre si:

- Broncopneumonia fibrinonecrótica com pleurite fibrinosa.
Pleurite fibrinosa, associada ou não com pericardite e peritonite.
- Pleuropneumonia necrossuprativa focal, geralmente no lobo cardíaco direito.

IHQ

A marcação de PmA foi detectada em grande quantidade nas áreas de necrose do parênquima pulmonar (Figura 7), no citoplasma de células fagocitárias, livres no exsudato inflamatório no parênquima pulmonar e no exsudato fibrinosuprativo da pleura e pericárdio. Houve marcação moderada no citoplasma de macrófagos e no exsudato necrótico no interior das criptas das tonsilas e em macrófagos e neutrófilos dos linfonodos mediastínicos. Nos rins, baço e fígado (Figura 8) a marcação foi apenas discreta, geralmente no interior de macrófagos. Em uma área de infarto séptico no baço houve intensa marcação da bactéria. Além disso, PmA também foi encontrada, em pouca quantidade, no interior de vasos sanguíneos no pulmão, coração, linfonodos mediastínicos e baço de alguns animais.

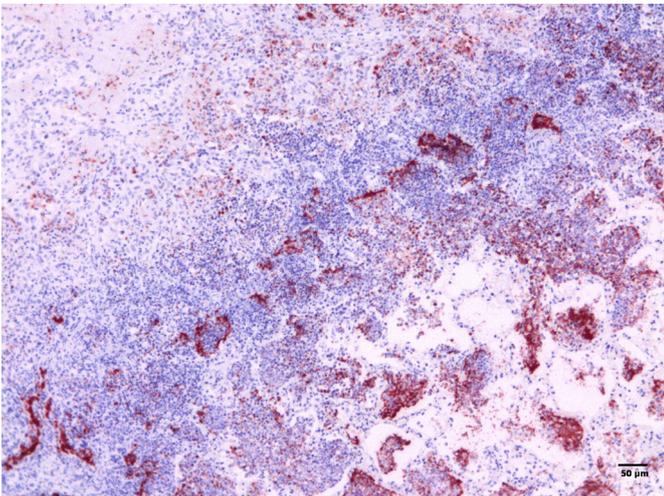


Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 7. Pulmão de suíno do G3. Imuno-histoquímica com acentuada marcação de antígeno de *P. multocida A* (cor vermelha) em área de inflamação e necrose do tecido pulmonar.

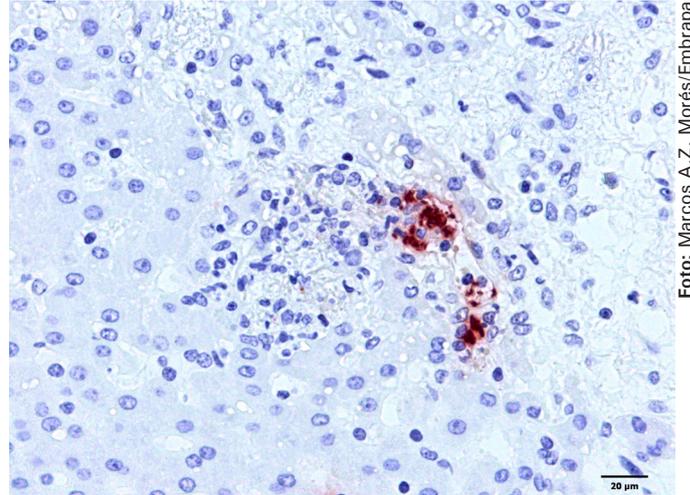


Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 8. Fígado de suíno do G7. Imuno-histoquímica com marcação de antígeno de *P. multocida A* (cor vermelha) em foco de necrose e inflamação hepática.

Recuperação de PmA

A recuperação de PmA nos tecidos foi diferente entre os grupos ($p \leq 0,05$), com maior frequência nos animais dos grupos G1, G3 e G7 e de tecidos lesados da cavidade torácica (Tabela 2). Fora da cavidade torácica, a bactéria foi isolada no fígado, baço e rim de animais dos grupos G1, G3, G5 e G7, da articulação tíbio-tarso-femoral em dois animais (G5 e G7) e no exsudato purulento do ouvido interno nos dois animais do G7 que apresentaram sinais clínicos de otite. A bactéria não foi recuperada dos animais dos grupos G0, G6 e G8.

Tabela 2. Isolamento da *P. multocida A* dos diferentes grupos experimentais (G0: 12 suínos; G1 a G8: oito suínos cada grupo).

Reisolamento da <i>P. multocida</i>	Grupo experimental								
	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Número de suínos	0 ^a	8 ^d	3 ^{bc}	8 ^d	1 ^{ab}	3 ^{bc}	0 ^{ab}	7 ^{cd}	0 ^{ab}

Números seguidos de letras diferentes diferem entre si ($P \leq 0,05$) teste exato de Fisher.

Comentários

O quadro clínico-patológico que melhor caracterizou a doença nos suínos desafiados foi febre e dispneia, associado a lesões pulmonares e/ou serosites. Tradicionalmente, PmA é considerada agente secundário no complexo de doenças respiratórias dos suínos, especialmente associada ao agravamento da consolidação pulmonar causada pelo *M. hyopneumoniae* (Hansen et al., 2010). Neste trabalho, demonstrou-se que algumas cepas de PmA foram capazes de induzir pneumonia, serosite e septicemia em suínos, sem interferência de outro agente patogênico. Todavia, outras cepas foram apatogênicas, comprovando a existência de variabilidade entre os isolados. Em algumas regiões do Brasil ocorrem problemas respiratórios severos, caracterizados por febre, dispneia, serosites e pneumonia na terminação, com isolamento de PmA, associada ou não a outros agentes. Nestes casos, fica a dúvida sobre qual a importância patológica da PmA no desenvolvimento dessas lesões. Em alguns casos, como observado em alguns suínos neste estudo, lesões de pleuropneumonia necro-hemorrágica em suínos, referidas como "*A. pleuropneumoniae like*", já foram comprovadamente associadas a cepas de PmA (Cappuccio et al., 2004; Kich et al., 2007).

Considerando os resultados clínicos e patológicos obtidos com os oito isolados de PmA testados, três perfis foram encontrados:

- Cepas muito patogênicas (G1, G2, G3 e G7).
- Pouco patogênicas (G4 e G5).
- Apatogênicas (G6 e G8).

Pela análise dos VGAs não houve diferença no perfil genético entre os oito isolados testados. Também, nenhum destes genes foi associado às lesões necro-hemorrágicas e às serosites encontradas nesse trabalho. Portanto, ainda não estão claros quais fatores estão associados à virulência da PmA na indução de pneumonia e serosite em suínos (Bethe et al., 2009). A provável razão da variabilidade patogênica pode estar na diferença genética entre as cepas, (Pors et al., 2011). É possível que cepas de PmA, geneticamente diferentes, o que necessita de comprovação,

estão circulando nos rebanhos brasileiros de suínos, sendo algumas destas capazes de atuar como causa primária de pneumonias, serosites e septicemia.

Alguns animais apresentaram pleurite fibrinosa, associada ou não a pericardite fibrinosa, sem lesão no parênquima pulmonar. Isso demonstra o tropismo da bactéria por serosas, semelhante ao que ocorre com a doença de Glässer causada por *Haemophilus parasuis* (Vahle et al., 1995). Tal fato é relevante, pois pode explicar parte das pleurites e pericardites crônicas observadas no abate. Por isso, nos casos de serosites e pneumonia hemorrágica é imprescindível confirmar o diagnóstico etiológico por exames laboratoriais. O isolamento de PmA da pleura ou pericárdio (sítios não respiratórios) com lesões é fundamental para o diagnóstico, uma vez que ainda não se dispõe de ferramentas para diferenciar cepas patogênicas das não patogênicas.

Nesse estudo, demonstramos a existência de amostras de PmA no rebanho suíno brasileiro com capacidade de pneumonia, serosites e nódulos necro-hemorrágicos no pulmão, sem associação com co-fatores.

Recomendações

Em caso de um surto de doença respiratória em suínos em terminação, para confirmar o envolvimento da PmA, recomenda-se:

- Fazer necropsia de um ou dois suínos com sinais de pneumonia (febre, anorexia e dificuldade respiratória) que não tenham sido medicados com antimicrobianos.
- No caso de serosites, colher material (exsudato em seringa ou suabe envolto em fibrina) e enviar, em caixa de isopor com gelo, ao laboratório para isolamento bacteriano.
- Na presença de nódulo necro-hemorrágico, colher o nódulo em saco plástico e enviar ao laboratório em gelo para isolamento bacteriano.

- Quando houver lesão no pulmão, colher também material em formol 10% para exame histológico e IHQ.
- Quando for observada apenas aderência de pleura e/ou pericárdio no abate, sem nódulo de necrose pulmonar, é preciso retornar às propriedades para colher amostras de animais na fase aguda da doença, conforme acima descrito.

Referências

BETHE, A.; WIELER, L. H.; SELBITZ, H.; EWERS, C. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 97-105, 2009.

CAPPUCCIO, J.; LEOTTA, G. A.; VIGO, G.; MOREDO, F.; WOLCOTT, M. J.; PERFUMO, C. J. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs with bronco and pleuropneumonia. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg: IPVS, 2004.

HANSEN, M. S.; PORS, S. E.; JENSEN, H. E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS, E. M.; NIELSEN, O. L. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, p. 120-131, 2010.

KICH, J. D.; MORES, N.; TRIQUES, N. J.; NOGUEIRA, M. G.; LOCATELLI, C.; KLEIN, C. S.; FELICIO, R. P. **A Pasteurella multocida tipo A atua como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos?** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. 7 p. (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 469).

ONO, M.; OKADA, M.; NAMIMATSU, T.; FUJII, S.; MUKAI, T.; SAKANO, T. Septicaemia and arthritis in pigs experimentally infected with *Pasteurella multocida* capsular serotype A. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 251-258, 2003.

PORS, S. E.; HANSEN, M. S.; BISGAARD, M.; JENSEN, H. E. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. **Veterinary Microbiology**, v. 150, p. 160-166, 2011.

SMITH, I. M.; BETTS, A. O.; WATT, R. G.; HAYWARD, A. H. S. Experimental infections with *Pasteurella multocida* (sero-group A) and an adeno-or enterovirus in gnotobiotic piglets. **Journal of Comparative Pathology**, v. 83, p. 1-12, 1973.

VAHLE, J. L.; HAYNES, J. S.; ANDREWS, J. J. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 476-480, 1995.

Comunicado Técnico, 534

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves
Endereço: BR 153, Km 110,
Distrito de Tamanduá, Caixa Postal 321,
89.715-899, Concórdia, SC
Fone: 49 3441 0400
Fax: 49 3441 0497
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



1ª edição
Versão Eletrônica: (2016)

Comitê de Publicações

Presidente: Marcelo Miele
Membros: Airtton Kunz, Ana Paula A. Bastos, Gilberto S. Schmidt, Gustavo J.M.M. de Lima e Monalisa L. Pereira
Suplente: Alexandre Matthiensen e Sabrina C. Duarte

Revisores Técnicos

Luizinho Caron e Rejane Schaefer

Expediente

Coordenação editorial: Tânia M.B. Celant
Editoração eletrônica: Vivian Fracasso
Normalização bibliográfica: Cláudia A. Arrieche
Revisão gramatical: Lucas S. Cardoso