



## ***Actinobacillus pleuropneumoniae*: uma nova visão no diagnóstico**

### *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a new look on the diagnosis

**Gustave Decuadro-Hansen<sup>1</sup>, Jorge Werlang<sup>2</sup> & Eduardo Wollmann<sup>2</sup>**

#### **INTRODUÇÃO**

A Pleuropneumonia suína, causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), é uma doença respiratória grave caracterizada por broncopneumonia fibrino-hemorrágica e necrosante com exsudação de fibrina na fase aguda e aderências firmes de pleura (pleurite adesiva) com formação de nódulos de pneumonia no parênquima pulmonar adjacente na fase crônica. Em estudo conduzido por Mores [24], lesões de nódulos necróticos ocorreram em 26,7% dos pulmões obtidos em período correspondente ao inverno e tiveram isolamento de *Pasteurella multocida* tipo A e App como principais agentes envolvidos.

As conseqüências das infecções ao App variam em função da virulência da cepa implicada e dos fatores intercorrentes de risco na granja (infecções concomitantes, problemas de manejo, tratamentos, etc). Em numerosos casos, as infecções não se traduzem por nenhum sinal clínico evidente. Em outros casos, elas provocam uma pleuropneumonia severa, unilateral ou bilateral, afetando entre outros os lóbulos diafragmáticos na área craniodorsal e que podem levar a morte dos animais em pouco tempo na ausência do tratamento apropriado. A forma crônica se caracteriza pela presença de focos fibrino-necróticos originados a partir dos focos de pleuropneumonia aguda. A forma crônica da doença é freqüente em granjas que apresentaram surtos da forma aguda e onde tratamentos antibióticos, ou programas de vacinação foram empregados, ou ainda se a cepa implicada é menos virulenta. As conseqüências econômicas ligadas à doença são relativas à mortalidade, ao atraso no crescimento, à condenação de carcaças nos abatedouros e às despesas veterinárias (antibióticos, vacinas, vacinas autógenas) que correspondem. Os impactos da doença sobre o desempenho zootécnico são ainda controversos [1, 18]. No Brasil, num estudo de Silva *et al.* [29], 69% dos suínos abatidos apresentavam lesões pneumônicas. Dentre as pneumonias bacterianas, o App é junto com a doença de Glasser uma das mais importantes em todo o mundo. A prevalência do agente etiológico no Brasil foi de 42,86%, determinada através da inibição da hemolisina.

A principal fonte de contaminação por App é a introdução de animais provenientes de granjas infectadas sem apresentar sinais clínicos evidentes ou lesões características. Entretanto certos estudos supõem que a transmissão indireta de organismos pode ser responsável por um número não negligenciável de casos clínicos [9, 15, 30]. Muitos esforços de pesquisas foram feitos nestes últimos anos para desenvolver e validar técnicas que permitem identificar os rebanhos infectados de forma subclínica. A utilização dessas técnicas em programas de vigilância de rebanho de reprodutores permite avanços importantes no diagnóstico e na prevenção de infecções por App.

#### **BIOTIPOS (OU BIOVARES) E SOROTIPOS (OU SOROVARES)**

A noção de biotipos faz referência a certas características fisiológicas das bactérias. No caso do App trata-se da sua capacidade de se desenvolver nos meios de cultura bacteriana na ausência de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) ou fator V. Por convenção, as cepas incapazes de se desenvolver em meios desprovidos de NAD pertencem ao biotipo 1, enquanto que as outras pertencem ao biotipo 2. O número de App é grande nas lesões agudas, sendo fácil o isolamento por meio da sementeira direta em placas de ágar sangue com estria perpendicular de colônia fornecedora de NAD [4]. Nos casos crônicos (pleurisias) o isolamento é geralmente negativo, e outras

<sup>1</sup>CEVA Santé Animale. Libourne/France. <sup>2</sup>CEVA Saúde Animal Ltda. São Paulo, SP/Brasil. CORRESPONDÊNCIA: G.D. Hansen [gedh61@gmail.com].

bactérias podem exercer um efeito inibidor sobre o crescimento do App.

A maior parte das cepas de campo pertencem ao biótipo 1 (NAD-dependente). Esta característica é levada em conta por laboratórios de diagnóstico que utilizam meios de cultura enriquecidos em fator V durante a pesquisa de App. A dependência ao fator V constitui igualmente um critério importante de identificação do App. As cepas que pertencem ao biótipo 2 são mais raras e sua independência em relação ao fator V pode conduzir a erros de identificação (confusão com outras bactérias aparentes).

A noção de “sorotipo” se refere às características antigênicas das bactérias. Em relação ao App esses antígenos são constituídos de moléculas situadas na superfície das bactérias, no nível da cápsula (antígenos capsulares). Na prática a determinação do sorotipo faz referência a anticorpos específicos (antisoros preparados em coelhos ou anticorpos monoclonais preparados em ratos) fornecidos por laboratórios de referência com técnicas (coaglutinação, imunodifusão, etc.) reservadas a laboratórios especializados. Reconhece-se atualmente 15 sorotipos de App baseados nas diferenças dos antígenos capsulares. Os diferentes sorotipos de App são capazes de secretar três exotoxinas: ApxI, ApxII, ApxIII. ApxI é fortemente hemolítica e citotóxica, ApxII é fracamente hemolítica e moderadamente citotóxica e ApxIII não é hemolítica, mas citotóxica. A patogenicidade do App é multifatorial, ou seja, é dependente de diversas características tais como componentes estruturais (polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeos ou LPS, proteínas de superfície) e toxinas extracelulares, que apresentam papel importante no desenvolvimento da doença e produzem resposta imunoprotetora.

Estes antígenos são utilizados em certas provas sorológicas (ex. ELISA de cadeia longa de LPS ou LC-LPS) a fim de detectar a presença eventual de anticorpos nos soros animais.

## 1 App biótipo 1: um clássico

Até recentemente, se conhecia 12 sorotipos dentro do biótipo 1 (sorotipo de 1 a 12). Notou-se que o sorotipo 5 foi dividido em sorotipo 5a e 5b; esta sub divisão não é sempre efetuada em todos os laboratórios, mas sua importância é relativa uma vez que os dois subtipos possuem o mesmo poder patogênico. Recentemente, verificou-se a existência de um novo sorotipo, o sorotipo 15 (os sorotipos 13 e 14 pertencem ao biótipo 2) o sorotipo 15 do App parece ser mais freqüente na Austrália [5].

As questões seguintes são freqüentemente colocadas em relação ao biótipo 1:

### a) Todos os sorotipos de App são patogênicos?

A distribuição dos sorotipos isolados em casos clínicos varia segundo as regiões. Na América do Norte, por exemplo, os sorotipos mais constantes implicados em surtos clínicos são os sorotipos 1, 5 e 7; os sorotipos ou sorogrupos 3,6,8, até aqui com pouca importância do ponto de vista clínico tem também ocorrido de forma emergente nos últimos anos. Na França os sorotipos 2, 9, 11, 3, 6 e 8 são os mais freqüentemente isolados de casos patológicos. No Brasil, os sorotipos mais importantes são o 5, 3, 6 e 10, embora a grande maioria dos sorotipos tenha sido isolada de casos clínicos [12]. Entretanto isto não permite afirmar que os demais sorotipos não sejam patogênicos. Estes sorotipos estão constantemente presentes em rebanhos convencionais com ausência de sinais clínicos. Em geral isso não representa um problema maior. Entretanto, em certas circunstâncias estes sorotipos podem ser responsáveis por sinais clínicos algumas vezes acompanhados de mortalidade súbita. Em regra geral trata-se de casos esporádicos, como ocorre atualmente com o sorotipo 12 na América do Norte.

### b) O “poder patogênico” pode variar entre cepas de um mesmo sorotipo?

Sim. Um bom exemplo é o sorotipo 2. Este sorotipo é um dos mais frequentes isolados de casos clínicos na França. As cepas francesas são muito virulentas nas infecções experimentais. Entretanto o sorotipo 2 é raramente isolado a partir de animais doentes na América do Norte, apesar de estar presente em rebanhos clinicamente sadios [G.D. Hansen, resultados não publicados].

Tem-se estabelecido que as cepas “francesas” de sorotipo 2 produzem 2 toxinas (ApxII e ApxIII) enquanto que as americanas somente produzem ApxII. Os outros fatores de virulência (LPS, cápsulas, etc) desses dois tipos de cepas, parecem ser muito similares. A diferença, ligada a produção de toxina ApxIII, poderia então ser suficiente para colocar a hipótese que as cepas americanas são menos virulentas. A infecção experimental dos leitões livres de organismos patogênicos específicos (SPF) por uma das cepas não provocou sinais clínicos nem lesões, o que corrobora a hipótese [G.D. Hansen, resultados não publicados]. O efeito dose tem igualmente um papel importante

no desenvolvimento de sinais clínicos. Infecções experimentais efetuadas em leitões SPF com doses baixas de uma cepa patogênica de App, não induziram manifestações clínicas da doença [G.D. Hansen, resultados não publicados].

*c) Sorotipos (patogênicos) podem estar presentes em granjas sem a ocorrência de sinais clínicos?*

Sim, existem numerosos rebanhos infectados por sorotipo 2 ou 9 na França ou por sorotipos 1,5 ou 7 no Canadá que não apresenta sinais clínicos evidentes [20]. Estes rebanhos, que não utilizam em forma sistemáticas medidas para prevenir a doença ou detectar a presença da bactéria, alojam portadores assintomáticos que podem não manifestar a doença durante anos. Entretanto, episódios agudos de pleuropneumonia podem acontecer ocasionalmente seguidos de infecções intercorrentes (como por exemplo, a circovirose) ou erros no manejo (alta densidade e falta de higiene em baias, ventilação indevida, regras de higiene não respeitadas, etc.) Curiosamente não foi possível demonstrar cientificamente uma influência do vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRS) sobre episódios de pleuropneumonia [27]. Entretanto, as observações de veterinários sugerem a existência desta correlação no campo. Em muitos países erroneamente existe ainda a tendência de considerar rebanhos positivos aqueles que eventualmente apresentam sinais clínicos ou lesões da doença.

*d) Uma cepa pode ser mais ou menos “patogênica” entre granjas?*

Sim. Infecções experimentais de leitões com uma dose padronizada de uma mesma cepa de App sorotipo 1, geraram taxas de mortalidade de 5% a 50% [21,26]. Como explicar tal diferença? No primeiro caso, (5% de mortalidade) os animais vinham de um rebanho livre de App sorotipo 1, mas estavam infectados por outros sorotipos “menos patogênicos”, enquanto que no segundo caso eles provêm de um rebanho isento de todos os sorotipos de App. A infecção prévia dos animais por sorotipos poucos patogênicos, pode conferir certo grau de imunidade contra outros sorotipos mais patogênicos. Do contrário, animais que jamais foram expostos ao App, seriam provavelmente altamente sensíveis.

Isto pode, em parte, explicar que em certos rebanhos a presença de sorotipos “patogênicos” não se traduz por sinais clínicos e que, além disso, a introdução de tais animais nos rebanhos isentos de App pode provocar a aparição de sinais clínicos nos animais da granja. Inversamente, suínos isentos de App introduzidos em rebanhos infectados sem sinais clínicos podem muito rapidamente apresentar sintomas e lesões de pleuropneumonia, inclusive em animais adultos.

## **2 App biótipo 2: Um novo biótipo ou um antigo App que retorna?**

Tem se isolado cepas de App biótipo 2 depois de vários anos, sobretudo na Europa. As cepas desse biótipo são consideradas geralmente como menos patogênicas. Entretanto recentemente, Maldonado *et al.* [22] relataram isolar cepas de App biótipo 2 a partir de casos clínicos graves de pleuropneumonia suína na Espanha. Gambade & Morvan [17] também relataram alta mortalidade causada por cepas de App do biótipo 2 na França. Na América do Norte somente existe uma publicação de isolamento deste biótipo [14]. Entretanto, as cepas do biótipo 2 são cada vez mais freqüentemente isoladas de casos clínicos de campo no oeste do Canadá [H. Morvan, comunicação pessoal].

Mesmo se as razões de emergência de cepas de biótipo 2 são desconhecidas, é conveniente que os laboratórios de diagnósticos pesquisem os dois biótipos do App.

A distribuição dos sorotipos pertencentes a este biótipo é menos clara. Inicialmente, as cepas de biótipo 2 foram associadas ao mesmo sorotipo que as cepas do biótipo 1, tais como os sorotipos 2, 4, 7 ou 9. Um sorotipo dado pode compreender cepas dos dois biótipos. Na última década, dois novos sorotipos foram oficializados (sorotipos 13 e 14) [14,25]. As cepas originadas desses dois sorotipos pertencem ao biótipo 2. A distribuição desses sorotipos ainda é desconhecida.

A maioria das cepas do biótipo 2 isoladas na Espanha por Maldonado *et al.* [22] foram sorotipadas na Universidade de Montreal e classificadas como sorotipo 13.

Foram recentemente publicados casos clínicos atípicos induzidos por cepas de APP com alta mortalidade em granjas de suínos nos EUA. Esta cepa pertence ao biótipo 2 e não corresponde a nenhum dos 15 sorotipos conhecidos.

## **A SOROLOGIA COMO FERRAMENTA PARA DETERMINAR O ESTADO DE UM REBANHO DE SUÍNOS SEM SINAIS CLÍNICOS: AINDA TEMOS DÚVIDAS?**

A pesquisa de anticorpos (sorologia) é muito utilizada nos programas de vigilância sanitária das granjas multiplicadoras de leitoas e machos de reposição. A sorologia para o App está baseada na detecção de anticorpos contra os antígenos bacterianos de superfície (LPS, cápsula) ou das toxinas (Apx), ou ambas [7]. Atualmente nos preocupamos em validar a utilização do colostro como amostra para efetuar a pesquisa de anticorpos frente a diferentes agentes patogênicos, incluindo o App. Os resultados preliminares parecem indicar uma sensibilidade e uma especificidade muito similares àquelas obtidas com o soro, oferecendo uma grande flexibilidade (amostras tiradas pelos suinocultores e conservadas no congelador).

A sorologia permite também a confirmação da presença de uma infecção persistente em um rebanho, através da pesquisa de anticorpos em leitões, a fim de estudar a permanência de anticorpos de origem materna (quatro a oito semanas segundo o teste utilizado) e de determinar o melhor momento da vacinação (para evitar uma interferência com os anticorpos de origem materna).

Ela pode também ser utilizada para avaliar o sucesso de um programa de erradicação. Geralmente, os anticorpos circulantes são detectados três a quatro semanas após a infecção. A persistência dos anticorpos App é desconhecida, pois poucos estudos foram realizados sobre esse assunto. Certas observações sugerem que os anticorpos são detectados até o fim do período de engorda ou além desse período [6,8]. A soropositividade dos suínos no fim da engorda traduz a presença de uma infecção ativa de App na granja avaliada. Contudo, a vacinação pode também conduzir a produção de anticorpos circulantes, que variam segundo as vacinas e a técnica de sorologia utilizada.

O método ELISA, o mais empregado no Canadá, na França e na Dinamarca, se baseia na utilização como antígenos de cadeias longas de LPS de App (ELISA-LPS-LC) [11, 18]. Dispomos atualmente de antígenos específicos de sorotipos 2, 5, 10 ou 12 e de sorogrupos 1-9-11, 4-7 e 3-6-8.

Excepcionalmente, as cepas não patogênicas que pertencem a uma espécie bacteriana bioquimicamente e antigenicamente similares mais geneticamente diferentes de App podem colonizar certos animais e provocar uma fraca resposta sorológica face ao sorogrupo 1-9-11 [19]. Em geral, uma pequena porcentagem da população é considerada de “status” duvidoso ou positivo, com presença de títulos pouco elevados. Foi estudado recentemente uma cepa atípica de App sorotipo 1 que não possui LC-LPS, não gerando anticorpos detectáveis pelo teste ELISA –LPSLC [G.D. Hansen, resultados não publicados]. Contudo, este tipo de cepa (isolada em 1991) no qual a origem é provavelmente uma mutação pontual jamais foi encontrada em outros estudos.

Recentemente, foi desenvolvido um teste ELISA (Idexx Bommeli, USA) permitindo detectar os anticorpos dirigidos contra a toxina ApxIV. A toxina APX IV exclusiva de App é produzida somente in vivo e secretada por todos os sorotipos da bactéria [28]. Dessa forma, esse teste permite detectar indistintamente as infecções por todos os sorotipos de App [10] e distingue animais infectados dos vacinados. Pode-se concluir que os suínos com “Apx IV circulante” foram infectados até que se prove o contrário. Este teste, contudo, não foi validado em grande escala e apresentou em algumas granjas, “falsos positivos” sem explicação concreta [7]. Em que momento deveríamos utilizar esses testes? Diferentes opções são sugeridas no Quadro 1. Cada teste pode ter uma utilização diferentemente em função dos objetivos pesquisados. É importante lembrar que raros são os rebanhos que não são infectados por um ou vários sorotipos de App. É então normal encontrar dentro desses rebanhos anticorpos contra os sorotipos presentes e contra a toxina ApxIV.

## **ACHAR O APP EM SUÍNOS PERTENCENTES A UM REBANHO COM SUSPEITA DE ESTAR INFECTADO**

A sorologia constitui a melhor ferramenta para descobrir um rebanho infectado na ausência de sinais clínicos e de lesões no abatedouro (método barato e de boa sensibilidade). A prevalência de animais reagentes para um sorotipo dado pode ser fraca e ela pode variar segundo a idade dos animais e tempo de infecção, é então importante examinar um número suficiente de animais e não diagnosticar o rebanho como negativo após um só resultado sorológico negativo. Em alguns momentos a sorologia oferece resultados de difícil interpretação, como por exemplo, uma baixa prevalência de títulos baixos em um dado rebanho.

**Quadro 1.** Utilização dos testes Elisa LC-LPS e APX IV para o APP em diferentes situações.

<b>Situação</b>	<b>ELISA LC-LPS</b>	<b>Comentários</b>	<b>ELISA Apx IV</b>	<b>Comentários</b>
Diagnóstico de Infecção a App (presença de sinais clínicos)	Sim	Nos casos onde se procede ao isolamento, (indica-se) a sorologia não é necessária. Entretanto, em casos raros onde o isolamento não é disponível, a sorologia pode confirmar que o problema é App, utilizando 2 coletas sanguíneas com 3-4 semanas de intervalo. Entretanto, será preciso testar vários sorotipos para confirmar tornando a técnica bastante dispendiosa	Sim	Não permite precisar os sorotipos presentes na granja, entretanto em casos raros onde o isolamento não é disponível, poderá confirmar que o problema é App, utilizando 2 coletas sanguíneas com 3-4 semanas de intervalo.
Diagnóstico de infecção a App (ausência de sinais clínicos, vigilância epidemiológica)	Sim	É preciso focar os sorotipos importantes. Ex. 2 e 9/11	Não	A presença freqüente de sorotipos "não patogênicos" complica o diagnóstico.
Vigilância dos rebanhos considerados negativos a todos os sorotipos	Sim (mas...)	Muito caro, pois precisa vários testes para cada soro, e mais, o teste não é disponível para todos os sorotipos	Sim (mas...)	Principal indicação desse teste; deve ser validado sobre um número suficiente de animais. Cuidado em caso de cepa de baixa virulência o teste será positivo
Resposta sorológica a vacinação com bacterinas	Sim	Certas vacinas induzem a uma sutil resposta sorológica com o teste	Não	As bacterinas não induzem anticorpos contra Apx IV
Interferência de anticorpos maternos na vacinação (bacterinas)	Não	Deve-se focar o sorotipo	?	Não existem dados disponíveis
Resposta sorológica a vacinação a base de toxinas	Não	Este teste não detecta os anticorpos dirigidos contra as toxinas	Não	As vacinas unitárias atuais não contêm toxina ApxIV
Programa de erradicação	Sim (mas...)	Devem-se focar os (os) sorotipos concernentes (s).	Sim (mas...)	Não é possível focar um ou vários sorotipos
Interferência de anticorpos maternos a vacinação (vacinas base de toxinas)	Não	ELISA LPS não detecta anticorpos dirigidos contra as toxinas	?	Não há dados suficientes publicados disponíveis

Fonte: [18].

Em suínos com App sub-clínico, a bactéria se localiza na parte superior do trato respiratório especialmente nas tonsilas palatinas [7]. Existem diferentes formas de métodos de pesquisar a presença de *Actinobacillus pleuropneumoniae* nas tonsilas ou trato respiratório superior dos suínos (Quadro 2):

**Quadro 2.** Métodos de coleta de App de tonsilas e trato respiratório superior dos suínos.

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Coleta durante o abate	Simples. Possibilidade de coletar a totalidade das tonsilas.	Contaminação cruzada alta com outros patógenos.
Coleta no animal eutanasiado	Possibilidade de coletar a totalidade das tonsilas.	Não praticável em reprodutores.
Coleta por suabe ou raspado de tonsilas	Simples e pode ser feito no animal vivo. Não precisa anestesia.	Lugar de toma de amostra de difícil acesso. Contaminação importante. Baixa sensibilidade.
Coleta por biópsia	Na maioria dos casos não precisa anestesia. Às vezes os animais requerem uso de tranqüilizante. Pode ser feito no animal vivo	Requer equipamento (abre-boca, lanterna, abaixador de língua, pinça de biópsia). Volume do tecido tonsilar obtido por biópsia.
Lavado traqueobronquial por via nasal	Não precisa anestesia. Pode ser feito no animal vivo. Barato.	Requer um cateter especial de 1,5 mm de diâmetro externo e 150 cm de comprimento. Requer 15 minutos/animal e certo treinamento.

A coleta de tonsilas no abatedouro permite a obtenção da totalidade das tonsilas palatinas permitindo garantir a identificação dos animais portadores assintomáticos, porém a contaminação cruzada é significativa. Marois *et al.* [23] pesquisaram 9 suínos SPF que ficaram 4 horas nas baias de um abatedouro na França. Os animais foram abatidos e foram detectados os principais patógenos respiratórios pesquisados por PCR sobre suabe e tecidos (focinho, tonsilas, pulmão, traquéia), assim como na água fervendo usada pra mergulhar os animais (avaliação feita antes e depois da passagem dos animais).

Considerando que se trata de suínos SPF, é interessante observar que a maioria dos animais foi considerada “contaminada”, na saída da área de mergulho em água fervendo.

As técnicas de coleta de amostras “in vivo” são muito interessantes, porém para aumentar a chance de achar os portadores, Broes *et al.* [7] sugerem a avaliação sorológica prévia do rebanho e de praticar a coleta das tonsilas em animais soropositivos.

Independente da metodologia empregada, a amostra deve ser cuidadosamente conservada até o estudo no laboratório. Os suabes, tecido tonsilar e biopsias devem ser refrigerados entre +2 a +8°C por no máximo dois ou três dias. A bactéria pode ser evidenciada por isolamento bacteriológico, por PCR ou por ambas.

A técnica do PCR pode ser realizada diretamente a partir da amostra ou secundariamente após a cultura da bactéria em meio seletivo. O isolamento de App a partir da biópsia de tonsilas é difícil por meio de técnicas bacteriológicas convencionais.

No Canadá e na Dinamarca, um método foi implantado e é utilizado com sucesso por um isolamento seletivo dirigido para um sorotipo em particular: o isolamento imunomagnético [2,16]. Entretanto esta técnica é bastante onerosa. A técnica de PCR pode também ser útil. Diferentes testes PCR foram recentemente comparados e validados em nível de campo [13]. O método PCR é considerado muito mais sensível que o isolamento em laboratório de bacteriologia [J.C. Le Guennec, comunicação pessoal], em particular a partir de biópsia de tonsilas. A maioria desses testes não pode diferenciar os sorotipos (eles indicam a presença ou a ausência de App). Entretanto, a maioria dos rebanhos de suínos pode estar infectado pelos sorotipos menos patogênicos. Em consequência, um

resultado positivo no PCR não permite concluir que o rebanho está infectado por um sorotipo patogênico (exemplo, o sorotipo 2 na França). Os resultados negativos são sugestivos de ausência de App, mas é necessário que os testes sejam feitos em um número suficiente de animais e durante um período significativo para tirar conclusões. Sugerimos examinar os animais positivos ou suspeitos em sorologia, pois parece existir uma boa correlação entre uma reação sorológica positiva e um resultado positivo em PCR em tonsilas [13]. Mais recentemente testes de PCR específicos de certos sorotipos foram reportados [3]. Uma vez validado estes testes poderão ser muito úteis.

A técnica PCR é extremamente útil igualmente para confirmar a identidade das cepas isoladas das tonsilas e identificadas como sendo App por testes fenotípicos (testes bioquímicos, sorotipagem). De fato, como mencionado anteriormente, existem espécies bacterianas próximas de App, que poderíamos chamar de App-like, que possuem o perfil bioquímico de App, que são sorotipados como os sorotipos 1 (no Canadá) ou 9 (na França) mas que não pertencem a espécie *pleuropneumoniae* [19].

É por isso que em certos laboratórios de diagnóstico como no laboratório da Universidade de Montreal, cada cepa isolada das amígdalas e que é identificada como sendo App é examinada por PCR antes mesmo de efetuar a sorotipificação. No caso onde os resultados se apresentaram negativos, a sorotipificação não é efetuada.

### COMO DEVEMOS DIRECIONAR A PESQUISA?

A pleuropneumonia suína, mesmo sendo uma doença muito estudada, ainda apresenta muitos pontos obscuros: Conhecemos o tempo em que um animal pode ficar portador de App? Qual a duração dos anticorpos circulantes? Existe uma correlação entre o estado do portador assintomático e a duração/título de anticorpos? Qual é a correlação entre o nível de anticorpos maternos, o tempo e o grau de colonização dos leitões? Os anticorpos maternos induzidos após uma vacinação das matrizes ou leitoas de reposição têm um papel análogo àqueles anticorpos presentes nas fêmeas naturalmente infectadas, na prevenção (mesmo parcial) da colonização do aparelho respiratório dos leitões? Qual variação da resposta imunológica existe entre os diferentes tipos de vacinas (bacterinas, vacinas subunitárias, vacinas vivas, etc.) do ponto de vista grau e duração e de proteção? Porque certos rebanhos são infectados por vários sorotipos na maternidade (matrizes, leitoas), mas que somente um entre eles é, às vezes, transmitido aos leitões? Por que certos rebanhos apresentam sinais clínicos na engorda mesmo apresentando baixa prevalência sorológica na maternidade (e mesmo na engorda!!!!) frente ao sorotipo implicado? Outras questões permanecem ainda sem respostas. É necessário nosso esforço a fim de elucidá-los.

### REFERÊNCIAS

- 1 **Andreasen M., Mousing J. & Thomsen L.K. 2001.** No overall relationship between average daily weight gain and the serological response to *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in eight chronically infected Danish swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 49: 19-28.
- 2 **Angen O., Heegaard P.M. & Lavriksen D.T. 2001.** Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 by immunomagnetic separation. *Veterinary Microbiology*. 79: 19-29.
- 3 **Angen O. & Jessing S. 2004.** PCR tests for serotype specific identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: *Proceedings of 18th International Pig Veterinary Science Congress* (Hamburg, Deutschland). p.161.
- 4 **Biberstein E.L., Gunnarsson A. & Hurvell B. 1977.** Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp from swine. *American Journal of Veterinary Research*. 38: 7-11.
- 5 **Blackall J., Klaasen H.L., Van Den Bosch H., Kuhnert P. & Frey J. 2002.** Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Veterinary Microbiology*. 84: 47-52.
- 6 **Bossé J.T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S. & Langford P.R. 2002.** *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*. 4: 225-235.
- 7 **Broes A. & Gottschalk M. 2007.** Why and how to diagnose *Actinobacillus pleuropneumoniae* sub-clinical infections. In: *Proceedings of 38th American Association of Swine Veterinarians* (Orlando, U.S.A.). pp.193-198.
- 8 **Desrosiers R. 2004.** Howard Dunne Memorial Lecture. In: *Proceedings of 34th American Association of Swine Veterinarians* (Des Moines, U.S.A.). pp.9-37.
- 9 **Desrosiers R. & Moore C. 1998.** Indirect transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Swine Health and Production*. 6: 263-265.
- 10 **Dreyfus A., Schaller A., Nivollet S., Segers P.A.M., Kobisch M., Mieli L., Soerensen V., Hüsey D., Miserez R., Zimmermann W., Inderbitzin F. & Frey J. 2004.** Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Veterinary Microbiology*. 99: 227-238.

- 11 Dubreuil D., Jacques M., Mittal K., Gottschalk M. 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews*. 2: 73-93.
- 12 Embrapa Suínos e Aves. 2005. *Perfil sanitário na suinocultura no Brasil*, 14p. Disponível em: <[http://www.cnpas.embrapa.br/sgc/sgc\\_artigos/artigos\\_x1b40v7z.pdf](http://www.cnpas.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_x1b40v7z.pdf)>. Acessado em 02/2009.
- 13 Fittipaldi N., Broes A., Harel J., Kobisch M. & Gottschalk M. 2003. Evaluation and Field Validation of PCR Tests for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Subclinically Infected Pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 5085-5093.
- 14 Frank R.K., Chengappa M.M., Oberst R.D., Hennessy K.J., Henry S.C. & Fenwick B. 1992. Pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 in growing and finishing pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 4: 270-278.
- 15 Fussing V., Bafod K., Nielsen R., Møller K., Nielsen J.P., Wegener H.C. & Bisgaard M. 1998. Evaluation and application of ribotyping for epidemiological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. *Veterinary Microbiology*. 64: 145-162.
- 16 Gagné A., Lacouture S., Broes A., D'allaire S. & Gottschalk M. 1998. Development of an Immunomagnetic Method for Selective Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 from Tonsils. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 251-254.
- 17 Gambade P. & Morvan H. 2001. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Bulletin des GTV Dossiers Techniques Veterinaires*. 12: 19-22.
- 18 Gottschalk M. & Taylor D.J. 2005. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L. & Taylor D.J. (Eds). *Disease of Swine*. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, pp.343-354.
- 19 Gottschalk M., Broes A., Mittal K., Kobisch M., Kuhnert P., Lebrun A. & Freyet J. 2003. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? *Veterinary Microbiology*. 92: 87-101.
- 20 Gunn-Mcquillan H., Friendship R. & Macinnes J. 2005. Prevalence and significance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis* in Ontario. In: *Proceedings of 36th American Association of Swine Veterinarian* (Kansas City, U.S.A.). pp.55-62.
- 21 Klopfenstein C., Paradis M.A., Gottschalk M., Fittipaldi N., Broes A. & Dick C.P. 2004. Evaluation of the efficacy of tilimicosin phosphate premix (Pulmotil™) to eliminate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the tonsils of carrier pigs. In: *Proceedings of the 18th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.2. (Hamburg, Germany). p.511.
- 22 Maldonado J., Riera P., Martinez E., Llopart D., Osorio C.R. & Artigas C. 2004. NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* implicated in the etiology of fatal swine pleuropneumonia. In: *Proceedings of the 18th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.1. (Hamburg, Germany). p.159.
- 23 Marois C., Cariolet R., Morvan H. & Kobisch M. 2008. Transmission of pathogenic respiratory bacteria to specific pathogen free pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology*. 129: 325-332.
- 24 Mores A.Z.M. 2006. Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos. 90f. Curitiba, PR. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná.
- 25 Nielsen R., Andresen L.O., Plambeck T., Nielsen J.P., Krarup L.T. & Jorsal S.E. 1997. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Veterinary Microbiology*. 54: 35-46.
- 26 Paradis M.A., Vessie G.H., Merrill J.K., Dick C.P., Moore C., Charbonneau G., Gottschalk M., MacInnes J.I., Higgins R., Mittal K.R., Girard C., Aramini J.J. & Wilson J.B. 2004. Efficacy of tilimicosin in the control of experimentally induced *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 68: 7-11.
- 27 Pol J., Van Leengoed L.A.M.G., Stockhofe N., Kok G. & Wensvoort G. 1997. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Veterinary Microbiology*. 55: 259-264.
- 28 Schaller A., Kuhn R., Kuhnert P., Nicolet J., Anderson T.J., MacInnes J.I., Segers R.P. & Frey J. 1999. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*. 145: 2105-2116.
- 29 Silva A.F., Paganini F.J., Acosta J.C., Rocha P.H., Mistura H. & Marcon E. 2002. Prevalence of respiratory diseases in swine at slaughterhouses in Brasil. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.2. (Ames, USA). p.332.
- 30 Zhuang Q., Wachmann H., Mortensen S. & Barford K. 2002. Incidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in the Danish SPF pig herds and risk factor for infections. In: *Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.2. (Ames, U.S.A.). p.228.