

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE *Haemophilus parasuis* ISOLADAS DE SUÍNOS NA REGIÃO SUL DO BRASIL¹

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Haemophilus parasuis* STRAINS ISOLATED FROM PIGS IN SOUTHERN BRAZIL

Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito² José Renaldi Feitosa Brito³
Cátia Silene Klein⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar amostras não hemolíticas de bactérias do gênero *Haemophilus* isoladas de suínos. As bactérias foram isoladas de material clínico de animais com suspeita da doença de Glässer, de leitões aparentemente saudáveis provenientes de quatro rebanhos com suspeita clínica desta doença e de casos de poliartrites. Além das características culturais e morfotintoriais, foram utilizados os seguintes testes para a identificação: dependência de NAD(fator V), CAMP, produção de hemolisina, indol, urease e catalase, redução do nitrato e produção de ácido dos carboidratos: glicose, sacarose, arabinose e manose. Dezesete dentre 24 amostras foram classificadas como *Haemophilus parasuis* (dez isoladas de animais clinicamente doentes e sete de leitões normais). Cinco destas amostras foram classificadas nos sorogrupos 2, 4, 7, ND4 e uma foi não tipável. Quatro das 24 amostras apresentaram características do grupo taxonômico C (teste de arabinose positivo) e três produziram urease. Os testes realizados não permitiram distinguir as amostras urease positivas do gênero *Haemophilus*

das amostras não hemolíticas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mais de 60% das amostras apresentaram sensibilidade *in vitro* a: ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, danofloxacina, nitrofurantoína, penicilina G, polimixina B e tetraciclina.

Palavras-chave: doença de Glässer, *Haemophilus parasuis*, susceptibilidade a antimicrobianos, identificação bacteriana.

SUMMARY

The aim of this work was to characterize non haemolytic strains of the genus *Haemophilus* isolated from pigs. The strains were either isolated from pigs with Glässer's disease or from apparently healthy piglets, from four herds supposedly affected by the disease and from pigs with polyarthritis. The strains were characterized by dependence on NAD (V factor), CAMP test, hemolysin, indole, urease and catalase production, nitrate reduction and acid production from glucose, sucrose, arabinose and mannose. Seventeen

¹Trabalho realizado no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA).

²Farmacêutico-Bioquímico, MSc, PhD, EMBRAPA/CNPGL Rodovia MG 133, Km 42, 36155-000, Coronel Pacheco, MG, autor para correspondência.

³Médico-Veterinário, MSc, PhD, EMBRAPA/CNPGL.

⁴Biólogo, Assistente de Pesquisa, EMBRAPA/CNPISA BR 153, Km 110, 89700-000 - Concórdia - SC.

out of the 24 strains were classified as *Haemophilus parasuis* (10 isolates from clinically affected animals and seven from healthy piglets). Five of these strains were identified as serovars 2, 4, 7, ND4 and one was nontypeable. Four out of the 24 strains produced acid from arabinose and were tentatively allocated on taxonomic group C. Three strains produced urease, but the tests did not accurately differentiate them from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *In vitro* antimicrobial susceptibility test showed that more than 60% of the strains were sensitive to: ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, danofloxacin, nitrofurantoin, penicillin, polymyxin B and tetracycline.

Key-words: Glässer's disease, *Haemophilus parasuis*, antimicrobial susceptibility, bacterial identification.

INTRODUÇÃO

Haemophilus parasuis é um microrganismo que pode ser encontrado na cavidade nasal de suínos sadios e também como agente etiológico da doença de Glässer, que se caracteriza por poliserosite fibrinosa, artrite e septicemia. É também isolado, ocasionalmente, de animais com septicemia ou associado a lesões pneumônicas (RILEY et al., 1977; NICOLET, 1986; PEET et al., 1988; RAPP-GABRIELSON & GABRIELSON, 1992). Em rebanhos "specific pathogen free", onde *H. parasuis* não é um patógeno comum, os animais são mais susceptíveis e infecções graves têm sido relatadas (SMART et al., 1986).

Bactérias do gênero *Haemophilus* isoladas de suínos incluem *H. parasuis* e as espécies dos grupos taxonômicos C, D, E, F e "minor", ainda sem designação de nome (KILIAN, 1976; MOLLER & KILIAN, 1990). A diferenciação das espécies é feita por testes bioquímicos, havendo grande diversidade de resposta aos testes utilizados (KILIAN, 1976; RAPP et al., 1985; MOLLER & KILIAN, 1990; RAPP-GABRIELSON & GABRIELSON, 1992; GUTIERREZ et al., 1993).

Amostras não hemolíticas de *Haemophilus* spp suspeitas de pertencerem à espécie *parasuis* foram isoladas de suínos com sintomatologia clínica da doença de Glässer, na Região Sul do Brasil (SOBESTIANSKY et al., 1988). Subseqüentemente, diversos organismos com essa característica foram isolados no laboratório de Bacteriologia do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves da EMBRAPA. Não há, contudo, referências sobre a iden-

tificação e caracterização desses microrganismos no nosso país. O objetivo deste trabalho foi de descrever a caracterização e a determinação do padrão de susceptibilidade a antimicrobianos dessas amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Bactérias. As amostras foram isoladas da cavidade nasal de leitões normais com idade entre sete e oito semanas, provenientes de quatro rebanhos com história clínica da doença de Glässer (10 amostras); de líquido sinovial de suínos com aproximadamente seis meses de idade com poliartrites (duas amostras) e de casos clínicos da doença de Glässer (12 amostras).

Exames bacteriológicos. Para o isolamento primário, secreções nasais, líquido sinovial e fragmentos de pulmão e de cérebro foram colhidos com assepsia e semeados diretamente em placas de ágar-sangue (5% v/v de sangue desfibrinado de carneiro). Após a semeadura, passou-se sobre o inóculo uma estria de um cultivo de *Staphylococcus aureus* β -hemolítico. As culturas foram incubadas a 37°C, em ambiente úmido e atmosfera de 5% de CO₂. Após 48 horas de incubação as colônias com 0,5 a 1,0mm de diâmetro, circulares e translúcidas, foram selecionadas e transferidas para outra placa de ágar-sangue, repetindo-se a estria da cultura de *S. aureus*.

Repetiram-se os mesmos procedimentos de incubação e, após 48 horas, os cultivos que apresentaram colônias pequenas, não hemolíticas, apenas na vizinhança do crescimento de *S. aureus*, e que se apresentaram microscopicamente na forma de bastonetes pequenos ou de cocobacilos gram negativos, foram selecionados. A partir do cultivo em ágar-sangue, fizeram-se subcultivos em meio de Triptose ágar (Difco) contendo 10% de soro bovino e de 10 a 50 μ g/ml de NAD (β -Nicotinamida Adenina di-Nucleotídeo, fator V). O crescimento bacteriano foi, então, suspenso em soro bovino estéril contendo 7,5% (p/v) de glicose e liofilizado. Um total de 24 amostras isoladas foram caracterizadas bioquimicamente.

Cinco dessas amostras foram enviadas à Dra. V. J. Rapp-Gabrielson (North Dakota State University, USA) para determinação de sorotipo.

Testes bioquímicos. As amostras foram submetidas aos seguintes testes: dependência de NAD, teste de CAMP, produção de hemolisina, indol, urease e catalase, redução de nitrato e fermentação dos carboidratos: glicose, sacarose, ribose, arabinose e manose. Os testes foram realizados de acordo com as recomendações de KILIAN & FREDERIKSEN

(1981). Os tubos para os testes de fermentação dos carboidratos foram inoculados com duas gotas de uma suspensão das bactérias feita em PBS pH 7,4 de cultivos em placas de tryptose ágar (Difco) contendo NAD e soro bovino. Tubos do meio básico (phenol red broth base, Difco) sem os carboidratos, foram igualmente inoculados e incubados em paralelo, para comparação da leitura.

As amostras-padrão dos sorotipos 2, 3 e 7 de *H. parasuis*, recebidas da Dra. V. J. Rapp-Gabrielson, foram utilizadas como controle dos testes bioquímicos.

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Seguiu-se o método descrito por BARRY & THORNSBERRY (1985), utilizando-se ágar Mueller-Hinton contendo 10% de soro bovino e 50 µg/ml de NAD e discos de papel de filtro, com os antimicrobianos adsorvidos. As leituras dos halos de inibição foram feitas após 24 horas de incubação. Foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, lincomicina, nitrofurantoína, penicilina G, polimixina B, sulfametrimina, sulfonamidas, tetraciclina e tiamulin.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de caracterização bioquímica das amostras são apresentados na Tabela 1. Três das 24 amostras, isoladas de pulmão, cérebro

Tabela 1 - Porcentagem de caracteres bioquímicos positivos de 24 amostras de *Haemophilus* spp. isoladas de suínos. Os números entre parênteses se referem ao número de amostras positivas sobre o total.

Características	Amostras urease (+) (n = 3)	Amostras urease(-) (n = 21)	Amostras padrão S1, S3, S7 (n = 3)
Hemolisina	0	0	0
CAMP	0	0	0
Requerimento de NAD	100	100	100
Indol	0	0	0
Catalase	0	100	100
Nitrato	100	100	100
Glicose	100	90,5 (19/21)	100
Sacarose	100	100	100
Ribose	66,6 (2/3)	71,4 (15/21)	100
Arabinose	0	19 (4/21)	0
Manose	100	100	0

e líquido de articulação, produziram urease. A produção de urease pelos *Haemophilus* spp de suínos, tem sido detectada somente para o grupo "minor" (RAPP et al., 1985; MOLLER & KILIAN, 1990; GUTIERREZ et al., 1993). As características das amostras do grupo "minor" são semelhantes a amostras não hemolíticas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, anteriormente conhecida como *H. pleuropneumoniae* e posteriormente transferida para o gênero *Actinobacillus* com base em homologia de DNA e conteúdo G-C (POHL et al., 1983). As quatro amostras urease positivas deram resultado negativo no teste de CAMP. Estudos dos caracteres de *A. pleuropneumoniae* por MOLLER & KILIAN (1990) mostraram que 100% das amostras davam o teste de CAMP positivo, mesmo as não hemolíticas. Este resultado não foi confirmado por GUTIERREZ et al. (1993), que relataram o teste de CAMP positivo em somente 80,5% de 72 amostras. Para diferenciar as espécies do grupo "minor" das de *A. pleuropneumoniae* estes autores utilizaram testes de fermentação de carboidratos. Resultados concordantes foram encontrados para manitol (100% das amostras do grupo "minor" são negativas) e rafinose (100% são positivas) (MOLLER & KILIAN 1990; GUTIERREZ et al., 1993). Como estes dois açúcares não foram avaliados, novos testes serão necessários para verificar se estas amostras não hemolíticas e produtoras de urease pertencem ao grupo taxonômico "minor". Tem sido relatado o isolamento de *Haemophilus* do grupo "minor" de pulmão de suíno, com e sem lesões de pneumonia (LITTLE & HARDING, 1971; MORRISON et al., 1985) mas o papel destes como agente da doença não está definido.

Todas as 20 amostras não produtoras de urease, produziram catalase mas não indol. Esses resultados descartam a possibilidade de classificação destas amostras no grupo taxonômico D e E (dão reação de catalase negativa) ou F (produzem indol) (MOLLER & KILIAN 1990).

Maior dificuldade existe para separar as amostras de *H. parasuis* daquelas do grupo taxonômico C. MOLLER & KILIAN (1990) testaram 28 amostras de *H. parasuis* e quatro amostras do grupo taxonômico C, para 41 caracteres. As diferenças entre as duas espécies só foram detectadas com as provas de β-galactosidase, redução do nitrito e fermentação da arabinose e rafinose. Neste trabalho, quatro das amostras testadas fermentaram a arabinose e podem, portanto, ser classificadas no grupo taxonômico C. Três delas foram isoladas da cavidade nasal de leitão sadio e a outra de líquido de articulação de um animal com poliartrite. Espécies do

grupo C também têm sido consideradas apatogênicas, mas já foram isoladas de pulmão de suíno com lesões de pneumonia (MOLLER & KILIAN, 1990).

As 17 amostras restantes apresentaram características compatíveis com *H. parasuis* (KILIAN, 1976; RAPP et al., 1985, MOLLER & KILIAN, 1990). Cinco delas, remetidas a Dra. V. J. Rapp-Gabrielson, foram confirmadas como *H. parasuis* e classificadas sorologicamente nos sorotipos 2, 4, 7 e ND4. A outra não foi tipável (RAPP-GABRIELSON & GABRIELSON, 1992)

Os testes de susceptibilidade a antimicrobianos mostraram um padrão variável (Tabela 2). Acima de 65% das amostras foram sensíveis a ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, danofloxacina, nitrofurantoína, penicilina G, polimixina B e tetraciclina.

Tabela 2 - Susceptibilidade a antimicrobianos (% de amostras) das amostras de *Haemophilus* isoladas de suínos.

Antimicrobiano (concentração do disco)	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina (10µg)	70,4	0	29,6
Cefalotina (30µg)	85,3	7,4	7,4
Cloranfenicol (30µg)	81,5	0	18,5
Danofloxacina (5µg)	91,7	0	8,3
Eritromicina (15µg)	45,5	22,7	31,8
Estreptomicina (10µg)	0	12	88
Gentamicina (10µg)	59,3	14,8	25,9
Lincomicina (2µg)	0	0	100
Nitrofurantoína (300µg)	92,6	0	7,4
Penicilina G (10U)	66,7	14,8	18,5
Polimixina B (300U)	89	3,7	7,4
Sulfametrina (25µg)*	40,7	0	59,3
Sulfonamidas (300µg)	26	3,7	70,3
Tetraciclina (30µg)	63	15	22
Tiamulin**	48	0	52

* Sulfametrina corresponde a sulfametrol/trimetoprim.

** Discos recebidos para teste, sem informação sobre a concentração.

Nenhuma amostra foi sensível a lincomicina ou estreptomicina e menos de 50% das amostras foram sensíveis a eritromicina, sulfametrina, sulfonamidas e tiamulin. NICOLET (1986) relaciona a maior susceptibilidade de *H. parasuis* a penicilina, ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfonamida e tetraciclinas. Estreptomicina e sulfonamidas estavam entre os menos eficientes *in vitro*.

Embora o número de testes bioquímicos realizados tenha sido pequeno quando comparado a outros trabalhos (KILIAN, 1976; RAPP et al., 1985;

MOLLER & KILIAN, 1990; GUTIERREZ et al., 1993) foi possível identificar a presença de *H. parasuis* de casos de pneumonia e de poliserosite. Um maior número de características devem ser testadas para separar com segurança as espécies do grupo "minor" das de *A. pleuropneumoniae*. Quatro das amostras foram classificadas como do grupo taxonômico C, mas outras observações devem ser realizadas para confirmar esta indicação. Devido à variedade de patogenicidade relatada (NICOLET, 1986) entre as amostras de *H. parasuis*, estudos são necessários para caracterizar a virulência das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRY, A.L., THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In: LENNETTE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER JR, W.J., SHADOMY, H.J. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1985. Cap. 102, p. 978-987.
- 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 Immun Microbiol Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 123-130, 1993.
- KILIAN, M. A. Taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with a proposal of a new species. **J Gen Microbiol**, v. 93, p. 9-62, 1976.
- KILIAN, M., FREDERIKSEN, W. Identification tables for the *Haemophilus-Pasteurella-Actinobacillus* group. In: KILIAN, M., FREDERIKSEN, W., BIBERSTEIN, E.L. *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*. London: Academic Press, 1981, p. 281-290.
- LITTLE, T.W.A., HARDING, J.D.J. The comparative pathogenicity of two porcine *Haemophilus* species. **Vet Rec**, v. 88, p. 540-545, 1971.
- MOLLER, K., KILIAN, M. V factor - dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 12, p. 2711-2716, 1990.
- MORRISON, R.B., PIJOAN, C., HILLEY, H.D. et al. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. **Can J Comp Med**, v. 49, p. 129-137, 1985
- NICOLET, J. *Haemophilus* infections. In: LEMAN, A.D., STRAW, B., GLOCK, R.D., MENGELING, W.L., PENNY, R.H.C., SCHOLL, E. **Diseases of swine**. 6 ed., Ames: Iowa State University Press, 1986. p. 426-436.
- PEET, R.L., FRY, J., LYOYD, J., et al. *Haemophilus parasuis* septicaemia in pigs. **Aust Vet J**, v. 60, n. 6, p. 187, 1988.
- POHL, S., BERTSCHINGER, H.U., FREDERIKSEN, W., et al. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and

- Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb.nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int J Syst Bacteriol*, v. 33, p. 510-514, 1983.
- 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". *J Clin Microbiol*, v. 22, n. 6, p. 945-950, 1985.
- RAPP-GABRIELSON, V.J., GABRIELSON, D.A. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am J Vet Res*, v. 53, n. 5, p. 659-664, 1992.
- RILEY, M.G.I., RUSSEL, E.G., CALLINAN, R.B. *Haemophilus parasuis* infection in swine. *J Am Vet Med Assoc*, v. 171, p. 649-651, 1977.
- SMART, N.L., MINIATS, O.P., FRIENDSHIP, R.M., et al. Glässer's disease in South western Ontario. II Isolation of *Haemophilus parasuis* from SPF and conventional swine herds. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 9., Barcelona, 1986. **Proceedings...** p. 280.
- SOBESTIANSKY, J., MORES, N., LIEBHOLD, M.M., et al. **Doença de Glässer: uma doença pouco conhecida no Brasil.** Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1988. 4 p. (EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico, 137).