

SEÇÃO: VETERINÁRIA

AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA EM CAMUNDONGO, DE AMOSTRAS DE *Pasteurella multocida* ISOLADAS DE SUÍNOS¹

SANDRA M. BOROWSKI², DAVID E.S.N. de BARCELLOS³, MARISA CARDOSO³

RESUMO - Foi analisada a virulência de 13 amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e pleurite e 11 de pulmões de suínos provenientes de frigoríficos. As bactérias foram cultivadas em meio BHI por 18 horas a 37° C e realizada a titulação (UFC/ml) por semeadura de diluições decimais em ágar sangue. Diluições a partir de 10⁻³ até 10⁻¹³ (contendo de 1 a 8,3 x 10¹⁵ UFC) foram inoculadas por via intraperitoneal em camundongos e observado o número de mortes em cada diluição por um período de sete dias. Cada amostra inoculada foi reisolada de pelo menos dois camundongos. A DL50 foi calculada pelo método de Spearman Kärber e determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) capaz de matar 50% dos camundongos (DL50). Ocorreu grande diferença entre as amostras estudadas quanto às DL50, com títulos entre < 1 até 10^{10,2} UFC. Não foi observada diferença de virulência entre as amostras isoladas de casos clínicos e de pulmões de frigoríficos.

Palavras-chave: patologia suína, pneumonia, pleurite.

MICE VIRULENCE ASSAY OF *Pasteurella multocida* STRAINS ISOLATED FROM PIGS

ABSTRACT - Virulence of 24 strains of *Pasteurella multocida*, 13 isolated from pleuritic and pneumonic pig lungs, and 11 from pig lungs obtained from abattoirs was studied. *P. multocida* was cultured in BHI medium incubated at 37° C for 18 h and the number of colony forming units (CFU/ml) determined by inoculation of decimal dilutions on blood agar plates. Dilutions from 10⁻³ to 10⁻¹³ (8,3 x 10¹⁵ to 1 CFU) were inoculated intraperitoneally in mice and the number of deaths for each dilution determined over a 7-day period. Each inoculated strain was recovered from at least two mice. LD50 were determined by the Spearman-Kärber method. It was observed a wide variation in LD50, ranging from <1 to 10^{10,2} CFU. There was no difference in virulence among strains from clinical cases or from abattoir lungs.

Key words: swine pathology, pneumonia, pleuritis.

INTRODUÇÃO

Em suínos, *Pasteurella multocida* é um habitante normal da cavidade nasal e um dos agentes etiológicos da rinite atrofica (DE JONG et al., 1984). A importância do agente como causa primária de pneumonia nessa espécie animal tem sido bastante discutida. Segundo PIJOAN e FUENTES (1987), o microorganismo é incapaz de agir como patógeno

primário, necessitando da interação com outros agentes (como adenovírus, vírus da peste suína clássica e da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos, *Mycoplasma hyopneumoniae* e vírus da doença de Aujeszky) para produzir pneumonia. Entretanto, o isolamento de *P. multocida*, a partir de lesões pneumônicas de suínos abatidos em frigoríficos, comprova a importância do agente na patologia pulmonar, e ZHAO et al. (1992) referem-se à pneumonia por *Pasteurella* como sendo aquela

1. Trabalho elaborado como parte da tese de doutorado da primeira autora.

2. Mcd. Vet., M.Sc.- Centro de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor", FEPAGRO, Estrada do Conde 6000, Caixa Postal 47, 92990-000 Eldorado do Sul, RS.

3. Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Recebido para publicação em 13/12/1999.

que causa os maiores prejuízos econômicos à indústria suína. Especificamente de casos de pleurite, têm sido isoladas cepas com características peculiares que possibilitaram a sua denominação genérica como "cepas de *P. multocida* pleuríticas". Foram publicados poucos estudos sobre as mesmas, mas há sugestões de que apresentem estruturas únicas de virulência (RANGEL e AGUADÉ, 1992). A possível diversidade existente entre estas e outras amostras de *P. multocida* poderia explicar diferenças de tropismo, seja causando rinite, pneumonia e pleurite em suínos, e também de virulência.

Existem poucas informações na literatura sobre variações de patogenicidade para suínos e outros animais entre sorotipos de *P. multocida* e também quanto à influência de seus fatores de virulência na gravidade de problemas respiratórios e/ou mortalidade. Em estudos para avaliar a virulência de *P. multocida*, diferentes espécies animais têm sido utilizadas, tais como camundongo, galinha, peru, coelho e pombo (CURTIS et al., 1980). A virulência tem sido avaliada com base na mortalidade de animais experimentalmente inoculados por um período de até 14 dias, variando títulos infecciosos e vias de administração. A patogenicidade de amostras de *P. multocida* isoladas de aves e a relação entre virulência e morfologia bacteriana ou colonial foi analisada por CURTIS et al. (1980). Nesse experimento, foram usadas 100 amostras isoladas de aves para inocular 100 camundongos, 54 galinhas e 9 perus. A morfologia colonial e celular foi examinada após a inoculação nos camundongos. Foi observada considerável variação na virulência com relação ao hospedeiro utilizado, porém não houve correlação entre as morfologias celular e colonial com virulência. OKERMAN et al. (1979), ao estudarem a patogenicidade de amostras de *P. multocida* isoladas de coelhos, inoculadas por via subcutânea em camundongos, observaram grande diferença na DL50. As amostras que foram isoladas de casos de septicemia foram mais virulentas do que as que determinaram, unicamente, lesões localizadas no sistema respiratório. DIALLO et al. (1995) estudaram 45 amostras de *P. multocida* isoladas de casos de cólera aviária. Nesse estudo tentaram correlacionar a presença de plasmídios com a resistência a antimicrobianos e à virulência para camundongo. As amostras virulentas ocasionaram a morte dos camundongos em 10 a 24 horas após a inoculação. Observaram que mais da metade das

amostras tinham plasmídios pequenos (de 1,3 Kbp a 7,5 Kbp) e que houve correlação negativa entre a presença dos mesmos e a virulência para camundongos.

A virulência de isolados de *P. multocida* de suínos foi determinada pela inoculação de camundongos, observando-se diferenças entre sorotipos (CHANDRASEKARAN e YEAP, 1982). Foram usadas 20 amostras de *P. multocida* isoladas de suínos na Malásia, com variadas doenças e patologias, como peste suína clássica, septicemia e broncopneumonia. A classificação quanto ao tipo capsular indicou que 20% pertenciam ao tipo A, 35% ao tipo B e 45% ao tipo D. As amostras pertencentes ao tipo B foram altamente virulentas, as do tipo A moderadamente virulentas e as do tipo D as de menor virulência. Das 2 amostras isoladas de casos de broncopneumonia, uma foi do tipo capsular A e a outra do tipo D. Não houve correlação entre a virulência para camundongo, as características coloniais ou de origem (órgão) a partir do qual foi isolada, mas houve entre virulência e o sorotipo. Não foram encontradas, na literatura, referências sobre a avaliação experimental da virulência de amostras pleurotrópicas de *P. multocida* de origem suína.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se havia diferença de virulência em camundongo, entre amostras isoladas de pleuras e pulmões de suínos com características de pleurite e/ou pneumonia, através da determinação da DL50 em camundongo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas 24 amostras de *P. multocida*. Onze foram isoladas de pulmões de suínos abatidos em quatro frigoríficos do Estado do Rio Grande do Sul, identificadas como PI5, PI23, PI21, PI7, FII14, PIII47, PII8, PIII19, FII9, PIII43, CII2 (STEPAN, 1995). Outras 13 foram obtidas de materiais de rotina de diagnóstico no Centro de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor/ FEPAGRO, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, de leitões com pneumonia e/ou pleurite (identificadas como 76, 805, Ca, Ta, 710, Fr, 1/95, 1265, 1133, 903, 1628, 1363 e 1621). As amostras foram semeadas em meios de ágar-sangue e Mac Conkey e a partir daí classificadas bioquimicamente de acordo com COWAN (1975) e tipadas com base nos antígenos capsulares A e D, como descrito por CARTER e SUBRANTO

(1973) e CARTER e RUNDELL (1975). Os clones obtidos foram multiplicados em meio infuso cérebro e coração (BHI) adicionado de 5% de soro equino e mantidos liofilizados até o uso para as diferentes provas de classificação. Como controle nos testes de tipagem, foi utilizada uma cepa padrão de *P. multocida* toxigênica tipo capsular D (obtida da American Type Culture Collection, ATCC) e amostras dos tipos capsulares A e D (originadas do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, EMBRAPA, Concórdia, SC).

Determinação da virulência em camundongo

As amostras foram cultivadas em meio BHI e incubadas por 18 horas a 37°C. Cada cultivo foi diluído na base 10 (até 10⁻¹²) e foi realizada a contagem total em placa, das unidades formadoras de colônia das diluições 10⁻⁷, 10⁻⁸ e 10⁻⁹, utilizando-se três placas de ágar-sangue para cada diluição. Não sendo possível a contagem a partir dessas diluições em função do número excessivo de colônias, a técnica era repetida e a contagem realizada com diluições maiores. Paralelamente, seis camundongos Webster de 21 dias foram inoculados com 0,5 ml de cada uma das diluições a partir de 10⁻³ até 10⁻¹³ por via intraperitoneal e, de acordo com CHANDRASEKARAN e YEAP (1982), foi observada a ocorrência de morte nos mesmos por um período de sete dias. A DL₅₀ foi calculada pelo método de Spearman Kärber (KARBER, 1975). Foi utilizado, também, um grupo de camundongos com o mesmo peso e idade como controle negativo, inoculados com 0,5 ml de PBS (salina fosfatada tamponada), pela mesma via.

Foi feito o cultivo do fígado, de pelo menos dois camundongos mortos após a inoculação de cada cepa estudada, para recuperar a amostra de *P. multocida* inoculada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características fenotípicas

Em cultivos de 18 horas, as colônias isoladas apresentavam-se grandes (com até 1,8 mm de diâmetro), translúcidas e com maior ou menor aspecto mucóide, tendendo a se tornar confluentes. Não mostraram hemólise em placa de ágar-sangue e não cresceram em ágar Mac Conkey. As reações bioquímicas foram as características da espécie.

Tipificação das amostras

Das 24 amostras, 23 foram classificadas como

tipo capsular A e uma como tipo D (amostra 1/95). Esses resultados foram similares aos encontrados por outros autores (PIJOAN et al., 1983; IWAMATSU e SAWADA, 1988; AWAD-MASALMEH et al., 1994), que reforçam a afirmação de RUTTER (1983), PIJOAN (1992) e ZHAO et al. (1992) de que as cepas de *P. multocida* tipo A são mais importantes no processo pneumônico do que as do tipo D. Acredita-se que a razão pela qual as cepas do tipo A são encontradas como maior frequência no pulmão estaria relacionada com a presença de cápsula de ácido hialurônico, o que dificultaria a fagocitose pelos macrófagos alveolares (PIJOAN, 1992).

Determinação da virulência em camundongo

Os valores da DL₅₀ constam na Tabela 1, observando-se grande diferença entre elas, variando de < 1 até 10^{10,2} UFC. A amostra mais patogênica foi a 710, isolada de caso clínico, e a menos patogênica foi a FII14, isolada de pulmões coletados em frigoríficos.

Na Tabela 2, são apresentados os dados de virulência comparativa entre amostras isoladas de casos clínicos e aquelas de materiais de frigoríficos. Com o número de amostras utilizadas, não foi possível afirmar serem as isoladas de casos clínicos mais virulentas do que as isoladas a partir de pulmões de frigoríficos. No estudo de algumas amostras (indicadas como "ND" na Tabela 2) todos os camundongos morreram, não sendo possível determinar com precisão as unidades formadoras de colônia que seriam necessárias para matar 50% dos camundongos.

Diferenças na virulência entre amostras de *P. multocida* têm sido descritas por outros autores. CHANDRASEKARAN e YEAP (1982) ao estudarem amostras isoladas de suínos observaram que aquelas pertencentes ao sorotipo B foram altamente virulentas, as do tipo A moderadamente e as do tipo D as menos virulentas. Em coelhos, OKERMAN et al. (1979) observaram grande diferença na DL₅₀ com a inoculação subcutânea. As amostras que haviam causado septicemia foram mais virulentas (DL₅₀ < 10³) do que as que determinaram apenas lesões localizadas no sistema respiratório (DL₅₀ > 10⁶).

Vários autores têm estudado a relação entre a virulência e a presença ou não de determinadas estruturas na célula bacteriana (CURTIS et al., 1980). Já foi comprovada a associação entre a presença de cápsula e a virulência de cepas de *P.*

multocida por diversos modelos experimentais (DE KRUIF, 1921; HEDDLESTON et al., 1964). Entretanto, outros autores não confirmaram essa correlação (CURTIS et al., 1980). Esses autores não encontraram relação entre virulência e morfologia colonial ou bacteriana, concluindo que a cápsula não é um indicativo de virulência. Salientam ainda que a natureza da virulência da *P. multocida* é obscura, mas que a ausência de virulência para camundongo de pelo menos uma amostra pode ter sido causada pela perda de um plasmídeo. Entretanto, DIALLO et al. (1995) observaram correlação negativa entre a presença de plasmídios em amostras de *P. multocida* isoladas de cólera aviária e a virulência em camundongo.

TABELA 1- Valores da DL 50 nas amostras de *P. multocida* estudadas

AMOSTRA	ORIGEM*	DL50
76	CC	10 ^{3,7}
Ta	CC	10 ^{5,8}
Fr	CC	<10 ^{5,1}
710	CC	< 1
Ca	CC	10 ^{1,1}
PII8	FRI	10 ^{7,9}
CI12	FRI	10 ^{2,7}
FI19	FRI	10 ^{5,9}
PIII19	FRI	10 ^{2,1}
1/95	CC	<10 ^{2,4}
805	CC	10 ^{0,9}
1265	CC	<10 ^{3,3}
PIII43	FRI	10 ^{4,5}
PI21	FRI	<10 ^{5,6}
PIII47	FRI	10 ^{8,6}
903	CC	ND
1133	CC	10 ^{8,4}
PI23	FRI	10 ^{3,7}
FI14	FRI	10 ^{10,2}
1621	CC	<10 ^{3,8}
1363	CC	<10 ^{7,5}
PI5	FRI	10 ^{8,0}
1628	CC	<10 ^{4,4}
PI7	FRI	10 ^{8,9}

* CC: casos clínicos; FRI: frigorífico

ND = não determinado

TABELA 2- Distribuição dos valores das DL 50 entre as amostras de *P. multocida* isoladas de casos clínicos e de frigoríficos

DL50	% DE AMOSTRAS NA CATEGORIA	
	Casos Clínicos	Frigoríficos
< 10 ³	30,80	18,20
10 ³ a 10 ⁶	15,30	27,30
10 ^{6,1} a 10 ⁹	7,70	36,30
10 ^{9,1} a 10 ¹²	0,0	9,10
ND	46,20	9,10
TOTAL	100,00	100,00

ND= Não determinado

Seriam necessários estudos adicionais para determinar a presença de determinadas estruturas e/ou fatores que poderiam explicar as diferenças observadas na DL50 em camundongo, tais como a produção de toxinas, variações no perfil molecular e a presença ou não de fimbrias ou outras adesinas nas cepas de *P. multocida*. Resultados preliminares de estudos em andamento no nosso laboratório (não publicados) indicam não haver relação entre a produção de toxinas por algumas cepas e a sua virulência em camundongo, bem como com as diferenças obtidas por padrões de polimorfismo molecular determinado através da análise do comprimento de fragmentos, produzidos por enzimas de restrição (RFLP) do gene codificador de uma proteína da membrana externa (*OmpH*) amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram haver grande diferença nas DL50 de *P. multocida* entre as amostras estudadas, variando de < 1 até 10^{10,2} UFC. Não foi observada diferença de virulência entre as amostras isoladas de casos clínicos e de pulmões de frigoríficos.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- AWAD-MASALMEH, M.; KOUROUMA, G.; KÖFER, J.; SCHUH, M. Investigations on *Pasteurella multocida* lesions of slaughter swine suffering from chronic respiratory disorders. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 13., 1994, Bangkok. *Proceedings...* Bangkok: Poomvises and Pringsri Inkanium, 1994. p.172.
- CARTER, G.R.; RUNDELL, D.W. Identification of type

- A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. **Veterinary Record**, London, v.87, p.343, 1975.
- CARTER, G.R.; SUBRANTO, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.34, p.293-294, 1973.
- CHANDRASEKARAN, S.; YEAP, P.C. *Pasteurella multocida* in pigs: the serotypes and the assessment of their virulence in mice. **British Veterinary Journal**, London, v.138, p.332-336, 1982.
- COWAN, S.T. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1975. 238 p.
- CURTIS, P.E.; OLLERHEAD, G.E.; ELLIS, C.E. Virulence and morphology of *Pasteurella multocida* of avian origin. **Veterinary Record**, London, v.107, p.105-108, 1980.
- DE JONG, M.F.; OEI, J.L.; TESTENBURG, G.J. AR-pathogenicity-test for *Pasteurella multocida* isolates. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 6., 1984, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen: Nielsen, N.C., 1984. p.211.
- DE KRUIF, P.H. Dissociation of microbial species. Coexistence of individual of different degrees of virulence in cultures of the bacillus of rabbit septicemia. **Journal of Experimental Medicine**, New York, n.33, p. 773-789, 1921.
- DIALLO, I.S.; BENSINK, J.C.; FROST, A.J.; SPRADBROW, P.B. Molecular studies on avian strains of *Pasteurella multocida* in Australia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.46, p.335-342, 1995.
- HEDDLESTON, K.L.; WATHO, L.P.; REBERS, P.A. Dissociation of a fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.8, p.649-657, 1964.
- IWAMATSU, S.; SAWADA, T. Relationship between serotypes, dermonecrotic toxin production of *Pasteurella multocida* isolates and pneumonic lesions of porcine lung. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.50, n.6, p.1200-1206, 1988.
- KARBER, G. Biological standardization. In: CRUICKSHANK, R. (Ed.) **Medical Microbiology**. Edinburgh: E.& S. Livingstone, 1975. p.315.
- OKERMAN, L.; SPANOGHE, L.; DE BRUYCKR, M. Experimental infections of mice with *Pasteurella multocida* isolated from rabbits. **Journal of Comparative Pathology**, New York, v. 89, 1979.
- PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: LEMAN, A. (Eds.) **Diseases of Swine**. 7. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1992. p.552-559.
- PIJOAN, C.; FUENTES, M. Severe pleuritis associated with certain strains of *Pasteurella multocida* in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.191, n.7, p.823-826, 1987.
- PIJOAN, C.; MORRISON, R.B.; HILLEY, H.D. Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.17, n.6, p.1074-1076, 1983.
- RANGEL, M.F.; AGUADÉ, C.P. *Pasteurella multocida* fimbriada como agente desencadenante de pleuritis y neumonia fibrinosa en cerdos. **Veterinaria México**, México, v.3, p.231-233, 1992.
- RUTTER, J.M. Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. **Research in Veterinary Science**. Oxford, v.34, p.285-287, 1983.
- STEPAN, A.L. Tipificação e sensibilidade de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas a partir de lesões de pleurite em suínos terminados. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 72p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) Faculdade de Veterinária, UFRGS, 1995.
- ZHAO, G.; PIJOAN, C.; MURTAUGH, M.P. Epidemiology of *Pasteurella multocida* in a farrow-to-finish swine herd. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12., 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: Animal Health Services in the Southern Netherlands, 1992. 157p.