MARIA ROBERTA FELIZARDO

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de
Bordetella bronchiseptica provenientes de diferentes
espécies animais**

São Paulo
2015

MARIA ROBERTA FELIZARDO

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Bordetella bronchiseptica* provenientes de diferentes espécies animais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

SÃO PAULO

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3106
FMVZ

Felizardo, Maria Roberta

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Bordetella bronchiseptica* provenientes de diferentes espécies animais / Maria Roberta Felizardo. -- 2015.
70 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicadas às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicadas às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. *Bordetella bronchiseptica*. 2. PFGE. 3. Suínos. 4. Coelhos. 5. Gatos. 6. Cães.
7. Concentração inibitória mínima. I. Título.

ERRATA

FELIZARDO, M. R. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Bordetella bronchiseptica* provenientes de diferentes espécies animais. 2015. 70f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
2.	<i>Bordetella bronchiseptica.</i>	2. <i>Bordetella bronchiseptica.</i>

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Isolamento e caracterização de *Pasteurella multocida* provenientes de cães e gatos”, protocolado sob o nº1450/2008, utilizando 150 (cento e cinquenta) cães e 150 (cento e cinquenta) gatos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/10/08.

We certify that the Research “Isolation and characterization of *P. multocida* from cats and dogs”, utilizing 150 (one hundred fifty) dogs and 150 (one hundred fifty) cats, protocol number 1450/2008, under the responsibility Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08.

São Paulo, 02 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FELIZARDO, Maria Roberta

Título: Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Bordetella
bronchiseptica* provenientes de diferentes espécies animais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais e minha família,
pela confiança e carinho*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, dedicação e luta para que eu realizasse o sonho de ser Médica Veterinária, possibilitando que um dia eu chegasse à Pós-Graduação.

A toda minha família, em especial a minha Madrinha e meus primos.

A Prof. Dra. Andrea Micke Moreno, pela confiança que depositou em mim, por toda paciência e orientação no mestrado e Doutorado. Pelo acolhimento, pelas oportunidades oferecidas e por todo conhecimento transmitido.

A todos os amigos e colegas que fiz no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia: Vasco Túlio de Moura Gomes, Ana Paula Santos da Silva, Alexandre Abelardo Sanches, Givago Faria, Bárbara Costa, Marina Moreno, Jucelia Pereira, Claudia Carranza, Ketrin Silva, Gabi Oliveira, Mirela Vilela, Rosi Andrade Louro, Pedro Henrique Filsner, Carlos Cabrera, Thatiane Lima, Renan Elias Mesquita, Nicholas Lotto, Bruna Barbosa, Cleise Ribeiro Gomes, Cristina Roman Amigo, Sergio de Mello Novita Teixeira, Danielle Raimundo, Thaís S. P. Ferreira, Tania Alen Coutinho, Melanie Gutjar, Renata Paixão, Maria Garcia Spindola.

Aos secretários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Danival Lopes Moreira, Virgínia P. Almeida Prado, Maria Cristina Paick, e aos funcionários Sandra Sanches e Orlando Bispo de Souza.

A todos os professores, colegas pós-graduandos e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal.

A CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

As minhas queridas amigas Monica Burza, Poliana Claus, Claudia de Souza Pregnolato, Carolin Paul, Tatiana Pavan.

"Primeiro foi necessário civilizar o homem em relação ao próprio homem. Agora é necessário civilizar o homem em relação à natureza e aos animais." - Victor Hugo

RESUMO

FELIZARDO, M. R. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Bordetella bronchiseptica* provenientes de diferentes espécies animais** [Phenotypic and genotypic characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains from different animal species]. 2015. 70f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Bordetella bronchiseptica é um agente respiratório zoonótico comumente encontrado em diversas espécies animais domésticos como cães, gatos, coelhos, suínos, aves e equinos. As infecções em humanos ocorrem ocasionalmente, sendo descritas com maior frequência em indivíduos imunocomprometidos, mas relatos de casos de doença em adultos saudáveis e crianças têm aumentado. O presente estudo teve como objetivos determinar o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *B. bronchiseptica* isoladas de cães, gatos, coelhos e suínos, caracterizar as cepas pela eletroforese em campo pulsado (PFGE), e comparar os resultados obtidos com os dados epidemiológicos. Foram avaliadas 145 cepas e estas apresentaram 100% de resistência a ampicilina, penicilina, espectinomicina, clindamicina, tiamulina e tilosina. Taxas de resistência superiores a 95% das cepas foram observadas frente a tilmicosina, danofloxacina e ceftiofur. Os antimicrobianos com menores taxas de resistência foram enrofloxacina (2,1%) e clortetraciclina (11%). As cepas isoladas de coelhos apresentaram menores taxas de resistência que as de suínos e de animais de companhia. A caracterização das cepas pela PFGE permitiu a separação de acordo com as espécies de origem em diferentes pulsotipos. A caracterização do agente, principalmente no que se refere à resistência a antimicrobianos, será de grande utilidade para os veterinários no controle das infecções pelo mesmo em suínos, animais de companhia e coelhos, visto que os dados sobre este agente etiológico no Brasil são escassos.

Palavras-chave: *Bordetella bronchiseptica*, PFGE, suínos, coelhos, gatos, cães, concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

FELIZARDO, M. R. **Phenotypic and genotypic characterization of *Bordetella bronchiseptica* from different animal species** [Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Bordetella bronchiseptica* provenientes de diferentes espécies animais]. 2015. 70f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Bordetella bronchiseptica is a zoonotic respiratory agent commonly found in domestic animals as dogs, cats, rabbit, swine, birds and horses. Infections in humans occur rarely and have been described more frequently in immunocompromised individuals, but reports of cases of illness in healthy adults and children have increased. This study aims to characterize the resistance profile of *B. bronchiseptica* strains isolated from dogs, cats, rabbits and pigs and evaluate the strains by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), comparing the results with epidemiological data. From 145 strains tested 100% presented resistance to ampicillin, penicillin, spectinomycin, clindamycin, tiamulin and tylosin. Resistance rates higher than 95% were found against tilmicosin, danofloxacin and ceftiofur. The antimicrobials with lower resistance rates were enrofloxacin (2.1%) and chlortetracycline (11%). Strains isolated from rabbits presented low resistance rates when compared with swine and pet animals. The PFGE analysis separated the strains according specie of origin in different pulsotypes. The agent characterization, mainly in relation with antimicrobial resistance will be of great help to veterinarians in control of infections in swine, pets and rabbits, since data about this bacteria in Brazil are rare.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*, PFGE, swine, cats, dogs, rabbits, Minimum Inhibitory Concentration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2.1 ETIOLOGIA	13
2.2 GÊNERO BORDETELLA	14
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	15
2.3.1 HEMAGLUTININA FILAMENTOSA	15
2.3.2 FÍMBRIAS.....	16
2.3.3 PERTACTINA.....	17
2.3.4 ADENILATO CICLASE OU HEMOLISINA (AC)	17
2.3.5 TOXINA DERMONECRÓTICA.....	18
2.3.6 CITOTOXINA TRAQUEAL (TC).....	19
2.3.7 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	20
2.3.8 PROTEÍNAS DO LÓCUS RESISTÊNCIA AO SORO (LÓCUS BRK)	20
2.4 INFECÇÃO NOS ANIMAIS	21
2.4.1 CÃES.....	21
2.4.2 GATOS.....	23
2.4.3 COELHOS	24
2.4.4 SUÍNOS.....	25
2.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO AGENTE	26
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 AMOSTRAS	30
4.2 ISOLAMENTO DO AGENTE	30
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	31
4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA (PCR)	32
4.5 DETECÇÃO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO	32
4.6 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA (MIC)	33
4.7 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	35
4.8 ANÁLISE DOS FRAGMENTOS	36
4.9 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (DI)	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Bordetella bronchiseptica é um agente respiratório zoonótico comumente encontrado em animais de companhia, como cães, gatos, coelhos e em animais de produção, como os suínos. A bactéria foi isolada pela primeira vez durante a primeira década do século XX, por Ferry, McGowan e outros, em estudos envolvendo cães que sofriam de cinomose (MATTOO; CHERRY, 2005).

Em cães a infecção por *Bordetella bronchiseptica* é um dos agentes causadores da “tosse dos canis”. A doença é caracterizada por uma traqueobronquite, com congestão e inflamação do revestimento da mucosa da traquéia e brônquios (MATTOO; CHERRY, 2005). O quadro pode ser causado por mais de um agente infeccioso, incluindo o adenovírus canino tipo 2 (AVC2), e o vírus da parainfluenza (VPI) (NELSON; COUTO, 2006).

Na espécie suína o agente pode causar broncopneumonia acometendo desde leitões lactentes a animais das fases de crescimento e terminação, podendo ocasionar alta mortalidade nos animais mais jovens. As cepas toxigênicas de *Bordetella bronchiseptica* causam a rinite atrófica não progressiva (RANP) e pode atuar juntamente com a *Pasteurella multocida* toxigênica causando a rinite atrófica progressiva (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

Este agente bacteriano tem sido cada vez mais relatado em infecções respiratórias em gatos. Nesta espécie animal, infecções do trato respiratório superior são geralmente relacionadas a Herpesvirus felino, Calicivirus ou *Chlamydomphila felis*. Recentemente, um maior número de casos tem sido associado a *B. bronchiseptica*, embora o papel de outros patógenos não tenha sido sempre

avaliado. Estudos experimentais indicam que *B. bronchiseptica* pode ser um patógeno primário em gatos, através da reprodução do quadro em animais livres de patógenos específicos (BINNS et al., 1999).

A literatura descreve uma alta frequência de coelhos portadores de *Bordetella bronchiseptica* no trato respiratório superior. Usualmente não apresentam quadro clínico, embora apresentem lesões no epitélio de traqueia e brônquios. Pneumonia causada por *Bordetella bronchiseptica* em coelhos é muito rara (OKERMAN, 1988).

As infecções em humanos ocorrem ocasionalmente, sendo descritas com maior frequência em indivíduos imunocomprometidos, mas relatos de casos de doença em adultos saudáveis e crianças têm aumentado. Existem poucos dados epidemiológicos relacionados ao agente, por isso, seria necessário um maior aprofundamento, para saber como ocorre a infecção em humanos. A caracterização molecular do agente é necessária para uma maior compreensão dos aspectos genéticos e fenotípicos associados a estes quadros e também permitirá compreender melhor os mecanismos e os fatores ambientais específicos do agente que levam à exposição e transmissão inter-espécies. Isto é particularmente importante na determinação do potencial zoonótico de infecções por *B. bronchiseptica* (SUKUMAR et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Bordetella* é composto por cocobacilos, Gram-negativos, com cerca de 0,5 µm X 0,2 µm de tamanho, pertencentes à família Alcaligenacea. O agente é móvel, aeróbio, que não fermenta carboidratos (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

As células bacterianas possuem superfície coberta de fimbrias. Mas a estrutura da célula é a mesma das demais bactérias Gram-negativas (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003).

O agente é catalase e oxidase-positiva, utiliza o citrato como fonte de carbono orgânico, reduz nitrato, degrada uréia, cresce em ágar MacConkey e obtém energia através da oxidação de aminoácidos (QUINN et al., 1994; BIBERSTEIN; HIRSH, 2003). O agente é destruído pelo calor ou desinfetantes, são sensíveis a vários antibióticos de amplo espectro de ação, mas apresenta resistência a maioria dos antimicrobianos beta- lactâmicos. Sua capacidade de sobrevivência no ambiente é epidemiologicamente importante (QUINN et al., 1994).

É habitante primário do trato respiratório superior de animais e humanos, é mundialmente distribuído, possuindo especial afinidade pelo tecido ciliar do trato respiratório (QUINN et al ., 1994; GUEIRARD; GUIZO, 1993).

2.2 GÊNERO *BORDETELLA*

A bactéria classificada atualmente dentro do gênero *Bordetella*, teve uma existência taxonômica dinâmica, não tendo sido sempre classificada neste gênero. Lopez (1952) propôs que um novo grupo, o gênero *Bordetella* fosse criado incluindo três espécies: *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* (LOPEZ, 1952). As evidências moleculares mais recentes, incluindo análise de seqüências de DNA, eletroforese de isoenzimas e tipagem por PCR, justificam o agrupamento destas três espécies no mesmo gênero (ZEE et al., 1997) e (ARICO; RAPPUOLI, 1987). Um fato que chama atenção é que, estranhamente, a *Bordetella pertussis* é a única que está adaptada a uma simples condição e tem sido somente encontrada infectando humanos.

A *B. parapertussis* causa em humanos uma coqueluche mais branda e tem sido relatada em infecções respiratórias em ovinos (CULLINANE et al., 1987).

A *B. bronchiseptica* coloniza a maioria dos outros mamíferos, causando doenças que tem implicações comerciais (GOODNOW, 1980), sendo a mais importante a que está associada à rinite atrófica em suínos, que traz perdas consideráveis às indústrias (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

A espécie *B. avium* tem sido relatada em casos de coriza em perus e infecção respiratória em aves domésticas e silvestres.

Nos últimos 15 anos novas espécies foram descritas, são elas *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. ansorpii* e *B. Petrii*. Recentemente novas espécies têm sido propostas para este gênero. *B. hinzii* é o nome que assinala uma nova espécie isolada de bacteremias de indivíduos com AIDS (COOKSON et al., 1994).

Associada com a septicemia humana, outra espécie, designada *B. holmensii* também foi identificada (WEYANT et al., 1995). O nome *B. trematum*, foi recentemente proposto para novas espécies isoladas de ferimentos e infecções do ouvido (DAMME et al., 1995). Embora nenhuma dessas espécies esteja associada com infecções do trato respiratório, elas são similares a outros membros do gênero baseado em análises filogenéticas (COOKSON et al., 1994; DAMME et al., 1996). Desde sua descoberta, *B. hinzii* tem sido isolada do trato respiratório de espécies de galináceos infectados (DAMME et al., 1995).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência são tipicamente divididos em duas principais categorias: adesinas e toxinas (CARVALHO; PEREIRA, 2006). O grupo das adesinas, que promove a adesão da bactéria ao epitélio, inclui a hemaglutinina filamentosa, fímbrias, pertactina, fator de resistência à destruição bacteriana e fator de colonização traqueal. Compõe o grupo das toxinas a toxina pertussis, adenilato ciclase, toxina dermonecrótica e citotoxina traqueal.

2.3.1 HEMAGLUTININA FILAMENTOSA

A hemaglutinina filamentosa também promove uma grande produção de anticorpos, tanto humoral quanto de mucosas. O estímulo na resposta imunológica do hospedeiro também é determinado pelas fímbrias e pela pertactina, aparentemente importante antígeno para vacinas (CARVALHO; PEREIRA, 2006).

A hemaglutinina filamentosa é uma proteína de 220-kD associada a superfície bacteriana e secretada para o ambiente extracelular para facilitar a aderência às células ciliadas do epitélio respiratório, que dá início ao ciclo patogênico. Estes filamentos também podem trabalhar como uma ponte de adesina, facilitando a adesão de outros microrganismos (TUOMANEN, 1985).

2.3.2 FÍMBRIAS

Fímbrias são apêndices bacterianos filamentosos de natureza protéica, visíveis através de microscopia eletrônica. A maioria das fímbrias bacterianas apresenta uma forte afinidade adesiva pela superfície de hemácias e outros tipos de células de animais, plantas e fungos (DUGUID et al., 1966; BOROWSKI, 2001).

O papel das fímbrias na virulência de diversas espécies é amplamente documentado, e sua presença está associada à patogenicidade e a colonização da célula hospedeira (DOUGHTY; RUFFOLO; ADLER, 2000). Também são conhecidos como pili ou aglutinogênios (MOOI et al., 1986; STEVEN et al., 1986).

2.3.3 PERTACTINA

Também conhecida como p.69 e OMP 69 devido a sua mobilidade eletroforética, a pertactina também está envolvida na aderência bacteriana (LEININGER et al., 1991; MAKOFF et al., 1990). Não se conhece os mecanismos pelos quais a pertactina adere as células eucarióticas nem tampouco foi identificado algum receptor para ela. Acredita-se que proteínas como fibronectina e vitronectina facilitam a ligação desta proteína às células de mamíferos (HYNES, 1987; HYNES, 1992). A presença de pertactina foi relatada em uma cepa de *B. bronchiseptica* que conferia imunidade protetora em animais susceptíveis (NOVOTNY et al., 1985; MONTARAZA et al., 1985)

2.3.4 ADENILATO CICLASE OU HEMOLISINA (AC)

A adenilato ciclase é uma proteína bifuncional, que se insere na membrana plasmática de células fagocíticas do hospedeiro, com a formação de canais ou poros que provocam a lise da célula. Pertence à família RTX ("Repeat toxins") de exotoxinas que tem propriedades estimulatórias sobre o sistema imune e hemolítico (COOTE, 1992). Ambas as atividades, de adenilato ciclase e hemolítica, têm sido demonstradas como essenciais ao início do processo infeccioso da *Bordetella* (KHELEF et al., 1992).

A invasão das células do hospedeiro pela adenilato ciclase/hemolisina não é efetuada através de uma via endocítica mediada por receptor. Possivelmente é utilizado um sistema de entrada especializado e dependente de cálcio e de temperatura ainda não inteiramente compreendido (GORDON et al., 1989).

2.3.5 TOXINA DERMONECRÓTICA

Bactérias patogênicas do gênero *Bordetella* produzem toxina dermonecrótica (DNT), esta toxina é composta por uma cadeia simples de polipeptídeos com 464 aminoácidos, com uma região N-terminal de pelo menos 54 aminoácidos, responsáveis por se ligar ao receptor da célula alvo e à região C-terminal de cerca de 300 aminoácidos, conferindo a atividade de transglutaminase (FUKUI-MIYAZAKI et al., 2010). O receptor para toxina dermonecrótica ainda não é conhecido. A ativação da Rho GTPase causa a expressão de fenótipos Rho-dependentes aberrantes, os quais devem estar associados com alterações patológicas observadas durante a infecção por *Bordetella*. Por exemplo, a atrofia de cornetos observada na rinite atrófica não progressiva dos suínos é causada pela ação da DNT nos osteoblastos, no entanto, não há evidência de que a toxina seja secretada ativamente pela bactéria e menos de 0,75% da toxina produzida pela bactéria foi detectada em sobrenadantes de cultura de *B. bronchiseptica* e *B. pertussis*. Não se sabe como está pequena quantidade de toxina exerce efeito sobre as células alvo (osteoblastos) localizadas abaixo das células epiteliais e do tecido conjuntivo (FUKUI-MIYAZAKI et al., 2010).

2.3.6 CITOTOXINA TRAQUEAL (TC)

A maior atividade biológica desta toxina é sua habilidade de promover danos às células do tecido epitelial respiratório (COOKSON, 1989). Trata-se de uma exotoxina derivada de um peptídeoglicano, parecido com a maioria das macromoléculas deste tipo provenientes de procariontes. Possui uma atividade marcadamente seletiva: é responsável por danos específicos em células ciliadas, desabilitando uma barreira e um mecanismo de defesa primária nos pulmões. Os evidentes episódios de tosse tão característicos da coqueluche constituem-se de uma ação desesperada do organismo, desencadeada com a finalidade de limpar o acúmulo de muco, bactérias e produtos inflamatórios estagnados no caminho do ar, devido à ciliostase causada por esta toxina (GOLDMAN, 1988; LUKER et al., 1995).

A toxicidade conferida por esta toxina é indireta, sendo primeiramente causada pela indução das células do hospedeiro a produzir interleucina-1 (HEISS et al., 1993). Isto ativa as células do hospedeiro a sintetizar óxido nítrico o que conduz a níveis elevados de radicais de óxido nítrico (HEISS et al., 1994). Não está ainda absolutamente certo se é a citotoxina traqueal ou a interleucina-1 que estimula a síntese do óxido nítrico. O óxido nítrico age destruindo enzimas ferro-dependentes, eventualmente inibindo a função mitocondrial e a síntese do DNA em células próximas do hospedeiro (HEISS, 1993).

2.3.7 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

Lipopolissacarídeo (LPS) é um dos componentes principais da membrana exterior de bactérias Gram negativas, contribuindo muito para a integridade estrutural da bactéria, protegendo a membrana de certos tipos de ataques químicos (PRESTON et al., 2006).

O LPS é uma endotoxina que provoca uma forte resposta por parte do sistema imune de animais normais, geralmente compõe-se de um lipídio A e um polissacarídeo denominado antígeno “O”. Embora a *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella bronchiseptica* estejam geneticamente relacionadas, sintetizam lipopolissacarídeos (LPS) de forma diferente. Todos os LPS das três compartilham o lipídeo A e estruturas nucleares, mas apenas a *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* sintetizam antígenos “S” (PRESTON et al., 2006).

2.3.8 PROTEÍNAS DO LÓCUS RESISTÊNCIA AO SORO (LÓCUS BRK)

O locus brk consiste de dois genes responsáveis pela produção de duas proteínas: brkA de 103 KDa localizada na membrana e o brkB uma proteína citoplasmática de 32 kDa. Ambas são importantes para o que se denominou de resistência ao soro (FERNANDEZ; WEISS, 1994). São proteínas similares à pertactina, por isso, possivelmente, desempenham também um papel na aderência e na invasão da bactéria. O locus brk existe em todas as espécies de *Bordetella*, exceto na *B. avium* e possui homólogos nas espécies *B. parapertussis* e *B.*

bronchiseptica.

2.4 INFECÇÃO NOS ANIMAIS

Transmissão de animal para animal é por contato direto com secreções respiratórias, fômites e talvez por aerossol. Porter et al. (1991) sugerem que o organismo pode crescer em lagos, o que sugere que *Bordetella bronchiseptica* podem ocorrer como um organismo de vida livre. Se for este o caso, então a transmissão para várias espécies animais poderia ocorrer sem contato direto.

Uma das maiores dificuldades no estudo da epidemiologia da *B. bronchiseptica* em colônias de animais de laboratório, canis, e em baias de suínos é a alta taxa de infecção assintomática com a liberação prolongada do organismo. Em cobaias, há relatos da incidência de infecção assintomática elevada, na faixa de 20%. Taxas de infecção assintomática altas também ocorrem em criações de coelhos (MATOO; CHERRY, 2005).

2.4.1 CÃES

A traqueobronquite infecciosa canina, ou “tosse dos canis”, é uma doença aguda, altamente contagiosa, localizada nas vias aéreas. Pode ser causada por um ou mais agentes infecciosos associados, incluindo o adenovírus canino tipo 2 (AVC2), o vírus da parainfluenza (VPI) e a *Bordetella bronchiseptica*. Patógenos secundários também podem estar envolvidos na infecção (NELSON; COUTO, 2006). Além do quadro de traqueobronquite os cães podem apresentar comprometimento ciliar e imunossupressão respiratória local.

Os animais infectados apresentam uma tosse acentuada, com início súbito, produtiva ou não, que é frequentemente exacerbada pelo exercício ou pela pressão da coleira no pescoço do animal. A palpação da traqueia pode facilmente induzir à tosse. Podem ocorrer também engasgos, ânsias de vômitos ou corrimento nasal. Geralmente a infecção ocorre quando os animais ficam hospedados em hotéis para animais, hospitalizados ou quando há contato com um filhote ou adulto com sinais semelhantes. Os filhotes recém-adquiridos de lojas de animais, canis ou entidades protetoras são frequentemente expostos ao agente (NELSON; COUTO, 2006).

Animais apresentam perda de peso, anorexia persistente ou sinais de envolvimento de outros órgãos, como diarreia, convulsões, podem ter alguma outra doença mais grave, como cinomose, já que a traqueobronquite infecciosa não complicada não apresenta os sinais clínicos de uma doença sistêmica. Em filhotes a pneumonia bacteriana pode ser secundária à traqueobronquite infecciosa. A infecção por *Bordetella* foi associada à bronquite crônica, mas não se sabe qual das doenças ocorre inicialmente. (NELSON; COUTO, 2006).

Embora o tratamento com antibióticos possa eliminar as bactérias patogênicas, o aparente fracasso na resposta aos antibióticos ou agravamento dos sinais clínicos quando o tratamento é instituído, pode ocorrer devido a co-infecção por agentes virais ou pela liberação de citotoxina traqueal a partir da morte de células de *B. bronchiseptica*. Nos abrigos de animais, a “tosse dos canis” representa um problema importante, porque é facilmente transmissível, reduz as taxas de adoções de animais afetados, e requer tratamento médico intensivo (FOLEY et al., 2002).

Quando cães e gatos vivem em grande proximidade, tanto em casas, como em criatórios, há a possibilidade de que o agente seja transmitido de uma espécie

para outra. Em estudos epidemiológicos recentes, contato com cães apresentando doença respiratória, foi identificado como um importante fator de risco para a infecção de *B. bronchiseptica* em gatos, e a eletroforese de campo pulsado (PFGE) revelou que cepas isoladas de cães e gatos do mesmo agregado familiar, muitas vezes apresentam padrões genéticos similares (BINNS et al., 1998; DAWSON, et al., 2000).

2.4.2 GATOS

Bordetella bronchiseptica tem sido cada vez mais associada a infecções respiratórias em gatos. Nesta espécie animal, infecções do trato respiratório superior são geralmente relacionadas a Herpesvirus felino, Calicivirus ou *Chlamydomphila felis*. Recentemente, um maior número de casos têm sido relacionado a *B. bronchiseptica*, embora o papel de outros patógenos não tenha sido sempre avaliado. Estudos experimentais indicam que *B. bronchiseptica* pode ser um patógeno primário em gatos, através da reprodução do quadro em animais livres de patógenos específicos (BINNS et al., 1999).

Evidências epidemiológicas sugerem que os gatos podem ser portadores sãos do agente. Em estudo experimental observou-se que o agente foi eliminado a partir da orofaringe de gatos previamente infectados por pelo menos 19 semanas pós-infecção. No mesmo estudo, duas fêmeas soropositivas voltaram a eliminar *B. bronchiseptica* após o parto, mesmo já tendo sido identificadas como negativas para a eliminação do agente (GASKELL, 1998). Binns et al. (1998), sugerem que a transmissão de *B. bronchiseptica* entre espécies pode contribuir para a

disseminação no ambiente de abrigos. Gatos com *B. bronchiseptica* podem atuar como reservatórios para população de cães em abrigos de animais.

Segundo Welsh (1996), gatos filhotes (imaturos), são mais susceptíveis a infecção. Dos 11 casos apresentados por Welsh (1996), sete dos gatos tinham oito ou menos semanas de vida. Binns et al. (1999), ao avaliarem 740 animais de diferentes idades não observaram relação entre a idade e o isolamento do agente.

Estudos baseados no isolamento do agente indicaram que o mesmo ocorreu em frequências de 3,5% (6/176), 5% (34/576) e 8% (59/740) nas populações de felinos estudadas por diferentes autores (SPEAKMAN et al., 1999; MCARDLE et al., 1994, BINNS et al., 1999).

2.4.3 COELHOS

Praticamente todos os coelhos são portadores de *Bordetella bronchiseptica*. Usualmente não se apresentam doentes, embora apresentem lesões no epitélio de traqueia e brônquios. Pneumonia causada por *Bordetella bronchiseptica* em coelhos é muito rara (OKERMAN, 1988).

O agente é provavelmente o causador de “roncos” em coelhos. Os animais apresentam respiração forte, mas sem coriza. Essas condições não criam maiores prejuízos aos animais. Quando tratados com tetraciclina os sinais clínicos geralmente desaparecem (OKERMAN, 1988).

2.4.4 SUÍNOS

A bordetelose pulmonar em suínos é caracterizada por uma broncopneumonia de curso agudo, que acomete desde leitões lactentes até animais das fases de crescimento e terminação, em animais mais jovens pode ocasionar alta mortalidade (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

Além dos quadros pulmonares a *B. bronchiseptica* pode causar a rinite atrófica não progressiva. A rinite atrófica, mantém-se nos rebanhos de forma insidiosa, sem mortalidade, porém, com impacto econômico elevado, devido à redução no ganho de peso e piora da conversão alimentar, que pode atingir até 17%, em animais com lesões graves (SOBESTIANSKY, 1999).

Os principais sinais clínicos da rinite atrófica não progressiva são espirros, descargas nasais e oculares de caráter seroso a mucoso (SOBESTIANSKY et al., 1999), sendo observados, com frequência, entre a terceira e quarta semanas de idade, ou seja, por volta da época do desmame. A explicação desse fato pode estar relacionada à queda dos títulos dos anticorpos colostrais e o estresse oriundo da mudança de ambiente e da mistura de animais (DE JONG, 1999; PIJOAN; DEE, 2004). No entanto, os leitões podem infectar-se em qualquer idade, incluindo animais adultos (DE JONG, 1999).

A atrofia dos ossos turbinados nasais induzidas pela *B. bronchiseptica* é a lesão macroscópica mais frequentemente observada, sendo geralmente menos severa que a induzida pela *P. multocida* (DE JONG, 1999). Esta lesão é causada pela inibição da osteogênese, devido aos danos promovidos aos osteoblastos e às células osteoprogenitoras pela ação da toxina dermonecrótica eliminada pela *B.*

bronchiseptica (HORIGUCHI; NAKAI; KUME, 1991). A regeneração óssea dos cornetos nasais ocorre até o período em que os leitões atingem o peso de abate (BEMIS; BURNS Jr., 1993).

2.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO AGENTE

Muitos aspectos da biologia da *B. bronchiseptica* têm sido estudados incluindo a morfologia da colônia, produção de hemolisinas, hemaglutinação, presença de plasmídeos. No entanto, estudos abordando a genotipagem desta espécie são escassos. A caracterização fenotípica baseada na expressão de características celulares pode variar de acordo com o meio de cultura ou condições experimentais e tem sido gradualmente substituído pela análise genômica do DNA bacteriano (SHIN et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2005).

Uma série de técnicas moleculares, incluindo análise por enzimas de restrição (restriction enzyme analysis – REA), amplificação randômica de regiões polimórficas (RAPD), ribotipagem, análise de perfil de macro restrição ou eletroforese em campo pulsado (PFGE), têm sido empregados em estudos epidemiológicos incluindo diferentes cepas de *B. bronchiseptica*, os resultados indicam a existência de uma diversidade genômica considerável entre as cepas (SHIN et al., 2007).

Sacco; Register; Nordholm, (2000), utilizaram análise com enzimas de restrição (REA) em 195 cepas de *B. bronchiseptica* provenientes de 12 espécies animais e originadas de diferentes países, neste estudo as cepas revelaram 48 padrões de corte diferentes após a digestão com *Hinf* I e 39 perfis com a enzima *Alu* I.

A análise através da técnica de ribotipagem de isolados de *B. bronchiseptica* provenientes de diferentes espécies animais permitiu a separação destes em grupamentos distintos (REGISTER; BOISVERT; ACKERMANN, 1997). Keil e Fenwick (1999) combinaram RAPD e ribotipagem para avaliar a similaridade genética entre 26 isolados de *B. bronchiseptica* de origem canina.

A técnica de eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE) foi utilizada por Binns et al. (1998) para caracterizar 164 isolados e identificaram 17 pulsotipos com numerosos subtipos (SHIN et al., 2007; BINNS et al., 1998). A técnica de PFGE permite a separação de fragmentos de grandes dimensões. Nos métodos eletroforéticos convencionais, a separação de moléculas lineares de DNA (até 50 kb) é efetuada em função da sua massa molecular, quando se aplica um campo elétrico unidirecional. O limite de resolução é atingido quando o raio de giro da molécula de DNA excede o tamanho médio do poro do gel forçando as moléculas a percorrerem um percurso sinuoso e a mobilidade eletroforética passa a ser independente da massa molecular. Na eletroforese em campo pulsado utilizam-se campos elétricos alternados que forçam as moléculas de DNA a mudar continuamente de direção. Esta separação é baseada no maior tempo que moléculas de maior dimensão levam a mudar de direção de migração. Quanto maior for a molécula de DNA, maior é o tempo necessário para a sua reorientação e é nesta diferença dos tempos de reorientação que se baseia a separação das moléculas. O parâmetro crítico que afeta a separação das moléculas é o tempo do pulso, que é a duração da aplicação do campo elétrico numa dada direção (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

A PFGE é utilizada tanto para estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções, quanto na comparação de populações bacterianas, envolvendo

microrganismos de diferentes países, ampliando o alvo epidemiológico da técnica. O DNA bacteriano total, incorporado em blocos de agarose, é digerido com enzimas de restrição que quebram o cromossomo em grandes fragmentos. Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese de campo pulsado, sendo que os padrões de fragmentos observados em cada cepa são denominados pulsotipos (MAGALHÃES et al., 2005). Trata-se de uma técnica com elevado poder discriminatório e que tem sido considerado padrão ouro na caracterização de agentes bacterianos há alguns anos, mas é importante ressaltar que métodos de tipagem não substituem dados epidemiológicos, somente auxiliam e, se utilizados sozinho, pode levar a conclusões equivocadas (MAGALHÃES et al., 2005).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi caracterizar cepas de *B. bronchiseptica* isoladas de cães, gatos, coelhos e suínos através de métodos fenotípicos e genotípicos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos através da determinação da concentração inibitória mínima.
- Caracterizar os isolados através da eletroforese em gel de campo pulsado
- Comparar os resultados obtidos com os dados epidemiológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados estão descritos a seguir:

4.1 AMOSTRAS

Foram analisadas 145 cepas de *B. bronchiseptica* isoladas de cães, gatos, coelhos e suínos, isoladas nos últimos cinco anos em diferentes estados do Brasil e estocadas a – 86° C na coleção de culturas do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia.

4.2 ISOLAMENTO DO AGENTE

As cepas foram reativadas em caldo BHI com 5% de soro fetal bovino e semeadas em Agar Smith-Baskerville sem adição de antimicrobianos, por 48 horas a 37° C em aerobiose. As colônias características foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase para confirmação da espécie (SMITH; BASKERVILLE, 1979).

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA bacteriano foi purificado pela extração de DNA baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do isotiocianato de guanidina junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA. Este método para purificação de ácidos nucleicos foi descrito por Boom et al. (1990).

Um microtubo contendo 200 µL de um cultivo puro de *B. bronchiseptica* em infusão cérebro-coração (BHI) recebeu 1000 µL de tampão de lise (120 g isotiocianato de guanidina, 1 mL Triton 100 X, 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 8,8 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL H₂O MilliQ ®), 40 µL de solução carreadora (1 g de Diatomaceous Earth, 50 µL HCl 37 % e 5 mL H₂O MilliQ ®) e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente o microtubo, no qual as células bacterianas já se encontravam lisadas e os DNAs ligados às partículas de sílica, foi centrifugado a 12000 x g por um minuto e 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e o pelete resultante foi submetido a cinco lavagens seguidas. As duas primeiras com 500 µL de tampão de lavagem (120 g isotiocianato de guanidina e 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] em 100 mL H₂O MilliQ ®), as duas seguintes com 500 µL de etanol 70 % (- 20 °C) e a última com 500 µL de acetona. Após as lavagens o microtubo contendo o pelete foi mantido em estufa a 37 °C por cerca de 60 minutos. O pelete foi ressuspensionado pela adição de 150 µL de tampão de eluição (1 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 0,2 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL de H₂O MilliQ ®), centrifugado a 12000 x g por cinco minutos, removido o sobrenadante (DNA eluído da sílica) e, este, foi armazenado a -20 °C até sua amplificação (BOOM et al., 1990).

4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA (PCR)

A PCR foi realizada segundo descrito por Hozbor et al. (1999) utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles dos *primers* específicos para *B. bronchiseptica* (Fla 2 - AGG CTC CCA AGA GAG AAA GGC TT e Fla 4- TGG CGC CTG CCC TATC), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 200µM de cada dNTP, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A reação será submetida à desnaturação à 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto à 94° C, 1 minuto à 58° C e 1 minuto à 72° C.

4.5 DETECÇÃO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO

Os produtos de amplificação foram segregados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, utilizando-se tampão TBE 0,5 X (Tris-base 45 mM, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA pH 8). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (BioRad) por meio do uso do corante BlueGreen ® (LGC Biotecnologia) e identificados com base na utilização de marcador de pares de base 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

4.6 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA (MIC)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se o painel Sensititre (BOPO6F– Trek Diagnostics Systems, Ohio/ EUA). Os antimicrobianos testados foram: ampicilina (AMP), clindamicina (CLI), clortetraciclina (CTET), danofloxacin (DANO), enrofloxacin (ENRO), florfenicol (FFN), gentamicina (GEN), neomicina (NEO), oxitetraciclina (OXY), penicilina (PEN), sulfadimetoxina (SDM), espectinomicina (SPE), trimetoprima / sulfametoxazole (STX), tiamulina (TIA), tilmicosina (TIL), tulatromicina (TULA), tilosina (TYLT), ceftiofur (XNL) and enrofloxacin (ENO).

O inóculo bacteriano utilizado no teste de concentração inibitória mínima foi preparado a partir de uma cepa isolada e cultivada em caldo cérebro-coração (BHI) incubado a 37°C por 48 horas. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro (0,150 a 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada continha aproximadamente 1 a 2 X 10⁸ UFC/mL.

Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1: 1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco-BBL, Detroit, MI/USA) de maneira a obter uma concentração final de aproximadamente 5 x 10⁵ UFC/mL e então, 50µl desta suspensão foram distribuídos em cada poço da placa. Após distribuição do inóculo na placa, esta foi selada com adesivo fornecido pelo próprio fabricante e incubada a 37 °C por 24 horas em aerobiose.

O resultado do teste de microdiluição fornece a concentração inibitória mínima, que pode ser traduzida como a menor concentração de agente

antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo nos poços da microplaca. O crescimento pode ser detectado pela visualização a olho nu de um “botão” no fundo do poço em “u” da placa, denotando o crescimento e a consequente precipitação das células bacterianas ao fundo.

A cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle de qualidade como preconizado pelo manual do CLSI documento VET01-A4 e suplemento VET01-S2. Os pontos de corte empregados na análise dos resultados foram provenientes do suplemento VET01-S2.

Quadro 1- Critérios utilizados para avaliação dos resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Antimicrobianos	Sensível µg/mL	Intermediário µg/mL	Resistente µg/mL	Sigla
Ampicillina	≤0,5	1	≥2	AMP
Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8	TIO
Clindamicina	≤ 0.5	1-2	≥ 4	CLI
Clortetraciclina	≤2	4	≥ 8	CTET
Cotrimoxazol	≤ 2/38	-	>2/38	SXT
Danofloxacina	≤ 0.25	-	-	DAN
Enrofloxacina	≤ 0.5	1	≥ 2	ENO
Florfenicol	≤ 2	4	≥ 8	FFN
Gentamicina	≤ 2	4	≥ 8	GEN
Neomicina	≤ 8	-	-	NEO
Oxytetraciclina	≤2	4	≥ 8	OXY
Penicilina	≤ 0.12	-	≥ 0,25	PEN
Espectinomicina	≤ 32	-	≥ 64	SPE
Sulfadimetoxina	≤ 256	-	>256	SDM
Tiamulina	≤ 16	-	≥ 32	TIA
Tilmicosina	≤ 8	16	≥ 32	TIL
Tulatromicina	≤ 16	32	≥ 64	TUL
Tilosina	≤ 1	2-4	> 4	TYLT

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

As amostras foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad). Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano padronizada na diluição 1×10^9 , foi incorporada em agarose de baixo ponto de fusão e, após homogeneização, transferida para moldes plásticos. Os *plugs* de agarose resultantes contendo a amostra foram então submetidos a um processo de lise *in situ* e, posteriormente, estocado em tampão Tris-EDTA até o momento da eletroforese. Uma fração do *plug* foi submetida à digestão com a enzima de restrição *Xba* I e posteriormente adicionada ao gel de agarose 1%. A eletroforese foi conduzida em período de 24 horas a 6V/cm, ângulo fixo de 120° , com pulso inicial de 0,5 segundos e final de 40 segundos, em tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA 50 mM Tris, 45 mM Borato, 0,5 mM EDTA [pH 8.4]) mantido a 14°C . O gel foi corado por 20 minutos hora em corante Gel red® (Biotium) e a visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultravioleta em sistema de foto-documentação ImageMaster® (GE Healthcare). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de um marcador de alto peso molecular λ DNA-PFG Marker (New England Biolabs).

4.8 ANÁLISE DOS FRAGMENTOS

Para análise estatística dos fragmentos gerados pela PFGE foi utilizado o programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgica). A similaridade das amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice e pelo coeficiente denominado “número de bandas diferentes”. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os agrupamentos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA). As cepas foram classificadas como pulsotipos diferentes a partir de quatro bandas de diferença entre elas (VAN BELKUM et al., 2007).

4.9 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (DI)

Os resultados obtidos através do perfil bioquímico e da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), com a seguinte fórmula:

$$DI = 1 - \frac{\sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)}{N(N-1)}$$

onde N é o número de amostra da população teste, s é o número de diferentes tipo e n_j é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocadas em diferentes grupos.

5 RESULTADOS

As 145 cepas foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através da microdiluição em placa. Os resultados obtidos, os valores da CIM50, CIM 90 e as porcentagens de resistência são apresentados na tabela 1. O CIM50 e o CIM 90 representam as concentrações capazes de inibir o crescimento visível de 50% e 90% das amostras, respectivamente.

Todas as cepas testadas foram resistentes a ampicilina, penicilina, espectinomicina, clindamicina, tilosina e tiamulina (Tabela 2). A frequência de cepas resistentes foi elevada também para o ceftiofur (96,6%-140/145), danofloxacina: (97,9%-142/145), tilmicosina (98,6%-143/145), sulfadimetoxina (82%-129/145) e cotrimoxazol (71,7%-104/145).

As menores taxas de resistência foram observadas frente à enrofloxacin (2,1%-3/145), clortetraciclina (11%-16/145), oxitetraciclina (29,7%-43/145), gentamicina (29%-42/145), florfenicol (35,2%-51/145), tulatromicina (36,6%-53/145) e neomicina (36,6%-53/145). Nenhum antimicrobiano foi capaz de inibir o crescimento de 100% das cepas testadas dentro dos valores de corte preconizados pelo CLSI.

Tabela 1. Distribuição dos valores de MIC obtidos dentre as 145 cepas avaliadas, valores de MIC50, MIC90 e frequência de cepas resistentes.

Antimicrobianos	Número de cepas								CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	>16	>16	100
Ampicilina	0	0	0	0	0	2	19	124			
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	>8		>8	>8	96,6
Ceftiofur	1	0	2	2	0	0	140				
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	>16	>16	100
Clindamicina	0	0	0	0	0	1	0	144			
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	>8			≤0,5	8	11,0
Clortetraciclina	77	13	20	19	5	11					
CIM (µg/mL)	≤2/38	>2/38							>2/38	>2/38	70,7
Cotrimoxazol	41	104									
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	>1				1	>1	97,9
Danofloxacina	2	1	20	78	44						
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	2	>2			0,5	1	2,1
Enrofloxacin	3	23	92	24	3	0					
CIM (µg/mL)	≤8	16	32	64	>64				>64	>64	100
Espectinomicina	0	0	0	2	143						
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	>8		4	8	35,2
Florfenicol	0	1	2	15	76	37	14				
CIM (µg/mL)	≤1	2	4	8	16	>16			4	>16	29,0
Gentamicina	6	56	41	11	1	90					
CIM (µg/mL)	≤4	8	16	32	>32				8	>32	36,6
Neomicina	47	45	9	7	37						
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	>8			1	>8	29,6
Oxitetraciclina	66	15	9	12	16	27					
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	>8	>8	>8	100
Penicilina	0	0	0	0	0	0	0	145			
CIM (µg/mL)	≤256	>256							>256	>256	89
Sulfadimetoxina	16	129									
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	16	32	>32	>32	>32	100
Tiamulina	0	0	0	0	0	0	0	145			
CIM (µg/mL)	≤4	8	16	32	64	>64			64	>64	98,6
Tilmicosina	1	1	8	25	47	63					
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	16	32	>32	>32	>32	100
Tilosina	0	0	0	0	0	0	0	145			
CIM (µg/mL)	≤1	2	4	8	16	32	64	>64	32	>64	36,6
Tulatromicina	0	0	6	4	53	19	6	47			

*Células de preenchidas de cinza claro com uma barra na lateral esquerda indicam cepas resistentes aos antimicrobianos segundo os pontos de corte utilizados.

Tabela 2 - Frequência de cepas resistentes às diferentes classes de antimicrobianos dentre as 145 cepas de *B. bronchiseptica* testadas.

Classe	Antimicrobiano	Nº	(%)
Beta lactâmicos	Ampicilina	145	100
	Ceftiofur	140	96,6
	Penicilina	145	100
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	43	29,6
	Clortetraciclina	16	11,0
Fluorquinolonas	Danofloxacin	142	97,9
	Enrofloxacin	3	2,1
Aminoglicosídeos	Gentamicina	42	29
	Neomicina	53	36,6
	Espectinomicina	145	100
Fenicois	Florfenicol	51	35,2
Sulfas	Sulfadimetoxina	129	89
	Cotrimoxazol	104	71,7
Lincosamidas	Clindamicina	145	100
Pleuromutilinas	Tiamulina	145	100
Macrolídeos	Tilmicosina	143	98,6
	Tilosina	145	100
	Tulatromicina	53	36,6

Gráfico 1 - Porcentagem de cepas resistentes aos diferentes antimicrobianos testados dentre as 145 cepas de *B. bronchiseptica* testadas.

Na tabela 3 a é apresentada a frequência de resistência a antimicrobianos nas diferentes espécies avaliadas (suínos, gatos, cães e coelhos). As amostras de gatos e cães serão analisadas em conjunto como originadas de animais de companhia, uma vez que há apenas três isolados de cães. O gráfico 1 ilustra a porcentagem de cepas resistentes de acordo com o antimicrobiano testado.

A porcentagem de cepas resistentes a oxitetraciclina e a clortetraciclina foi superior em suínos que em gatos e cães ou em coelhos. Em suínos foram identificadas 37% das cepas resistentes a oxitetraciclina e 16% a clortetraciclina, em gatos e cães este valor foi 22,9% e 2,9% e em coelhos foi de 17,2% e 6,9% respectivamente.

A resistência a enrofloxacin só foi observada em 3,7% das cepas de origem suína, não sendo identificada em cepas das outras espécies animais.

A resistência a gentamicina e neomicina foi maior na espécie suína e nos animais de companhia que nas cepas isoladas de coelhos. O mesmo comportamento pode ser observado na resistência a florfenicol, cotrimoxazol, sulfadimetoxina e tilmicosina (Tabela 3).

A resistência a tulatromicina foi superior nos animais de companhia (60%) que nos suínos (32,1%) e nos coelhos (20,7%).

O gráfico 2 ilustra a porcentagem de cepas resistentes de acordo com o antimicrobiano testado e com as diferentes espécies animais avaliadas. O gráfico 3 indica qual a porcentagem de cepas de cada espécie dentre as resistentes a cada antimicrobiano testado. No caso da enrofloxacin, por exemplo, apenas cepas de origem suína foram resistentes, portanto estas representam 100% do total.

Tabela 3 - Frequência de cepas resistentes às diferentes classes de antimicrobianos dentre as cepas de *B. bronchiseptica* de suínos, cães e gatos e coelhos.

Classe	Antimicrobiano	Suínos N= 81		Gatos e cães N=35		Coelhos N=29	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Beta lactâmicos	Ampicilina	81	100	35	100	29	100
	Ceftiofur	80	98,8	31	88,6	29	100
	Penicilina	81	100	35	100	29	100
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	30	37,0	8	22,9	5	17,2
	Clortetraciclina	13	16,0	1	2,9	2	6,9
Fluorquinolonas	Danofloxacina	81	100	32	91,4	29	100
	Enrofloxacina	3	3,7	0	0	0	0
Aminoglicosídeos	Gentamicina	29	35,8	11	31,4	2	6,9
	Neomicina	30	37,0	19	54,3	4	13,8
	Espectinomicina	81	100	35	100	29	100
Fenicois	Florfenicol	36	44,4	11	31,4	4	13,8
Sulfas	Sulfadimetoxina	81	100	35	100	13	44,8
	Cotrimoxazol	70	86,4	26	74,3	8	27,6
Lincosamidas	Clindamicina	81	100	35	100	29	100
Pleuromutilinas	Tiamulina	81	100	35	100	29	100
Macrolídeos	Tilmicosina	81	100	35	100	27	93,1
	Tilosina	81	100	35	100	29	100
	Tulatromicina	26	32,1	21	60,0	6	20,7

Gráfico 2 - Porcentagem de cepas resistentes aos diferentes antimicrobianos testados de acordo com a espécie animal.

Gráfico 3 - Porcentagem de cepas de cada espécie animal dentre as cepas resistentes a cada antimicrobiano testado.

Tabela 4 – Perfis de resistência identificados entre as 145 cepas de *B. bronchiseptica* de suínos, cães e gatos e coelhos.

Perfil	Nº cepas	Antimicrobianos	Espécies
P1	39	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Coelho, Suíno, Gato
P2	10	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Coelho, Suíno, Gato
P3	9	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, GEN, NEO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Coelho, Suíno, Gato
P4	8	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, CLI, TIA, TYLT	Coelho
P5	6	TIO, PEN, AMP, CTET, OXY, DANO, GEN, NEO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato, Suíno
P6	6	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, CLI, TIA, TIL, TYLT	Coelho
P7	5	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT	Coelho, Suíno, Gato
P8	5	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Coelho, Suíno, Gato
P9	5	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, GEN, NEO, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Coelho, Suíno
P10	4	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, NEO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato, Suíno
P11	3	TIO, PEN, AMP, CTET, OXY, DANO, GEN, NEO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Suíno
P12	3	TIO, PEN, AMP, CTET, OXY, DANO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Suíno
P13	3	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, FFN, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT	Coelho, Suíno, Gato
P14	3	TIO, PEN, AMP, ENRO, DANO, SPE, FFN, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT	Suíno
P15	3	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, GEN, NEO, SPE, FFN, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato, Suíno
P16	2	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Suíno, Cão
P17	2	TIO, PEN, AMP, DANO, GEN, NEO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Suíno
P18	2	TIO, PEN, AMP, DANO, NEO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Suíno
P19	2	TIO, PEN, AMP, DANO, NEO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato
P20	2	TIO, PEN, AMP, DANO, GEN, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Suíno
P21	1	PEN, AMP, DANO, GEN, NEO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Cão
P22	1	PEN, AMP, DANO, GEN, NEO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato
P23	1	PEN, AMP, GEN, NEO, SPE, FFN, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Cão
P24	1	PEN, AMP, GEN, NEO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato
P25	1	PEN, AMP, OXY, DANO, GEN, NEO, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Suíno
P26	1	TIO, PEN, AMP, CTET, OXY, DANO, GEN, NEO, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Suíno
P27	1	TIO, PEN, AMP, CTET, OXY, DANO, GEN, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Suíno
P28	1	TIO, PEN, AMP, CTET, OXY, DANO, NEO, SPE, FFN, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Coelho
P29	1	TIO, PEN, AMP, CTET, OXY, DANO, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Coelho
P30	1	TIO, PEN, AMP, DANO, GEN, NEO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato
P31	1	TIO, PEN, AMP, DANO, GEN, NEO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato
P32	1	TIO, PEN, AMP, DANO, GEN, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT	Gato
P33	1	TIO, PEN, AMP, DANO, GEN, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Suíno
P34	1	TIO, PEN, AMP, DANO, NEO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT	Gato
P35	1	TIO, PEN, AMP, DANO, NEO, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato
P36	1	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Coelho
P37	1	TIO, PEN, AMP, DANO, SPE, SDM, CLI, TIA, TYLT	Coelho
P38	1	TIO, PEN, AMP, GEN, NEO, SPE, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato
P39	1	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, GEN, NEO, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Suíno
P40	1	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, NEO, SPE, CLI, TIA, TIL, TYLT	Coelho
P41	1	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, NEO, SPE, FFN, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato, Suíno
P42	1	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, NEO, SPE, SDM, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Gato
P43	1	TIO, PEN, AMP, OXY, DANO, SPE, FFN, SDM, SXT, CLI, TIA, TIL, TYLT, TUL	Suíno

As 145 cepas foram classificadas em 43 perfis de resistência de acordo com as diferentes combinações de resistência aos 18 antimicrobianos testados (Tabela 4). Os perfis P1, P2, P3, P7, P8 e P13 reuniram amostras de coelhos suínos e gatos e agruparam 71 cepas, representando 48,9% das cepas estudadas. O índice discriminatório (ID) da determinação do perfil de resistência foi igual a 0,91.

Considerando-se a análise dos perfis de resistência de acordo com as espécies animais (suínos, animais de companhia e coelhos) e avaliando apenas os antimicrobianos em que não houve 100% de resistência, foram construídos os dendrogramas das figuras 1, 2 e 3. Considerando apenas a espécie suína foram obtidos 23 perfis de resistência dentre as 81 cepas avaliadas, nas cepas oriundas de cães e gatos foram obtidos 23 perfis de resistência em 35 cepas testadas e nas cepas isoladas de coelhos foram determinados 14 perfis de resistência em 29 cepas. Calculando-se o valor do índice discriminatório nos três grupos de cepas separadamente é possível verificar que em suínos o ID dos perfis de resistência foi 0,86, em gatos e cães o ID foi igual a 0,92 e em coelhos foi igual a 0,87. Esta variação no índice discriminatório indica que houve maior diversidade de perfis nas cepas de animais de companhia em relação às cepas de suínos e coelhos.

Figura 1: Análise de cepas de *Bordetella bronchiseptica* isoladas de suínos de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos.

Figura 2: Análise de cepas de *Bordetella bronchiseptica* isoladas de gatos e cães de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos.

Figura 3: Análise de cepas de *Bordetella bronchiseptica* isoladas de coelhos de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos.

As 145 cepas foram caracterizadas através da PFGE e apresentaram 14 a 22 bandas com tamanho variando de 30 a 450 Kb sendo divididas em 32 pulsotipos denominados de PT1 a PT32 e identificados na figura 4. Através da análise do dendrograma (Figura 4) pode-se observar a formação de dois grupamentos principais denominados Grupo I e Grupo II com similaridade inferior a 60%. O Grupo I reuniu 139 das 145 cepas e o Grupo II apenas 6 cepas, duas de origem suína (Suíno 05) e 4 isoladas de gatos (Gato 10) representando dois pulsotipos (PT31 e PT32).

As 81 cepas de origem suína (marcadas em verde na figura 4) se concentraram em 15 pulsotipos. São eles os pulsotipos PT3, com apenas uma cepa de origem suína misturada a 12 cepas de coelho. PT5 a PT12 que reúnem 53 cepas (65,4% do total), sendo exclusivamente de origem suína e formando um grande cluster com similaridade superior a 70%. PT13 com três cepas, P18 com três cepas, PT20 com 16 cepas, PT23 com uma cepa, PT 30 e PT 31 ambos com duas cepas cada, sendo que todos estes últimos pulsotipos reuniram apenas cepas isoladas de suínos.

As cepas isoladas de gatos (marcadas em vermelho na figura 4) foram agrupadas em nove pulsotipos, sendo os pulsotipos PT15, PT16 e PT17 reunidos em um cluster de 11 cepas com similaridade superior a 70% provenientes de 6 animais, PT14 formado por 3 cepas de 2 animais, PT19 formado por 4 cepas de um animal, PT22 com 3 cepas de 2 animais, PT 27 com 4 cepas de um animal, PT28 com 3 cepas de um animal e PT 32 com 4 cepas de um único animal. As cepas provenientes de cães (identificadas em amarelo na figura 4) ficaram dispersas no

dendrograma, mas foram caracterizadas como pulsotipos independentes, sendo os pulsotipos PT4, PT26 e PT29, cada um com apenas uma cepa.

Dentre as 29 cepas isoladas de coelhos (marcadas em azul na figura 4), 25 foram agrupadas nos pulsotipos PT1 a PT3 (86,2%), sendo que apenas uma cepa de origem suína foi agrupada no pulsotipo 3. As quatro cepas de coelhos restantes foram separadas no pulsotipo PT 21, PT24 e PT25.

O único caso observado em que houve a mistura de cepas de diferentes espécies no mesmo pulsotipo foi observado no PT3, com apenas uma cepa de origem suína misturada a 12 cepas de coelho. Em todos os outros casos as cepas foram discriminadas de acordo com a espécie animal de origem. As cepas isoladas do mesmo animal forma agrupadas com alta frequência no mesmo pulsotipo em todas as espécies estudadas. O índice discriminatório do PFGE considerando as cepas com 100% de similaridade foi igual a 0,99.

Figura 4: Análise de cepas de *Bordetella bronchiseptica* isoladas de diferentes espécies, de diversas regiões do Brasil, através de PFGE com enzima de restrição *Xba*I

6 DISCUSSÃO

Bordetella bronchiseptica é um patógeno que infecta o trato respiratório de diversas espécies animais (suínos, cães, gatos, coelhos, preás e cavalos). Normalmente é considerado um patógeno veterinário, no entanto, as descrições de infecção em humanos têm aumentado, principalmente em pessoas imunossuprimidas. O agente é muito próximo geneticamente das espécies *B. pertussis* e *B. parapertussis*, mas é o único do gênero com esta ampla gama de hospedeiros (KHAYER, et al., 2014). Nas diversas espécies animais afetadas podem ser observadas diferentes apresentações clínicas da infecção pelo agente, variando de rinite a quadros de broncopneumonia (WINSTANLEY et al., 2001).

Nos últimos anos a resistência a antimicrobianos tem sido descrita como um desafio global pela Organização Mundial de Saúde (OMS). De forma geral é aceito que o uso de antimicrobianos em medicina humana seja um dos principais causadores do aumento e da disseminação dos genes de resistência a antimicrobianos, mas atualmente já se sabe que o uso de antimicrobianos em saúde animal também tem uma grande contribuição para este quadro (BARTON, 2014). O uso de antimicrobianos é muito intenso na indústria de produção de animais para consumo humano, como em criações intensivas de aves e suínos, no entanto, o uso de antimicrobiano em animais de companhia também vem crescendo de modo significativo (BARTON, 2014; LEITE-MARTINS et al., 2014).

Os progressos alcançados na medicina veterinária e o crescimento da população de animais de companhia nas grandes cidades, com acesso a tratamentos especializados tem levado ao aumento nos tratamentos com antimicrobianos. Além disso, os animais de companhia (principalmente cães e gatos)

têm vivido mais e mais próximos de seus donos, favorecendo a troca mútua de microbiota, tanto de forma direta, através do contato com a pele, saliva ou fezes como através do ambiente doméstico (LEITE-MARTINS et al., 2014).

A criação de coelhos no Brasil é principalmente voltada para a produção de carne, pele, sangue e carcaça, no entanto, a importância desta espécie como animal de companhia tem aumentado, tornando sua participação relevante na transmissão de zoonoses ou como reservatórios de bactérias resistentes a antimicrobianos (FERREIRA et al., 2012).

Os objetivos gerais deste estudo foram avaliar o perfil de resistência de cepas de *B. bronchiseptica* isoladas de animais de produção e animais de companhia e comparar estas cepas através da eletroforese em campo pulsado.

As 145 cepas de *B. bronchiseptica* foram avaliadas através da microdiluição em caldo com um painel de 18 antimicrobianos liofilizados e o resultado obtido permitiu a identificação de 43 perfis de resistência. O número de perfis identificados variou dentre as diferentes espécies animais avaliadas, e foi possível observar um maior número de perfis diferentes na amostra provenientes de gatos e cães, em relação aos isolados de suínos e coelhos.

Considerando-se o fato de 100% das cepas terem apresentado resistência a mais de três classes de antimicrobianos, incluindo dois beta-lactâmicos (ampicilina e penicilina), um aminoglicosídeo (espectinomicina), uma lincosamida (clindamicina), um macrolídeo (tilosina) e um diterpeno (tiamulina), pode-se concluir que todas as cepas de *B. bronchiseptica* do presente estudo foram multirresistentes (MAGIORAKOS et al., 2012). Curiosamente, Dayao et al. 2014, avaliando 18 cepas de *B. bronchiseptica* de origem suína isoladas na Austrália descrevem apenas 27,7% (5/18) das cepas multirresistentes.

A Tabela 5 resume os trabalhos identificados na literatura consultada em comparação aos dados obtidos no presente estudo considerando o total de cepas e as cepas divididas de acordo com as diferentes espécies animais. Em todos os estudos chama à atenção as altas frequências de resistência aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos nesta espécie bacteriana.

A resistência de *Bordetella bronchiseptica* aos beta-lactâmicos foi descrita inicialmente contra penicilina e oxacilina, estudos recentes tem relacionado à resistência a esta classe a genes plasmidiais como *bla*_{oxa-2}, *bla*_{bor-1}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{ampC} (KADLEC et al, 2007;.. CHANDER et al, 2011). A redução na permeabilidade de membrana nas cepas de *B. bronchiseptica* tem sido fortemente relacionada à resistência ao ceftiofur. Outras espécies Gram-negativas frequentes em suínos como *Pasteurella multocida*, *Salmonella spp* e *E. coli* também tem sido descritas como carreadoras destes genes de resistência (KADLEC et al, 2007; CHANDER et al, 2011).

Tabela 5- Comparação entre os dados obtidos na determinação da CIM no presente estudo e na literatura consultada.

Identificação	Presente estudo				Dayao et al, 2014	Kadlec et al, 2004	Zhao et al, 2011	Stepniowska et al, 2014	Speakman et al, 1997	Rougier et al, 2006	Rheinwald et al, 2014
	N= 145	N=81	N=35	N=29							
Espécie animal	Todas as espécies	Suínos	Gatos/cães	Coelhos	Suínos	Suínos	Suínos	Suínos	Gatos	Coelhos	Cães
País	Brasil				Austrália	Alemanha	China	Polónia	Inglaterra	França	Alemanha
Ampicilina	100	100	100	100	100	96,6	90,2	57	95,8	--	--
Ceftiofur	96,6	98,8	88,6	100	100	99,1	--	97,9	--	--	--
Penicilina	100	100	100	100	100	--	--	100	--	--	--
Oxitetraciclina	29,6	37,0	22,9	17,2	--	--	--	3,1	--	11,1	--
Clortetraciclina	11,0	16,0	2,9	6,9	--	--	--	--	--	--	--
Tetraciclina	--	--	--	--	39	2,0	64,4	2,1	4,08	--	100
Danofloxacina	97,9	100	91,4	100	--	--	--	--	--	16,2	--
Enrofloxacina	2,1	3,7	0	0	--	0,8	32,5	2,1	19,7	13,1	8,7
Gentamicina	29	35,8	31,4	6,9	--	0,0	6,7	22,4	--	3,0	9,1
Neomicina	36,6	37,0	54,3	13,8	--	1,4	26,4	--	--	--	--
Espectinomomicina	100	100	100	100	--	--	--	100	--	--	--
Florfenicol	35,2	44,4	31,4	13,8	6	2,8	--	9,6	--	--	--
Sulfadimetoxina	89	100	100	44,8	--	--	--	--	--	--	--
Cotrimoxazol	71,7	86,4	74,3	27,6	0	28	--	--	22,4	17,2	82,6
Clindamicina	100	100	100	100	--	--	--	100	--	--	--
Tiamulina	100	100	100	100	--	--	--	--	--	--	--
Tilmicosina	98,6	100	100	93,1	22	26,3	--	--	--	--	--
Tilosina	100	100	100	100	--	--	--	--	--	--	--
Tulatromicina	36,6	32,1	60,0	20,7	0	--	--	--	--	--	--

No presente estudo as cepas apresentaram altas taxas de resistência a tilmicosina em contraste aos estudos de Kadlec et al. 2004 e Dayao et al. 2014, Kadlec et al. 2006 relatam em estudo realizado *in vivo* uma alta eficácia deste antimicrobiano contra *P. multocida* e *H. parasuis*, mas não contra *Bordetella bronchiseptica*. Estes dados corroboram os resultados do presente estudo de que a tilmicosina não deve ser recomendada para o tratamento de pneumonia ou rinite por *Bordetella bronchiseptica*.

No Brasil, os antimicrobianos com menor frequência de resistência a *B. bronchiseptica* nas diferentes espécies animais foram enrofloxacina (2,1%) e clortetraciclina (11%), a resistência a estes princípios ativos em outros países variou bastante, no caso da enrofloxacina variou de 0,8 a 32,56% e no caso das tetraciclinas variou de 2 a 100%.

A resistência a tulatromicina foi mais elevada em cepas isoladas de gatos e cães que em isolados de suínos. Este achado é inesperado, já que este macrolídeo de uso recente tem o uso indicado apenas nas doenças respiratórias das espécies suína e bovina.

As cepas isoladas de coelhos apresentaram menores taxas de resistência que as isoladas de suínos e animais de companhia. Este fato deve estar relacionado ao menor uso de antimicrobianos nos criatórios de coelhos levando a menor pressão de seleção nesta espécie animal.

A avaliação das cepas de *B. bronchiseptica* pela eletroforese em campo pulsado foi bem sucedida e é descrita na literatura consultada por apenas três grupos de autores (BINNS et al., 1998; SHIN et al., 2007 e WINSTANLEY et al., 2001). No estudo realizado por Binns et al. 1998, que mais se assemelha ao presente estudo, foram comparadas 159 cepas de gatos, suínos e cães. Os autores

relatam que não houve uma boa discriminação entre as cepas de diferentes espécies animais. No presente estudo foi possível diferenciar as cepas de suínos, gatos, cães e coelhos em diferentes pulsotipos considerando cada pulsotipo com mais de quatro bandas de diferença. As cepas originadas de coelhos apresentaram uma separação mais clara em relação às de outras espécies animais. Não foi possível correlacionar os grupos diretamente com os padrões de resistência a antimicrobianos. A capacidade de discriminar os isolados foi maior utilizando a PFGE (ID igual a 0,99) que a determinação dos perfis de resistência a antimicrobianos (ID igual a 0,91). As cepas isoladas do mesmo animal foram em sua grande maioria agrupadas no mesmo pulsotipo, este achado é similar ao descrito por Binns et al. 1998.

A caracterização do agente, principalmente no que se refere à resistência a antimicrobianos, será de grande utilidade para os veterinários no controle das infecções pelo mesmo em suínos, animais de companhia e coelhos, visto que os dados sobre este agente etiológico no Brasil são escassos. Além disso, os resultados podem ser de grande auxílio para a classe médica do país que pode estar ignorando a possibilidade de contaminação dos seres humanos que tem contato próximo com animais de produção ou que estão em grande proximidade de seus animais de companhia.

7 CONCLUSÕES

- As cepas de *Bordetella bronchiseptica* avaliadas apresentaram altos níveis de resistência a maioria dos antimicrobianos testados.
- Os antimicrobianos com menor taxa de resistência a *B. bronchiseptica* no presente estudo foram enrofloxacin e clotetraciclina.
- As cepas de isoladas de coelhos apresentaram menores taxas de resistência e maior discriminação na PFGE.
- A PFGE permitiu a discriminação das cepas de acordo com a espécie de origem em diferentes pulsotipos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARICO, B.; RAPPUOLI, R. *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.66, p. 2847- 2853, 1987.

BARTON, M. D. Impact of antibiotic use in the swine industry. **Current Opinion in Microbiology**, v.19, p. 9–15, 2014.

BELKUM, A. VAN; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13 Suppl 3, p. 1–46, out 2007.

BEMIS, D .A.; BURNS Jr., E. H. *Bordetella*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. (Eds.). **Pathogenesis of bacterial infections in Animals**. Ames: Iowa State University Press, 1993. Chap.17., p.201-215.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. *Bordetella*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. O ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 27, p.140-142.

BINNS, S. H.; SPEAKMAN, A. J.; DAWSON, S.; BENNETT, M.; GASKELL, R. M.; HART, C. A. The use of pulsed-Field gel electrophoresis to examine the epidemiology of *Bordetella bronchiseptica* isolated from cats and other species **Epidemiology and Infection**, 120, p. 201-208, 1998.

BINNS S. H., DAWSON S., SPEAKMAN A. J., CUEVAS L. E., GASKELL C. J., HART C. A., MORGAN K. L., GASKELL R. M.: Prevalence and risk factors for feline *Bordetella bronchiseptica* infection. **Veterinary Record**, v.144 n. 21 :575-580, 1999.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. ; JANSEN, C. L.; WERTHEIN VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method purification of nucleic acids. **Journal Clinical Microbiology**, v. 28, p. 453-459, 1990.

BOROWSKI, S. M. **Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 190f. Tese (Doutorado) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

CARVALHO, A. P. de; PEREIRA, E. M. C. Vacina acelular contra pertússis para adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n.3, p. S15-24, 2006.

CHANDER, Y.; OLIVEIRA, S.; GOYAL, S. M. Characterisation of ceftiofur resistance in swine bacterial pathogens. **The Veterinary Journal**, 187, 139–141, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement. CLSI document VET01-S2 (2013).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria Isolated from Animals; Approved Standard- Fourt Edition. CLSI document VET01-A4 (2013).

COOKSON, B. T.; VANDAMME, P.; CARLSON, L. C.; LARSON, A. M.; SHEFFIELD, J. V. L.; KERSTERS, K.; SPACH, D. H. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, *B.hinzii*. **Journal Clinical Microbiology**, v.32, n. 10, p. 2569-2571, 1994.

COOTE, J. G. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.8, n. 2, p.137-161, 1992.

CULLINANE, M.R.; ALLEY, R.B.; MARSHALL; B.W. MANKTELOW. *Bordetella parapertussis* from lambs. **New Zealand Veterinary Journal**, 35, p. 175, 1987.

DAMME, P. VAN; HOMMEZ, J.; VANCANNEYT, M.; MONSIEURS, M.; HOSTE, B.; COOKSON, B.; WIRSING, C. H., KONIG von, KERSTERS, K.; BLACKALL, P. J. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. **International Journal Systematic Bacteriology**, 45, p. 37-45, 1995.

DAWSON, S.; JONES, D.; McCracken, C., M.; GASKELL, R. M.; HART C. A.; GASKELL, C. J. *Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs. **Veterinary Record**, v.146, p.46-47, 2000.

DAYAO, A. E.; GIBSON, J. S.; BLACKALL, P. J.; TURNI, C. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. **Veterinary Microbiology**, 171, 232–235, 2014.

DE JONG, M.F. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In: STRAW et al. (Eds.). **Disease of Swine**. 8th.ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 355-384, 1999

DOUGHTY, S. W., RUFFOLO, C. G., ADLER, B. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 79–90, 2000.

DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. S.; CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 92, p. 107-138, 1966.

FERNANDEZ, R. C.; WEISS, A. A. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 4727-38, 1994.

FERREIRA, T. S. P.; FELIZARDO, M. R.; SENA DE GOBBI, D. D.; *et al.* Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Rabbits in Brazil. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

FOLEY, J. E.; RAND, C.; BANNASCH, M. J.; NORRIS, C. R.; MILAN, J. Molecular epidemiology of feline bordetellosis in two animal shelters in California, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, p. 141-156, 2002.

FUKUI-MIYAZAKI, A., KAMITANI, S., MIYAKE, M., & HORIGUCHI, Y. Association of *Bordetella* dermonecrotic toxin with the extracellular matrix. **BMC Microbiology**, v.10, 247, 2010.

GASKELL, R. M., DAWSON, S., JACOBS, A. A. C. & SEAWELL, B. **The Veterinary Record**, January 8, 2000. Role of *Bordetella* in feline respiratory disease. In: **Consultations in Feline Internal Medicine 3**. Ed J. R. August. Philadelphia, W. B. Saunders, p 34-36, 1997.

GOODNOW, R.A. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. **Microbiological Reviews**, 44, p. 722- 738, 1980.

GORDON, V. M.; YOUNG, W. J.; LECHLER, S. M.; GRAY, M. C.; LEPPA S. H.; HEWLETT, E. L. Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. **The journal of Biological Chemistry**, 264, p. 14792-14796, 1989.

GUEIRARD, P., GUIISO, N. Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: role of adenylate cyclase-hemolysin. **Infection and Immunity**. v.61, n.10, p. 4072-4078, 1993.

HORIGUCHI, Y.; NAKAI, T.; KUME, K. Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. **Infection and Immunity**, v.59, n.3, p.1112-1116, Mar. 1991.

HEISS L.N., MOSER S.A., Unanue E.R. and Goldman W.E., Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. **Infection and Immunity**, 61, p. 3123-3128, 1993.

HOZBOR, D.; FOUQUE, F; GUIISO, N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. **Research in Microbiology**, v. 150, n. 5, p. 333–341, jun 1999.

HUNTER, P. R.; GASTON. M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, p.2465-2466, 1988.

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, 48, p. 549-554, 1987.

HYNES R.O. Integrins: versatility, modulation, and signalling. **Cell**, 69, p. 11-25, 1992.

KHAYER, B.; MAGYAR, T.; WEHMANN, E. Flagellin typing of *Bordetella bronchiseptica* strains originating from different host species. **Veterinary Microbiology**, 173, p. 270–278, 2014.

KADLEC, K.; KEHRENBURG, C.; WALLMANN, J.; SCHWARZ, S. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from porcine respiratory tract infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48, p. 4903– 4906, 2004.

KADLEC, K.; WIEGAND, I.; KEHRENBURG, C.; Schwarz, S. Studies on the mechanisms of b-lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59,p. 396–402, 2007.

KADLEC, K. THESIS Submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD) at the University of Veterinary Medicine Hannover 2006. Detection and organisation of antimicrobial resistance genes in *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs.

KEIL, D. J.; FENWICK, B. Evaluation of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates using randomly amplified polymorphic DNA fingerprint and ribotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p. 41-51, 1999.

KHELEF, N.; SAKAMOTO, H.; GUIZO, N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. **Microb. Pathogen.**, v.12, p.227-235, 1992.

LEININGER, E.; ROBERTS, M.; BALLANTINE, S. P.; CHARLES, I. G.; FAIRWEATHER, N.; NOVOTNY, P.; BRENNAN, M. J. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.88, p.345-349, 1991.

LEITE- MARTINS, L. R.; MAHÚ, M. I. M.; COSTA, A. L.; MENDES, A.; LOPES, E.; MENDONÇA, D. M. V.; NIZA-RIBEIRO, J. J. R.; MATOS de A. J. F.; COSTA, da P. M. **Preventive Veterinary Medicine**, v.117, p. 28-39, 2014.

LUKER K.E., TYLER A.N., MARSHALL G.R. and GOLDMAN W.E., Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis.

Molecular Microbiology, 16, p. 733-743, 1995.

LOPEZ, M. Genus *Bordetella*. In: **Bergey's Manual of Systematic**, p. 388, 1984.

MCARDLE H.C., DAWSON S., COUTTS A.J., BENNET M., HART C.A., RYVAR R., GASKELL R.M.: Seroprevalence and isolation rate of *Bordetella bronchiseptica* in cats in the UK. **Veterinary Record**, v.135, p. 506-507, 1994

MAGALHÃES, V. D. ; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, AL. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n.2, p.155-161, 2005.

MAGIORAKOS, A.-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical microbiology and infection: the official publication of the **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MAKOFF, A. J.; OXER, M. D.; BALLANTINE, S. P.; FAIRWEATHER, N. F.; CHARLES, I. G. Protective surface antigen p69 of *Bordetella pertussis*: its characterization and very high level expression in *Escherichia coli*. **Biotechnology**, v.8, p.1030-1033, 1990.

MATTOO, S.; FOREMAN-WYKERT, A. K.; COTTER, P. A.; MILLER, Jeff F. Mechanisms of *bordetella* pathogenesis. **Frontiers in Bioscience**, 6, p.168-186, 2001.

MATTOO, S.; CHERRY, J. D. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 326–382, 2005.

MOOI, F. R.; CLAASSEN, I.; BAKKER, D.; KUIPERS, H.; DE GRAAF, F.K. **Nucleic Acids Res.**, 14, 2443-2457, 1986.

MONTARAZ, J. A.; NOVOTNY, P.; IVANYI, J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. **Infection and Immunity**, v.47, p. 744-751, 1985.

NELSON, R. W.; COUTO, C.G. Distúrbios da Traqueia e dos brônquios. In: **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 21, p. 277-279, 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C.G. Zoonoses. In: **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 105, p.1279, 2006.

NOVOTNY, A.; KOBISCH, M.; COWNLEY, K.; CHUBB, A. P.; MONTARAZ, J. A.. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* Vaccines in Specific-Pathogen-Free Piglets with Bacterial Cell Surface Antigens in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Infection and Immunity**, p. 190-198, 1985.

OKERMAN, L. **Diseases of Domestic Rabbits**. Oxford, England, Blackwell Scientific Publications, Chapter 15, p. 55-56, 1988.

PARKHILL, J.; SEBAIHIA, M.; PRESTON, A.; MURPHY, L. D.; THOMSON, N.; HARRIS, D. E., HOLDEN, M. T. G. ; CHURCHER, C. M.; BENTLEY, S. D.; MUNGALL, K. L.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; TEMPLE, L.; JAMES, K.; HARRIS, B.; QUAIL, M. A.; ACHTMAN, M.; ATKIN, R.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BASON, N.;

CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DOGGETT, J.; FELTWELL, T.; GOBLE, A.; HAMLIN, N.; HAUSER, H.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; LEATHER, S.; MOULE, S.; NORBERCZAK, H.; O'NEIL, S.; ORMOND, D.; PRICE, C.; RABBINOWITSCH, E.; RUTTER, S.; SANDERS, M.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; UNWIN, L.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. ; MASKELL, D. J. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Nature genetics**, v. 35, n. 1, 2003.

PORTER, J. F.; R. PARTON; A. C. WARDLAW. Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without nutrients. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57, 1202–1206, 1991.

PIJOAN, C.; DEE, S. Immunology and protection of swine populations. In: ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE. 2004, Minnesota. Proceedings. Minnesota: University of Minnesota, **Veterinary Outreach Programs**, v.31, p. 77-78, 2004.

PRESTON, A.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J. O.; KUBLER-KIELB, J.; MENACHEM, G.; LI, J.; VINOGRADOV, E. Complete Structures of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* Lipopolysaccharides. **The journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 18135–18144, 2006.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., et al., **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, p. 648, 1994.

REGISTER, K. B.; BOISVERT, A.; ACKERMANN, M. R. Use of ribotyping to distinguish *Bordetella bronchiseptica* isolates. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 678-683, 1997.

REGISTER, K. B.; SUKUMAR, N.; PALAVECINO, E. L.; RUBIN, B. K.; DEORA, R. *Bordetella bronchiseptica* in a Paediatric Cystic Fibrosis Patient: Possible Transmission from a Household Cat. **Zoonoses and Public Health**, 59, p. 246–250, 2012.

SACCO, R.E.; REGISTER, K.B.; NORDHOLM, G.E. Restriction endonuclease analysis discriminates *Bordetella bronchiseptica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4387-4393, 2000.

SHIN, E.K.; SEO, Y.S; HAN, J.H.; HAHN, T.W. Diversity of swine *Bordetella bronchiseptica* isolates evaluated by RAPD analysis and PFGE. **Journal Vet. Sci.**, 8, p. 65–73, 2007.

SMITH, I. M.; BASKERVILLE, A. J. A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs. **Veterinary Science**, v. 27, p. 187-192, 1979.

SPEAKMAN A. J., BINNS S. H. ,DAWSON S., CRIPPS P., CUEVAS L. E.; HART, C. A.; GASKELL, R. M. , *Bordetella bronchiseptica* infection in the cat: a review. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, p. 252–256, 1999.

STEVEN A.C., BISHER M.E., TRUS B.L., THOMAS D., ZHANG J.M. and COWELL J.L., Helical structure of *Bordetella pertussis* fimbriae. **Journal of Bacteriology**, 167, p. 968-974, 1986.

SUKUMAR, N.; NICHOLSON, T. L.; CONOVER, M. S.; GANGULY, T.; DEORA, R. Comparative Analyses of a Cystic Fibrosis Isolate of *Bordetella bronchiseptica* Reveal Differences in Important Pathogenic Phenotypes. **Infection and Immunity**, v 82, n 4., p. 1627–1637, 2014.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doença de Suínos**, Goiânia, Cãnone Editorial, p. 62-64, 187-196, 2007.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, R. C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, 37, p. 67-75, 1994.

TENOVER, F.C.; ARBEIT; R.D.; GOERING; R.V.; MICKELSEN; P.A.; MURRAY, B.E., PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B.; et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, 33, p. 2233-2239, 1995.

TUOMANEN, E.; WEISS, A. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. **J. Infect. Dis**, 152, p. 118-125, 1985.

WELSH, R. *Bordetella bronchiseptica* infections in cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.32, p. 153–158, 1996.

WEYANT, R. S.; HOLLIS, D. G.; WEAVER, R. E.; AMIN, M. F. M.; STEIGER-WALT, A. G.; OCONNOR, S. P.; WHITNEY, A. M.; DANESHVAR, M. I.; MOSS, C. W.; BRENNER, D. J. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p. 1-7, 1995.

WINSTANLEY, C.; SHINA, A.; DAWSON, S.; GASKELL, R. M.; HART, C. A. Variation in *Bordetella bronchiseptica* *flaA* does not correlate with typing by macro-restriction analysis by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal Med. Microbiology**, v. 50, p. 255-260, 2001.

ZEE, Van der; MOOI , F.; EMBDEN, J. Van; MUSSER, J. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp. - phylogenetic analysis using multilocus enzyme

electrophoresis and typing with three insertion sequences. **Journal of Bacteriology**, 179, p. 6609- 6617, 1997.