MARIA ROBERTA FELIZARDO

**Isolamento e caracterização de amostras de *Bordetella bronchiseptica*
através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)**

São Paulo
2010

MARIA ROBERTA FELIZARDO

**Isolamento e caracterização de amostras de *Bordetella bronchiseptica*
através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)**

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

Departamento:

Medicina Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada
às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2010

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.2394
FMVZ

Felizardo, Maria Roberta

Isolamento e caracterização de amostras de *Bordetella bronchiseptica* através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) / Maria Roberta Felizardo. -- 2010.
39 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Cães. 2. Gatos. 3. *Bordetella bronchiseptica*. 4. PCR. 5. PFGE. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1	São Paulo, 2011	São Paulo, 2010
Abstract		São Paulo, 2011	São Paulo, 2010

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: Isolamento e caracterização de amostras de *Bordetella bronchiseptica* através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ 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.

Á toda minha família.

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

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana sempre atencioso na graduação. Obrigada por abrir as portas da Pós-Graduação e por mostrar outros caminhos da Veterinária.

A todos os amigos e colegas que fiz no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia: Ana Paula Santos da Silva, Renata Paixão, Nayla Fernanda, Vasco Túlio de Moura Gomes, Cleise Ribeiro Gomes, Cristina Roman Amigo, Débora Gobbi, Alexandre Sanches, Bruna Barbosa, Sergio de Mello Novita Teixeira, Marina Moreno, Daniele Raimundo, Thaís Ferreira, Jucélia, Maria José, Tania Alen Coutinho, Melanie Gutjar, Maria, Pedro Filsner, João Marujo Neto, Adriano Savoia Morales, Juliana Fragoso de Araujo.

Aos funcionários Sandra Sanches, Orlando Bispo de Souza e Danival Lopes Moreira.

Á CAPES, pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários e proprietários responsáveis pelos locais de coleta, pela paciência durante as coletas e carinho em nos receber.

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

Aos meus amigos Poliana Claus e Fábio Meirelles, pela coleta de amostras.

A todos meus amigos em especial Monica Burza, Claudia de Souza Pregnotato e Fábio Rogério da costa.

*"A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais
são tratados." (Mahatma Gandhi)*

RESUMO

FELIZARDO, M. R. **Isolamento e caracterização de amostras de *Bordetella bronchiseptica* através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)**. [Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)]. 2011. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Bordetella bronchiseptica é um dos agentes etiológicos da tosse dos canis, infecções do trato respiratório superior em gatos, rinite atrófica, broncopneumonia em suínos, sendo freqüentemente isolada em coelhos e animais de laboratório. O impacto deste agente em saúde humana ainda é subestimado, o risco da infecção de pessoas imunodeprimidas que tem contato com animais domésticos existe e é relatado na literatura. No Brasil não há estudos caracterizando o agente isolado a partir de espécies de animais de companhia. O conhecimento dos aspectos epidemiológicos da infecção por *Bordetella bronchiseptica* é de fundamental importância para a adoção de medidas efetivas de controle e prevenção da infecção em seres humanos e animais domésticos, neste sentido, estudos de epidemiologia molecular são de grande relevância. O presente estudo tem como objetivos caracterizar amostras de *Bordetella bronchiseptica* isoladas de cães e gatos através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e do perfil de resistência a antimicrobianos. Foram isoladas 45 amostras provenientes de três cães e onze gatos de diferentes gatis, canis e clínicas veterinárias e as mesmas foram discriminadas em sete perfis através dos padrões de resistência e em quatorze perfis genotípicos através da PFGE.

Palavras-chave: Cães. Gatos. *Bordetella bronchiseptica*. PCR. PFGE.

ABSTRACT

FELIZARDO, M. R. **Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).** [Isolamento e caracterização de *Bordetella bronchiseptica* através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)]. 2011. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Bordetella bronchiseptica is one of the etiologic agents of kennel cough, cat superior respiratory tract infections, swine bronchopneumonia, being frequently isolated from rabbits and laboratory animals. The impact of this agent in human health is still underestimated; the risk of immunosuppressed persons who have contact with domestic animals exists and is reported in literature. In Brasil, there are no studies characterizing the agent isolated from pet species. The knowledge of epidemiological aspects of *Bordetella bronchiseptica* is of fundamental importance to adopt effective control measures and prevention of human and domestic animals, in that sense, studies of molecular epidemiology are very relevant. This study aims to characterize strains of *Bordetella bronchiseptica* from dogs and cats through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial resistance profile. Forty five strains from three dogs and eleven cats from different catteries, shelters, and veterinary clinics were separated in seven profiles based in resistance patterns and fourteen genotypic profiles through PFGE.

Key words: Dogs. Cats. *Bordetella bronchiseptica*. PCR. PFGE.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	ETIOLOGIA.....	13
2.2	PRODUTOS CELULARES.....	16
2.3	FORMA DA INFECÇÃO EM CÃES E GATOS.....	17
2.3.1	CÃES.....	17
2.3.2	GATOS.....	18
2.4	CARACTERÍSTICA GENOTÍPICA DO AGENTE.....	19
3	OBJETIVOS.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1	MATERIAL.....	22
4.2	MÉTODOS.....	22
4.2.1	ISOLAMENTO DO AGENTE.....	22
4.2.2	PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA.....	22
4.2.3	EXTRAÇÃO DO DNA.....	25
4.2.4	AMPLIFICAÇÃO DO DNA PCR).....	26
4.2.5	DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	26
4.2.6	ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE).....	27
4.2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6	CONCLUSÕES.....	35
	REFERENCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

Bordetella bronchiseptica vem sendo relacionada como agente de doenças em animais de laboratório e tem sido implicada em severas síndromes em animais domésticos. O agente é descrito em diversas espécies animais incluindo cães, gatos, porquinhos-da-índia, ratos, camundongos, coelhos, suínos, cavalos, perus, macacos, humanos e de alguns animais selvagens.

Em suínos esse agente causa à rinite atrófica não progressiva e quadros de broncopneumonia. Em cães é descrito como causador da “Tosse dos canis”. Em gatos a infecção começa a ser reconhecida e o mesmo parece atuar como agente primário em infecções respiratórias, abrindo portas para outras infecções, como, Herpesvirus felino, Calicivirus e *Chlamydomphila felis*. Nas demais espécies *B. bronchiseptica* é frequentemente relatada causando broncopneumonia.

Com o crescimento diário da relação homem-animal, principalmente no que se refere a cães e gatos, é importante estabelecer os riscos do agente como zoonose além da transmissão do agente entre os próprios animais. O presente estudo tem como objetivo o isolamento de *Bordetella bronchiseptica* no trato respiratório de cães e gatos e a caracterização dos isolados quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos e através da eletroforese de campo pulsado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Bordetella* é composto por cocobacilos pleomórficos Gram-negativos, com cerca de 0,5 µm X 0,2 µm de tamanho, pertencentes à família *Alcaligenaceae*.

O agente é catalase e oxidase-positiva, não fermenta carboidratos, 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). As colônias possuem superfície coberta de fimbrias. Mas a estrutura da célula é a mesma das demais bactérias gram-negativas (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 primária 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).

As chamadas espécies clássicas do gênero *Bordetella*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. avium* todas causam infecções do trato respiratório em diferentes hospedeiros. Enquanto a *B. pertussis* e a uma linhagem da *B. parapertussis* causam infecção apenas em humanos, uma linhagem de *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* causam infecções em ovinos, e em uma variedade de espécies de mamíferos, respectivamente. Estas três espécies com diferentes preferências por hospedeiros são denominadas complexo *B. bronchiseptica*, pois as linhagens conhecidas hoje evoluíram de uma ancestral comum da espécie *B. bronchiseptica* (GROSS; KEIDEL; SCHMITT, 2010).

Ocasionalmente, são descritos casos de infecção em humanos pela *B. bronchiseptica*, sendo mais freqüentes casos em crianças, pacientes com doenças crônicas e pessoas em contato muito próximo com animais infectados. Em 1998 foram relatados 39 casos de infecção humana pelo agente, sendo que a maioria dos pacientes apresentava algum tipo de imunossupressão. A associação da infecção humana a ao contato com felinos foi relatada somente uma vez, em uma pessoa infectada também por HIV.

B. avium tem sido relatada em casos de coriza em perus e infecção respiratória em aves domésticas e silvestres. São raros os relatos desta espécie em humanos, sendo descrito um caso em que houve pneumonia (GROSS; KEIDEL; SCHMITT, 2010). Nos últimos 15 anos novas espécies foram descritas, são elas *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. ansorpii* e *B. petrii*. Os hospedeiros conhecidos e o tipo de infecção causada por cada uma destas espécies é descrita no quadro 1.

Espécies	Hospedeiros	Doença
<i>Bordetella pertussis</i>	Humanos Chimpanzés	Coqueluche Caso raro de doença, como tosse convulsa em animais de cativeiro
<i>B. parapertussis</i>	Humanos Ovelhas	Forma suave coqueluche Isolados de carneiros saudáveis e com pneumonia
<i>B. bronchiseptica</i>	Suínos	Rinite Atrófica não progressiva e broncopneumonia
	Cães	Traqueobronquite infecciosa canina (Tosse dos canis)
	Coelhos	Roncos, com infecção do trato respiratório superior, broncopneumonia ou septicemia
	Porquinhos-da-índia	Sintomas iguais a doença em coelhos
	Cavalos e gatos	Infecção respiratória
	Humanos	Isolados ocasionalmente de feridas e outros fluídos corporais
<i>B. avium</i>	Perus e outras aves	Coriza, rinotraqueíte e sinusite em perus jovens. Morbidade alta e mortalidade baixa
<i>B. hinzii</i>	Aves (homen)	Infecção respiratória, septicemia em humanos
<i>B. holmezii</i>	Humanos	Septicemia e quadro parecido com a tosse comprida (coqueluche)
<i>B. trematum</i>	Humanos	Otites
<i>B. ansorpii</i>	Humanos	Cisto epidérmico, septicemia
<i>B. petrii</i>	Ambiente e hospedeiros diversos	Doença óssea degenerativa em humanos.

Quadro 1: Espécies animais mais afetadas pelo gênero *Bordetella spp.* e quadros clínicos mais freqüentes.

Fonte: Adaptado de Quinn, et al., 1994; Gross; Keidel; Schmitt, 2010.

2.2 PRODUTOS CELULARES

Cepas de *B. bronchiseptica* produzem toxinas e fímbrias. Dentre as toxinas destacam a toxina dermonecrótica e toxina adenilato-ciclase bifuncional tipo I. A toxina pertussis (PTX) é produzida apenas pela espécie *B. pertussis*, sendo que o gene silencioso está presente em outras espécies deste complexo (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003). Aderência e colonização do epitélio do hospedeiro por *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* e *B. parapertussis* ocorre principalmente pelas ações proteínas de superfície, incluindo fímbrias e hemaglutinina filamentosa (FLAK.; GOLDMAN, 1999).

A toxina dermonecrótica causa um aumento na produção de óxido nítrico no hospedeiro através da ativação do óxido nítrico sintase pela interleucina-1. O óxido nítrico provoca depleção de ferro intracelular e inativação de ferro que atua em enzimas importantes para respiração mitocondrial e síntese de DNA e como resultado, junções epiteliais são comprometidas, levando a extrusão das células ciliadas e desnudamento do epitélio (FLAK; GOLDMAN, 1999).

Depois da *Bordetella* aderir ao epitélio de células respiratórias, a interação dinâmica que se segue entre o hospedeiro e o patógeno é a inflamação e ativação da resposta imune. Neste complexo ambiente, as células bacterianas obtêm a nutrição através do ferro, necessário para o crescimento. As três espécies de *Bordetella* produzem o sideróforo, mas podem também utilizar xenosideróforos. Portanto, sideróforos produzidos por colonizadores comensais ou temporários da nasofaringe podem fornecer meios adicionais para recuperação de ferro para *Bordetella* no hospedeiro (BRICKMAN; ANDERSON; ARMSTRONG, 2007).

Outros fatores de virulência são descritos para a espécie *B. bronchiseptica* como pertactina (PRN), proteínas efetoras tipo III e alcaligina (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003).

2.3. FORMAS DA INFECÇÃO EM CÃES E GATOS

2.3.1 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, incluindo o adenovírus canino tipo 2 (AVC2), o vírus da parainfluenza (VPI) e a *Bordetella bronchiseptica*. Patógenos secundários também podem estar envolvidos na infecção. Geralmente em duas semanas há a resolução dos sinais clínicos (NELSON; COUTO, 2006). Além desses sintomas os cães podem apresentar comprometimento ciliar e imunossupressão respiratória local.

Os cães apresentam uma tosse acentuada, com início súbito, produtiva ou não, que é freqüentemente exacerbada pelo exercício ou pela pressão da coleira no pescoço do animal. A palpação da traquéia 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 freqüentemente expostos ao agente (NELSON; COUTO, 2006).

Animais que apresentam perda de peso, anorexia persistente ou sinais de envolvimento de outros órgãos, como diarreia, coriorretinite ou convulsões, podem ter alguma outra doença mais grave, como cinomose ou infecção micótica, 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 algumas das bactérias patogênicas, o aparente fracasso de responder 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 de 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).

2.3.2 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), sugere 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, 7 dos gatos tinham 8 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 que variaram de 3,5 (6/176), 5% (34/576) e 8% (59/740) nas populações de felinos estudadas (SPEAKMAN et al., 1999; MCARDLE et al., 1994, BINNS et al., 1999).

2.4 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 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 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 pulsotipo (MAGALHÃES et al., 2005). Trata-se de uma técnica com elevado poder discriminatório e que vem sendo considerado padrão ouro em epidemiologia molecular, 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). Binns et al (1998) identificaram 17 pulsotipos com numerosos subtipos em uma coleção de 164 isolados, sendo a maioria destes provenientes de gatos (SHIN et al., 2007; BINNS et al., 1998).

3 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos isolar *B. bronchiseptica* a partir de orofaringe de cães e gatos, identificar os isolados por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR), caracterizá-los através do perfil de resistência a antimicrobianos e através da eletroforese em gel de campo pulsado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram analisadas 208 amostras de suabes de orofaringe de cães e 123 suabes de orofaringe de gatos coletadas entre Agosto de 2008 e Abril de 2010. Os animais examinados eram provenientes de clinicas veterinárias particulares e de criatórios (canis e gatis).

4.2 METODOS

4.2.1 Isolamento do agente

As amostras foram coletadas com suabes estéreis acondicionados em meio de transporte de Stuart. Os suabes foram semeados em ágar Smith-Baskerville e em Agar McConkey por 48 horas a 37° C em aerobiose. As colônias suspeitas foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase para confirmação da espécie.

4.2.2 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados foram analisados por meio da determinação do halo de inibição pela prova de disco-difusão (Kirby-Bauer) conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008).

O inóculo bacteriano utilizado no teste de disco-difusão foi preparado a partir dos cultivos puros de *B. bronchiseptica* semeado em caldo infusão de

cérebro-coração (BHI) por 24 horas a 37 °C. 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. Esta suspensão bacteriana ajustada contém aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

Um suabe estéril e não-tóxico foi introduzido no interior do tubo contendo a suspensão bacteriana ajustada, pressionado contra a parede do tubo a fim de remover o excesso da suspensão embebida na extremidade do suabe e então, estriado por toda a superfície do ágar Mueller Hinton.

Após a semeadura do inóculo sobre a superfície do ágar, os discos impregnados com princípios antimicrobianos foram distribuídos individualmente. Os princípios utilizados, assim como suas concentrações constam no quadro 4.

Princípio antimicrobiano	Concentração (µg/mL)
Ampicilina	10
Amoxicilina	30
Ceftiofur	30
Cotrimoxazol	25
Doxiciclina	30
Enrofloxacina	5
Norfloxacina	10
Ciprofloxacina	5
Eritromicina	15
Florfenicol	30
Penicilina**	10
Sulfadimetoxina	300
Tetraciclina	30

** Concentração da penicilina expressa em unidades internacionais por mililitro.

Quadro 2 - Princípios antimicrobianos utilizados na disco-difusão e respectivas concentrações

As placas contendo inóculo e discos antimicrobianos foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas e então, examinadas quanto à formação de halos de inibição ao redor dos discos.

Como ainda não há critérios interpretativos específicos para área veterinária em relação *B. bronchiseptica*., foram utilizados valores de outros agentes bacterianos, sendo que para algumas drogas foram usados critérios específicos para uso humano na análise dos resultados obtidos neste estudo. Os diâmetros dos halos de inibição formados no estudo foram interpretados conforme quadro 5.

No teste de disco-difusão foram utilizados como controle de qualidade as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sendo que as mesmas foram semeadas, respectivamente, em ágar Mueller Hinton (Difco-BBL) e ágar Mueller Hinton suplementado com 5 % de sangue ovino desfibrinado.

Agentes antimicrobianos	Halo de inibição (mm)		
	S ^a	I ^b	R ^c
Ampicilina	≥ 26	19 - 25	≤ 18
Amoxicilina	≥ 18	14-17	≤ 13
Ceftiofur	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Cotrimoxazol ^d	≥ 16	11 - 15	≤ 10
Doxiciclina	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Enrofloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Norfloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Ciprofloxacina	≥ 21	16-20	≤ 15
Eritromicina	≥ 23	14-22	≤ 13
Florfenicol	≥ 22	19 - 21	≤ 18
Penicilina	≥ 28	20-27	≤ 19
Sulfadimetoxina	≥ 17	13 - 16	≤ 12
Tetraciclina	≥ 23	19 - 22	≤ 18

^a sensível, ^b intermediário, ^c resistente e ^d associação de sulfametoxazol e trimetoprima.

¹ CLSI – M31-A3 (2008)

² CLSI – M100-S15 (2005)

Quadro 3 - Critérios para interpretação dos halos de inibição do teste de disco-difusão

4.2.3 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.

4.2.4 Amplificação do DNA (PCR)

A PCR foi realizada 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.

4.2.5 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 ImageMaster ® (Amershan Biosciences) 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).

4.2.6 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).

4.2.7 Análise estatística dos fragmentos amplificados

Para análise estatística dos fragmentos obtidos através da PFGE foi utilizado o programa NTSYS ("Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System"). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada por este coeficiente foi possível determinar os grupos pelo método de UPGMA ("Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average"), que foi representado pela forma de dendrograma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 208 cães examinados, três foram positivos para o isolamento do agente pesquisado (1,4%). A frequência deste agente em cães é bastante variável na literatura consultada. Mochizuki et al., (2008) em estudo realizado no Japão com cães domiciliados observaram 8% dos animais positivos para detecção de *B. bronchiseptica* através da PCR (7/86). Chalker et al., (2003) avaliando lavado bronquial de 152 cães provenientes de canis, isolaram o agente em 39% (n=54) dos animais sem sintomas de infecção respiratória e em 52% (n= 98) dos cães com sinais de infecção.

Dentre os 123 gatos 11 foram positivos para o isolamento de *B. bronchiseptica* revelando uma frequência de 8,9%, dado similar aos relatado por BINNS et al, (1999) que observaram o isolamento desta espécie bacteriana em 11% dos gatos testados provenientes de diferentes populações, avaliando animais com e sem sinais clínicos de doença respiratória. No presente estudo os animais positivos foram oriundos de gatis e de animais domiciliados, não havendo diferença significativa entre as frequências de isolamento nestes dois grupos (Tabela 1).

Para realização da PFGE e avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foram selecionadas 45 cepas de *B. bronchiseptica* provenientes dos três cães e 11 gatos positivos para o isolamento do agente.

Através da técnica de disco difusão observou-se uma alta taxa de resistência a antimicrobianos beta lactâmicos (amoxicilina, ampicilina, penicilina e ceftiofur), como previamente descrito na literatura, assim como para sulfonamidas e para combinação sulfonamidas/trimetoprima. Os antimicrobianos com maiores níveis de sensibilidade foram as quinolonas (norfloxacina, enrofloxacina e ciprofloxacina), seguidas pelo florfenicol e pelas tetraciclinas (Gráfico 1).

Foley et al, (2002) relatam que em 22 cepas isoladas de cães não foi observada resistência a sulfa-trimetoprima o que contrasta bastante dos resultados obtidos no presente estudo. Estes mesmos autores descrevem a distribuição destas cepas em cinco perfis de resistência, sendo que uma cepa apresentou sensibilidade a ampicilina. No presente estudo sete cepas foram

sensíveis a amoxicilina e sete foram sensíveis a ceftiofur, indicando a presença de diferentes mecanismos de resistência a beta-lactâmicos nesta espécie bacteriana (KADLEC et al., 2007).

Através da PFGE as 45 cepas apresentaram bandas com tamanho variando de 30 a 450 Kb e foram divididas em 14 perfis denominados de A a N. Através da análise do dendrograma pode-se observar a formação de dois grandes grupos denominados I e II, cada um com sete perfis e com similaridade inferior a 25%. No grupo I foram reunidas amostras de diferentes origens, incluindo diferentes gatis e uma amostra de cão. No grupo II foram reunidas cepas de diferentes gatis, clínicas (animais domiciliados) e duas amostras de cães.

De modo geral as amostras de mesmo animal foram clonais, ou seja, agrupadas no mesmo perfil. Nos perfis C e G foram agrupadas amostras clonais isoladas de diferentes animais de mesma origem, no perfil A as amostras agrupadas foram provenientes de diferentes animais de dois gatis distintos. A exceção dos perfis A e B, os outros apresentaram similaridade inferior a 60%.

Um fato interessante é a diversidade de cepas nos gatis A e C. No gatil A foram observados cinco perfis distintos através da PFGE e cinco perfis de resistência a antimicrobianos, e no gatil C foram observados quatro perfis distintos através da PFGE e apenas dois perfis de resistência, em ambos os gatis observa-se cepas agrupadas em perfis com similaridade inferior a 25%. Este dado reflete a diversidade de origens de animais alojados nestes locais e provavelmente refletirá na complexidade do controle das infecções respiratórias nestes animais.

O perfil A foi o menos homogêneo, apresentando cepas clonais, porém com quatro perfis de sensibilidade diferentes, provenientes de quatro animais de dois gatis. Em todos os outros perfis foram agrupados animais de mesma origem com variação de no máximo dois perfis de sensibilidade e dois animais diferentes.

As três cepas provenientes de cães apresentaram baixa similaridade em relação as cepas de felinos avaliadas. Este achado não descarta a possibilidade de transmissão inter-espécies como descrito por Binns et al., (1998) e Foley et al., (2002). No presente estudo não foram isoladas cepas de

animais destas espécies alojados no mesmo local, e poucos isolados foram provenientes de cães, o que provavelmente reduziu a chance de se observar cepas similares.

Tabela 1- Resultados obtidos nas coletas realizadas entre agosto de 2008 e dezembro de 2010

Mês		Cães			Gatos		
		Nº	Positivos	Origem	Nº	Positivos	Origem
2008	Agosto	34	1	Canil	12	0	Clinica
	Setembro	10	0	Clinica	1	0	Clinica
	Novembro	7	0	Clinica	0	0	Clinica
	Dezembro	6	0	Clinica	1	0	Clinica
2009	Fevereiro	6	1	Clínica	4	0	Clinica
	Março	31	0	Canil	0	0	-
	Maio	0	0	Clínica	22	6	Gatil
	Junho	32	0	Canil	0	0	Clínica
	Agosto	10	1	Clínica	7	0	Clínica
	Outubro	0	0	Clinica	37	5	Gatil/ clinica
	Novembro	5	0	Clínica	4	0	Clínica
	Dezembro	3	0	Clínica	1	0	Clínica
2010	Fevereiro	0	0	-	29	0	Gatil
	Março	54	0	Canil/ Clínica	3	0	Clínica
	Abril	10	0	Canil/ Clínica	2	0	Clinica
Total		208	3		123	11

Gráfico 1- Número de cepas de *B. bronchiseptica* resistentes aos antimicrobianos testados

Tabela 2- Perfis de resistência observados entre as 45 cepas de *B. brobchiseptica* estudadas.

Antimicrobiano	Perfil de resistência						
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V	Tipo VI	Tipo VII
Amoxicilina	R	R	R	S	S	S	R
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R
Penicilina G	R	R	R	R	R	R	R
Ceftiofur	R	R	S	R	S	R	R
Eritromicina	S	R	S	S	R	R	S
Florfenicol	S	S	S	S	S	S	S
Lincomicina	R	R	R	R	R	R	R
Norfloxacin	S	S	S	S	S	S	S
Enrofloxacin	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S
Sulfonamidas	R	R	R	S	R	S	S
Cotrimoxazol	R	R	R	S	R	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S
Doxiciclina	S	S	S	S	S	S	S
N. cepas	19	12	6	5	1	1	1

Figura 1 – Eletroforese em campo pulsado– colunas 1 a 13 representam alguns dos perfis eletroforéticos encontrados a partir do emprego da enzima *Xba* I nas cepas de *B. bronchiseptica*. Coluna 14 representa o marcador de peso molecular λ DNA-PFGE (New England BioLabs.)

Figura 2. Dendrograma obtido pela análise dos géis de PFGE de *Bordetella bronchiseptica* utilizando a enzima de restrição *Xba* I, baseado no coeficiente de similaridade de Dice

6 CONCLUSÕES

Apesar da baixa frequência de isolamento de *B. bronchiseptica* em amostra oriundas de cães sabe-se que este agente apresenta importante papel nas infecções do trato respiratório superior desta espécie.

A presença do agente em amostras provenientes de gatos ressalta a importância dos cuidados e da conscientização de pessoas imunossuprimidas no trato de seus animais de companhia.

Os resultados do perfil de resistência indicam a importância da escolha certa das drogas nos tratamentos das infecções por este agente, uma vez que o mesmo não é sensível a várias classes de antimicrobianos frequentemente usados na prática clínica veterinária e humana.

A PFGE permitiu o agrupamento de cepas provenientes de animais de mesma origem e de perfis de sensibilidade semelhantes, sendo que no presente estudo não foram observados animais carregando mais de um tipo de cepa de *B. bronchiseptica*.

A técnica permitiu ainda diferenciar cepas de animais abrigados no mesmo gatil refletindo a diversidade genética do agente no mesmo ambiente, provavelmente devido a introdução de animais de origens distintas.

REFERÊNCIAS

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 *Epidemiol. Infect.*, v.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**, 1999, v. 144 n. 21 :575-580.

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.

BRICKMAN, T. J.; ANDERSON, M. T.; ARMSTRONG S. K. *Bordetella* iron transport and virulence. **Biomaterials**, v.20, p.303-322, 2007.

CHALKER, V. J.; TOOMEY, C.; OPPERMAN, S.; BROOKS, H. W.; IBUOYE, M. A. BROWNLIE, J. ; Andrew N. RYCROFT. Respiratory Disease in Kennelled Dogs: Serological Responses to *Bordetella bronchiseptica* Lipopolysaccharide Do Not Correlate with Bacterial Isolation or Clinical Respiratory Symptoms. **Clinical and Vaccine Immunology**. V.10, n.3, 2003.

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.

FLAK, T. A.; GOLDMAN, W. E. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. **Cellular Microbiology** v.1, n.1, July, 1999.

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.

GASKELL, R. M. & BENNETT, M. Feline infectious respiratory disease. Infectious tracheobronchitis. In **Feline and Canine Infectious Diseases**. Oxford, Blackwell Science. P. 3-26, 89-94, 1996.

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.

GREENE, C. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA; 1998.

GROSS, R.; KEIDEL, K; SCHMITT, K. Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. **Medical Microbiology and Immunology**. v.199, n.3, p. 155-163, August 2010.

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

KADLEC, K.; WIEGAND, I.; KEHRENBURG, C.; SCHWARZ, S. Studies on the mechanism of β -Lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.59, p. 396-402, 2007.

KEIL, D. J.; FENWICK, B. Evaluation of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates using randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and ribotyping. **Veterinary Microbiology** v. 66, n. 1, p. 41-51, 1999.

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.

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

MOCHIZUKI, M.; Akiko, Y.; OHSHIMA, T.; OHUCHI, ; ISHIDA, T. Etiologic Study of Upper Respiratory Infections of Household Dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.70 n. 6, p.563–569, 2008.

NELSON, R. W.; COUTO, C.G. Distúrbios da Traquéia 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.

SACCO, R.E.; REGISTER, K.B.; NORDHOLM, G.E. Restriction endonuclease analysis discriminates *Bordetella bronchiseptica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 12, 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. **J. Vet. Sci.**, 8(1), 65–73, 2007.

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.

REGISTER, K. B.; BOISVERT, A. ACKERMANN, M.R. Use of ribotyping to distinguish *Bordetella bronchiseptica* isolates. **International Journal Systematic Bacteriology**. v. 47, n.3, p. 678-683, 1997.

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